

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

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS DAS FOLHAS DE PATA DE VACA (*Bauhinia forficata* subespécie  
*pruinosa*)**

PAULA ALESSANDRA PALSIKOWSKI

**TOLEDO – PR**

**Maio de 2020**

PAULA ALESSANDRA PALSIKOWSKI

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS DAS FOLHAS DE PATA DE VACA (*Bauhinia forficata* subespécie  
*pruinosa*)**

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

Orientador: Edson Antonio da Silva

**TOLEDO – PR**

**Mai de 2020**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Palsikowski, Paula Alessandra

Avaliação de métodos de extração de compostos bioativos das folhas de pata de vaca (*Bauhinia forficata* subespécie pruinosa) / Paula Alessandra Palsikowski; orientador(a), Edson Antonio da Silva, 2020.

xviii, 153 f.

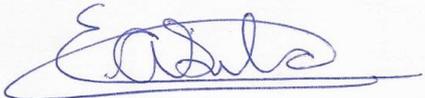
Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2020.

1. Engenharia química - Teses. 2. *Bauhinia forficata*. 3. Extratos bioativos. 4. Extração não convencional. I. Silva, Edson Antonio da . II. Título.

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

Esta é a versão final da tese de doutorado apresentada por Paula Alessandra Palsikowski à Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 08 de maio de 2020.

COMISSÃO JULGADORA



Edson Antonio da Silva  
Orientador



Marcia Regina Fagundes-Klen  
Membro interno



Salah Din Mahmud Hasan  
Membro interno



Katia Andressa Santos  
Membro externo



Jacqueline Ferandin Honório  
Membro externo

*Dedico esta tese à minha família:  
meus pais Paulo e Paula, meu irmão Júnior (in memoriam),  
e ao meu namorado Marcio.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me guiar, dar saúde, força, proteção, coragem, condições e capacitação para realizar mais esta etapa e iluminar-me nesta caminhada.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Antonio da Silva, por ter aceitado orientar-me e ter me acolhido com paciência e incentivo. Agradeço pela confiança depositada, a motivação, o empenho e o apoio em todas as etapas deste trabalho.

Agradeço à Universidade UEM, em especial à professora Dra. Camila da Silva pelo suporte oferecido na realização da parte experimental deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, Paulo Palsikowski e Paula Estela Carletto Palsikowski, por todo o amor e carinho, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Só cheguei até aqui porque vocês me educaram e ensinaram-me a ser o que sou hoje.

Agradeço ao meu namorado, Marcio Douglas da Silva, por seu amor, paciência, carinho, compreensão e incentivo.

Aos colegas, em especial à Kátia Andressa dos Santos, Tales Alves, Letícia Besen, Paula Frohlich, Elissandro Klein, Ana Paula Becker e Carolina Tavares pela ajuda nos experimentos.

A Capes pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos os professores, funcionários e colegas que contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E NOMENCLATURA .....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1. <i>Bauhinia forficata</i> .....	4
3.1.1. Caracterização botânica .....	4
3.1.2. Aspectos químicos .....	7
3.1.3. Aspectos farmacológicos .....	8
3.2. Radicais livres e Atividade antioxidante .....	12
3.2.1. Métodos de avaliação da atividade antioxidante .....	14
3.3. Métodos de extração convencionais .....	20
3.3.1. Soxhlet .....	21
3.3.2. Maceração .....	23
3.4. Métodos de extração não convencionais .....	23
3.4.1. Extração assistida por ultrassom (UAE) .....	24
3.4.2. Extração por fluido supercrítico (SFE) .....	28
3.4.3. Extração por fluido supercrítico com cossolventes.....	33
3.4.4. Extração por líquido pressurizado (PLE) .....	35
3.5. Modelagem matemática.....	39
3.5.1. Modelo de Sovová .....	40

3.6. Considerações parciais .....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	49
4.1. Reagentes .....	49
4.2. Matéria prima.....	49
4.2.1. Determinação da umidade.....	50
4.2.2. Análise Granulométrica .....	50
4.2.3. Massa específica real das folhas ( $\rho_s$ ) .....	51
4.3. Métodos de extração .....	51
4.3.1. Extração convencional – Soxhlet .....	51
4.3.2. Extração convencional – Maceração .....	52
4.3.3. Extração com líquido pressurizado (PLE).....	53
4.3.4. Extração com solventes assistida por ultrassom (UAE) .....	54
4.3.5. Extração com dióxido de carbono supercrítico (SFE).....	56
4.3.6. Extração com dióxido de carbono supercrítico e cossolvente .....	59
4.4. Caracterização dos extratos.....	60
4.4.1. Determinação da composição química dos extratos .....	61
4.4.2. Análise de HPLC- ESI-MS/MS para quantificação da canferitrina .	61
4.4.3. Determinação do teor de flavonoides totais (TFC) .....	62
4.4.4. Determinação do Teor de Fenólicos Totais (TPC) pelo método Folin Ciocalteu .....	63
4.4.5. Determinação da atividade antioxidante pelo Método DPPH .....	64
4.4.6. Determinação da atividade antioxidante pelo Método FRAP – Método de redução do ferro .....	64
4.5. Análises estatísticas .....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	66
5.1. Caracterização das folhas.....	66
5.2. Rendimento.....	67
5.2.1. Métodos convencionais .....	67

5.2.2. Extração com líquido pressurizado (PLE).....	68
5.2.3. Extração assistida por ultrassom (UAE) .....	71
5.2.4. Extração por fluido supercrítico (SFE) .....	77
5.2.5. Extração por fluido supercrítico com cossolvente .....	85
5.3. Determinação da composição química dos extratos das folhas de <i>B. forficata</i> .....	93
5.4. Quantificação de canferitrina nos extratos das folhas de <i>B. forficata</i> .....	96
5.5. Determinação do Teor de Flavonoides Totais.....	100
5.6. Determinação do Teor de Fenólicos Totais .....	108
5.7. Determinação da atividade antioxidante pelo Método DPPH e Método FRAP .....	118
5.8. Otimização do processo UAE.....	130
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	134
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	136
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
9. ANEXO - Artigos Publicados em Periódicos .....	153

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica das subespécies: <i>B. forficata subsp. pruinosa</i> e <i>B. forficata subsp. forficata</i> – Adaptado de Vaz (2015) .....	5
Figura 2. <i>B. forficata subsp. pruinosa</i> : (a) árvore, (b) folhas, (c) flor e legumes, (d) folhas, pecíolos e espinhos. ....	6
Figura 3. Flavonoides presentes nas folhas de <i>Bauhinia forficata</i> – Adaptado de Pizzolatti <i>et al.</i> (2003) .....	7
Figura 4. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do RFC. ....	18
Figura 5. Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH .....	19
Figura 6. Complexo férrico-tripiridiltriazina e Complexo ferroso-tripiridiltriazina .....	20
Figura 7. Representação do processo de extração pelo fenômeno de cavitação: colapso da bolha de cavitação e liberação do conteúdo vegetal .....	25
Figura 8. Sistemas ultrassônicos utilizados comumente: (A) banho ultrassônico; (B) sonda ultrassônica - Adaptado de (A) Chemat <i>et al.</i> (2017); (B) Dias <i>et al.</i> (2017).....	27
Figura 9. Formatos de sonda: (1) cilíndrica uniforme; (2) cônica exponencial; (3) cônica linear ou cônica; (4) stepped - Adaptado de: Pingret, Fabiano-Tixier e Chemat (2013)	28
Figura 10. Diagrama pressão-temperatura para um composto puro - Adaptado de: Herrero, Cifuentes e Ibañez (2006) .....	29
Figura 11. Diagrama pressão-volume para o etanol calculado usando a equação de estado de Peng-Robinson - Fonte: Osorio-Tobón e Meireles (2013).....	36
Figura 12. Curva global de extração típica obtida em processos com fluidos supercríticos com as três etapas do processo.....	41
Figura 13. Representação da convecção do soluto da superfície da matriz sólida até o seio da fase fluida .....	43
Figura 14. Representação da convecção na fase fluida e difusão na fase sólida.....	44
Figura 15. Esquema de montagem utilizando aparato Soxhlet, aquecido por uma manta térmica e acoplado a um condensador que é resfriado por um banho de refrigeração ...	52
Figura 16. Representação do módulo de extração supercrítica. (a) Cilindro de CO <sub>2</sub> ; (b) bomba seringa do CO <sub>2</sub> ; (c) banho de refrigeração da bomba seringa; (d) banho termostático do leito de extração; (e) válvula micrométrica; (f) leito de extração - Adaptado de Klein (2016) .....	57
Figura 17. Distribuição granulométrica das folhas.....	67
Figura 18. Cinéticas de extração com líquido pressurizado .....	71

Figura 19. Curva da cinética experimental obtida pelo método de extração assistida por ultrassom das folhas de <i>B. forficata</i> utilizando etanol como solvente a 50 °C, 50% da potência e razão solvente/folha de 15 mL·g <sup>-1</sup> .....	73
Figura 20. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis potência, razão e temperatura no rendimento das extrações assistidas por ultrassom utilizando etanol como solvente.....	75
Figura 21. Superfícies de resposta ilustrando os efeitos (a) da potência e da temperatura e (b) da potência e razão solvente/folha no rendimento da extração assistida por ultrassom utilizando etanol como solvente.....	76
Figura 22. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis pressão, temperatura e efeito de interação pressão x temperatura no rendimento da SFE.....	79
Figura 23. Curvas cinéticas experimentais das extrações das folhas de <i>B. forficata</i> por SFE .....	82
Figura 24. Curvas experimentais das cinéticas de extração das folhas de <i>B. forficata</i> com CO <sub>2</sub> supercrítico ajustadas pelo modelo de Sovová: ○(60 °C – 220 bar); ●(60 °C – 180 bar); ▲(40 °C – 220 bar); ■(40 °C – 180 bar); ▼(50 °C – 20 bar). Barras de erros representando o desvio padrão da triplicata no ponto central do planejamento experimental. ....	84
Figura 25. Curvas de extração com CO <sub>2</sub> supercrítico com adição de etanol, comparando os tempos de extração estática de 15, 30 e 45 minutos (50 °C, 200 bar e relação mássica de cossolvente e folha de 1:1).....	86
Figura 26. Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão, temperatura e razão solvente:folha no rendimento da SFE com adição de etanol como cossolvente .....	89
Figura 27. Superfície de resposta ilustrando os efeitos dos parâmetros de extração temperatura, razão mássica e pressão no rendimento da SFE com adição de cossolvente. ....	90
Figura 28. Gráficos de resíduos do modelo estatístico para rendimento da extração com fluido supercrítico com adição de cossolvente. ....	91
Figura 29. Curvas experimentais das cinéticas de extração das folhas de <i>B. forficata</i> com CO <sub>2</sub> supercrítico com adição de cossolvente na razão mássica de 0,5:1.....	92
Figura 30. Curvas experimentais das cinéticas de extração das folhas de <i>B. forficata</i> com CO <sub>2</sub> supercrítico com adição de cossolvente na razão mássica de 1,5:1.....	92
Figura 31. Cromatograma da solução diluente.....	96
Figura 32. Cromatograma obtido da injeção da solução padrão de canferitrina na concentração de 100 µg·mL <sup>-1</sup> .....	97

Figura 33. Espectro MS e MS/MS do padrão canferitrina .....	97
Figura 34. Cromatogramas obtidos da injeção das amostras preparadas com extratos de PLE – Hexano e PLE-Etanol a 50 °C .....	98
Figura 35. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis potência, razão e temperatura no teor de flavonoides dos extratos obtidos por extração assistidas por ultrassom.....	102
Figura 36. Superfícies de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração temperatura, razão solvente/folha e potência no TFC.....	103
Figura 37. Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão, temperatura e razão solvente:folha no teor de flavonoides dos extratos por grama de folha obtidos por SFE com adição de cossolvente .....	105
Figura 38. Superfície de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração pressão, razão mássica e temperatura no teor de flavonoides por grama de folha dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente. ....	107
Figura 39. Gráficos de resíduos do modelo estatístico para teor de flavonoides da extração com fluido supercrítico com adição de cossolvente.....	107
Figura 40. Superfícies de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração potência razão solvente/folha e potência no TPC.....	112
Figura 41. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis potência, razão e temperatura no teor de fenólicos dos extratos obtidos por extração assistidas por ultrassom.....	113
Figura 42. Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão, temperatura e razão solvente:folha no teor de fenólicos dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente .....	115
Figura 43. Superfície de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração pressão, temperatura e razão mássica no teor de fenólicos dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente. ....	117
Figura 44. Gráficos de resíduos do modelo estatístico teor de fenólicos para extração com fluido supercrítico com adição de cossolvente. ....	117
Figura 45. Superfícies de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração temperatura, razão solvente/folha e potência na atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e FRAP. ....	124
Figura 46. Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão, temperatura e razão solvente:folha na atividade antioxidante pelos métodos (a) DPPH e (b) FRAP dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente.....	127

Figura 47. Superfície de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração razão mássica, pressão e temperatura na atividade antioxidante dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente avaliados pelos métodos (a)(b) DPPH e (c)(d) FRAP.....	129
Figura 48. Gráficos de resíduos do modelo estatístico (a)(b) DPPH e (c)(d) FRAP para extração com fluido supercrítico com adição de cossolvente.....	130
Figura 49. Respostas previstas pelo modelo (1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> e 4 <sup>a</sup> linhas) e perfis de desejabilidade global (5 <sup>a</sup> linha), em função das variáveis independentes (cada uma das colunas) para o processo de UAE.....	131
Figura 50. Superfícies de resposta da função desejabilidade em função das variáveis de extração na otimização da UAE .....	132

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontos críticos de solventes utilizados em extrações supercríticas .....	29
Tabela 2. Faixas de grandezas para diversas propriedades dos fluidos.....	30
Tabela 3. Valores experimentais e codificados dos níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento Box-Behnken .....	55
Tabela 4. Planejamento experimental das extrações com fluido supercrítico variando pressão e temperatura ( $2^2$ + <i>ponto central</i> ).....	58
Tabela 5. Condições experimentais realizadas na extração com CO <sub>2</sub> supercrítico e etanol como cossolvente ( $2^3$ + triplicata ponto central) .....	60
Tabela 6. Gradiente utilizado na análise de HPLC-ESI-MS/MS .....	62
Tabela 7. Distribuição granulométrica das folhas após secagem e moagem.....	66
Tabela 8. Propriedades dos solventes, condições empregadas e rendimentos obtidos nas extrações com solventes orgânicos.....	68
Tabela 9. Condições aplicadas na extração com líquido pressurizado e rendimentos obtidos experimentalmente.....	69
Tabela 10. Rendimentos obtidos nas extrações assistidas por ultrassom .....	72
Tabela 11. Variáveis independentes do planejamento Box-Behnken utilizadas nas extrações assistidas por ultrassom usando etanol como solvente e rendimento da extração.....	74
Tabela 12. Análise de variância para predição do rendimento da extração assistida por ultrassom a 95% de confiança .....	76
Tabela 13. Condições operacionais das SFE e seus respectivos rendimentos.....	77
Tabela 14. Tabela de efeitos principais pressão e temperatura e de interação no rendimento da SFE .....	78
Tabela 15. Análise de variância para predição do rendimento da extração CO <sub>2</sub> supercrítico a 95% de confiança.....	80
Tabela 16. Teste de curvatura do modelo rendimento para SFE.....	80
Tabela 17. Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações com CO <sub>2</sub> supercrítico .....	83
Tabela 18. Variáveis independentes do planejamento $2^3$ com repetição no ponto central utilizadas nas extrações com CO <sub>2</sub> supercrítico com adição de etanol como cossolvente e rendimento .....	87

Tabela 19. Análise de variância para predição do rendimento da SFE com adição de cossolvente a 95% de confiança .....	89
Tabela 20. Composição química dos extratos das folhas de <i>B. forficata</i> obtidos por Soxhlet, maceração, UAE, PLE, SFE e SFE com cossolvente .....	94
Tabela 21. Teor de canferitrina dos extratos das folhas de <i>B. forficata</i> obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados .....	98
Tabela 22. Teor de flavonoides totais dos extratos das folhas de <i>B. forficata</i> obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados.....	100
Tabela 23. Teor de flavonoides totais dos extratos das folhas de <i>B. forficata</i> obtidos nas extrações com líquido pressurizado.....	101
Tabela 24. Variáveis independentes do planejamento Box-Behnken utilizadas nas extrações assistidas por ultrassom usando etanol como solvente e teor de flavonoides .....	101
Tabela 25. Análise de variância para predição do teor de flavonoides dos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom considerando 95% de confiança .....	103
Tabela 26. Variáveis independentes do planejamento $2^3$ com repetição no ponto central utilizadas na extração com CO <sub>2</sub> supercrítico usando etanol como cossolvente e teor de flavonoides .....	104
Tabela 27. Análise de variância para predição do teor de flavonoides dos extratos obtidos na extração supercrítica com cossolvente considerando 95% de confiança....	106
Tabela 28. Teor de fenólicos totais dos extratos das folhas de <i>B. forficata</i> obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados. ....	109
Tabela 29. Condições aplicadas na extração com líquido pressurizado e teor de compostos fenólicos .....	110
Tabela 30. Variáveis independentes do planejamento Box-Behnken nas extrações assistidas por ultrassom usando etanol como solvente e teor de fenólicos .....	111
Tabela 31. Análise de variância (ANOVA) para o teor de fenólicos dos extratos obtidos por ultrassom considerando 95% de confiança .....	113
Tabela 32. Variáveis independentes do planejamento $2^3$ com repetição no ponto central nas extrações com CO <sub>2</sub> supercrítico usando etanol como cossolvente e teor de fenólicos por grama de extrato e por grama de folha.....	114
Tabela 33. Análise de variância (ANOVA) para os teores de fenólicos dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente considerando 95% de confiança .....	116

Tabela 34. Atividade antioxidante dos extratos das folhas de <i>B. forficata</i> obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados. ....	118
Tabela 35. Coeficiente de correlação linear de Pearson (r) entre as respostas obtidas pelos diferentes métodos .....	120
Tabela 36. Condições aplicadas na extração com líquido pressurizado e atividades antioxidantes obtidas pelos métodos DPPH e FRAP .....	121
Tabela 37. Variáveis independentes do planejamento Box-Behnken utilizadas nas extrações assistidas por ultrassom usando etanol como solvente e atividades antioxidantes determinadas por DPPH e FRAP .....	122
Tabela 38. Análise de variância (ANOVA) para os modelos de DPPH e FRAP para os extratos obtidos por UAE considerando 95% de confiança .....	123
Tabela 39. Coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre as respostas obtidas dos diferentes métodos de análise dos extratos obtidos por UAE seguindo o planejamento Box-Behnken .....	125
Tabela 40. Variáveis independentes do planejamento $2^3$ com repetição no ponto central utilizadas nas extrações com CO <sub>2</sub> supercrítico usando etanol como cossolvente e atividades antioxidantes determinadas pelos métodos FRAP e DPPH .....	126
Tabela 41. Análise de variância (ANOVA) para os modelos estatísticos DPPH e FRAP a 95% de confiança para os extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente.....	128
Tabela 42. Valores preditos pela função de desajuste e observado experimentalmente .....	133

## LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E NOMENCLATURA

AA	Atividade antioxidante
ANOVA	Análise de variância
CER	Período de taxa constante de extração
CG-MS	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa
$C_p$	Capacidade calorífica específica do solvente ( $J \cdot g^{-1} \cdot ^\circ C^{-1}$ )
$D_{ext}$	Fator de diluição das amostras ( $mg \cdot mL^{-1}$ ).
DC	Período controlado pela difusão intrapartícula
$d_p$	Diâmetro médio das partículas (mm)
DPPH	Método antioxidante 2,2-difenil-1-picril-hidrazila ( $\mu mol E Trolox \cdot g_{extrato}^{-1}$ )
EAG	Equivalente de ácido gálico
ED	Extração dinâmica
EE	Extração estática
FER	Período de taxa decrescente de extração
FRAP	Método antioxidante redutor de ferro ( $\mu M E Fe^{2+} \cdot g_{extrato}^{-1}$ )
$h$	Coordenada direção axial do leito de extração (m)
$J(x,y)$	Taxa de transferência de massa na interface sólido-fluido ( $g \cdot cm^{-3} \cdot s^{-1}$ )
$k_{Fa}$	Coefficiente volumétrico de transferência de massa no filme externo ( $min^{-1}$ )
$k_{Sa}$	Coefficiente volumétrico de transferência de massa no sólido ( $min^{-1}$ )
$m$	Massa de solvente (g)
Mac	Maceração
$m_{\acute{o}leo_{i,j}}^{Calc}$	Massa de óleo extraída obtida pelo modelo matemático (g)
$m_{\acute{o}leo_{i,j}}^{Exp}$	Massa de óleo obtida experimentalmente (g)
$m_{amostra}$	Massa seca das folhas de pata de vaca (g)
$m_{extrato}$	Massa de extrato obtido após a evaporação do solvente (g)
$\dot{m}_f$	Vazão mássica de solvente ( $g \cdot min^{-1}$ )
$m_{\acute{o}leo}$	Massa de extrato obtido em um determinado tempo de extração (g)
$m_s$	Massa de sólido isenta de óleo (g)
$m_{solvente}$	Massa de solvente gasto apenas na parte inicial (linear) da curva (g)
$n_{exp}$	Número experimentos
$N$	Número de pontos da curva cinética experimental
P	Potência ultrassônica efetiva (W)
P (%)	Porcentagem da potência ultrassônica (%)
PLE	Extração com líquido pressurizado

$q_0$	Concentração inicial do óleo na matriz sólida ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$r$	Fração de óleo de difícil acesso ao solvente ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$R$	Razão volume de solvente/massa de folha ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )
RFC	Reagente Folin-Ciocalteu
$R_m$	Razão mássica entre cossolvente e folha ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
RNS	Espécies reativas ao nitrogênio
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
RSS	Espécies reativas ao enxofre
SET	Transferência de um elétron
SFE	Extração com fluido supercrítico
$S_b$	Solubilidade do extrato no solvente( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ );
Sox	Soxhlet
$t$	Tempo (s)
$T$	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
$t_{\text{CER}}$	Tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte inicial do leito (min)
$t_{\text{FER}}$	Tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte final do leito (min)
TFC	Teor de flavonoides totais ( $\text{mg EQ}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ )
TPC	Teor de fenólicos totais ( $\text{mg EAG}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ )
$U$	Velocidade intersticial do fluido ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ )
UAE	Extração assistida por ultrassom
UV-VIS	Ultravioleta-visível
$V_{\text{leito}}$	Volume total do leito de extração ( $\text{cm}^3$ )
$W$	Parâmetro adimensional relacionado à transferência de massa no interior do sólido
$X$	Razão mássica de soluto (concentração) na fase sólida ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$X_0$	Concentração inicial de soluto no sólido ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$X_K$	Razão mássica do soluto de difícil acesso ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$X_P$	Razão mássica do soluto de fácil acesso, ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$Y$	Razão mássica de soluto (concentração) na fase fluida ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$Z$	Parâmetro adimensional do modelo de Sovová relacionado à transferência de massa na fase fluida
$\rho_f$	Densidade do fluido ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )
$\rho_{\text{leito}}$	Densidade do leito ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )
$\rho_s$	Densidade das folhas ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )
$\varepsilon$	Porosidade do leito

# **AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FOLHAS DE PATA DE VACA (*Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*)**

**DOCTORANDA: PAULA ALESSANDRA PALSIKOWSKI**

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

## **RESUMO**

A pata de vaca (*Bauhinia forficata*) é uma espécie de planta nativa da América do Sul, muito utilizada na medicina popular, principalmente devido à sua atividade hipoglicemiante, que está relacionada à presença de flavonoides. Esta espécie é subdividida em duas subespécies, das quais a *B. forficata* subsp. *pruinosa* tem muito a ser explorada cientificamente. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os extratos das folhas de pata de vaca em termos de rendimento, composição química, teor de fenólicos e flavonoides e atividade antioxidante, obtidos por diversos métodos de extração: supercrítica com dióxido de carbono e cossolvente, Soxhlet, maceração, líquidos pressurizados e assistido por ultrassom. As extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico foram realizadas nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e pressões de 180, 200 e 220 bar, com vazão volumétrica de 2 mL.min<sup>-1</sup> e tempo de extração total de 200 minutos. O maior rendimento obtido por extração supercrítica foi de 1,14 % em 60 °C e 220 bar. O modelo matemático desenvolvido por Sovová foi aplicado para descrever as curvas cinéticas de extração e mostrou um bom ajuste aos dados experimentais. Etanol foi utilizado como cossolvente na extração supercrítica, proporcionando rendimento de até 5,10% em 120 minutos de extração a 40 °C e 220 bar. As extrações Soxhlet (360 min), maceração (7200 min), com líquidos pressurizados (40, 50 e 60 °C; 100 bar e 40 min) e assistidas por ultrassom (50 °C, 50% da potência, 15 mL.g<sup>-1</sup> e 15 min) foram realizadas com os solventes etanol, acetato de etila e *n*-hexano. Essas extrações evidenciaram a afinidade dos compostos por solventes polares, sendo que os extratos obtidos com etanol apresentaram os melhores resultados em relação ao rendimento da extração, teor de fenólicos e flavonoides e atividade antioxidante. Um planejamento experimental Box-Behnken foi empregado para avaliar e otimizar os efeitos da temperatura (40, 50 e 60 °C), potência ultrassônica do equipamento (20, 50 e 80%) e razão volume de solvente/massa de folha (10, 15 e 20 mL.g<sup>-1</sup>) sobre rendimento, teor de compostos fenólicos (TPC), teor de flavonoides (TFC) e atividade antioxidante pelo método FRAP dos extratos das folhas de *B. forficata*. O planejamento experimental gerou modelos

polinomiais de segunda ordem, que descreveram adequadamente os dados experimentais, permitindo prever as condições ótimas das respostas investigadas. A condição ótima foi de 80% da potência, temperatura de 41 °C, e razão volume de solvente/massa de folha de 20 mL.g<sup>-1</sup>. Nesta condição o rendimento foi de 8,33±0,32%, o teor de compostos fenólicos foi de 59,47 mg EAG.g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>, o teor de flavonoides foi de 62,30±3,38 mg EQ.g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> e a atividade antioxidante foi de 726,7±15,7 μmol EFe<sup>2+</sup>.g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>, que foram próximos aos valores preditos, validando os modelos. De modo geral, o teor de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos obtidos por métodos não convencionais com etanol apresentaram valores próximos e maiores do que os obtidos pelos métodos convencionais. Os principais compostos encontrados nos extratos de *B. forficata* foram tocoferóis, octacosanol, fitol, heneicosano e β-Sitosterol.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata*, extração supercrítica, cossolvente, extração com líquido pressurizado, extração assistida por ultrassom, atividade antioxidante.

**EVALUATION OF COW'S PAW (*Bauhinia forficata* subspecies *pruinosa*)  
LEAVES EXTRACTION METHODS**

**AUTHOR: PAULA ALESSANDRA PALSIKOWSKI**  
**SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA**

**ABSTRACT**

The cow's paw (*Bauhinia forficata*) is a species of plant native to South America, largely used in folk medicine, mainly due to its hypoglycemic activity, that is related to the presence of flavonoids. This species is subdivided into two subspecies, of which *B. forficata* subsp. *pruinosa*, is practically unexplored scientifically. Thus, the aim of this study was to evaluate the extracts of cow's paw leaves in terms of yield, chemistry composition, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity, obtained by various extraction methods: supercritical carbon dioxide and cosolvent, Soxhlet, maceration, pressurized liquids and ultrasound assisted extraction. The CO<sub>2</sub> supercritical extractions were carried out at temperatures of 40, 50, and 60 °C, and pressures of 180, 200 and 220 bar, with a solvent volumetric flow rate of 2 mL.min<sup>-1</sup> and 200 min of total extraction. The highest extraction yield obtained by supercritical extraction was 1.14% at 60 °C and 220 bar. The mathematical model developed by Sovová was applied to describe the kinetic extraction curves and it showed a good fit with the experimental data. Ethanol was used as cosolvent, providing up to 5.10% of yield in 120 min of extraction at 40 °C and 220 bar. The Soxhlet (360 min), maceration (7200 min), pressurized liquid (40, 50 and 60 °C; 100 bar and 40 min) and ultrasound assisted extractions (50 °C, 50% power, 15 mL.g<sup>-1</sup> and 15 min) were conducted using ethanol, ethyl acetate and n-hexane as solvents. These extractions showed the affinity of the compounds for polar solvents, and the extracts obtained with ethanol showed the best results in relation to the yield, phenolic and flavonoid compounds, and antioxidant activity. Box–Behnken experimental design was applied to examine and optimize the effect of the extraction temperature (40, 50 and 60 °C), power (20, 50 and 80%), and solvent to leaves ratio (10, 15, and 20 mL.g<sup>-1</sup>) on the yield, total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and antioxidant activity by FRAP method of *B. forficata* leaves extracts. The experimental design generated second-order polynomial models, which accurately describe the experimental data, allowing predicting the optimal conditions for the investigated responses. Optimal extraction was achieved at

80% power, temperature of 41 °C, and solvent to leaves ratio of 20 mL.g<sup>-1</sup>. Under this condition, the experimental yield was 8.33±0.32%, total phenolic content was 59.47±0.71 mg GAE·g<sub>extract</sub><sup>-1</sup>, the total flavonoid content was 62.30±3.38 mg QE·g<sub>extract</sub><sup>-1</sup> and the ferric reducing antioxidant power was 726.7±15.7 μmol Fe<sup>2+</sup>·E·g<sub>extract</sub><sup>-1</sup>, which were close to the predicted values, validating the models. In general, the phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of extracts obtained by unconventional methods with ethanol showed values close to and greater than those obtained by conventional methods. The major compounds found in *B. forficata* extracts were tocopherols, octacosanol, phytol, heneicosane and β-Sitosterol.

Keywords: *Bauhinia forficata*, supercritical extraction, cosolvent, pressurized liquid extraction, ultrasound assisted extraction, antioxidant activity.

## 1. INTRODUÇÃO

O ecossistema brasileiro possui uma rica biodiversidade, a qual representa uma fonte valiosa e inexplorável de alimentos, extratos e compostos bioativos com potencial para melhorar a saúde humana e bem-estar, porém esta biodiversidade ainda é pouco explorada (Infante *et al.*, 2016).

Muitos estudos têm sido realizados nos últimos anos a fim de se comprovar alguns dos conhecimentos empíricos, uma vez que a medicina popular se utiliza de plantas para diversos fins. Entre as inúmeras espécies vegetais usadas como medicamento na medicina popular, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Leguminosae, encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta (Nogueira e Sabino, 2012; Silva e Filho, 2002).

As plantas do gênero *Bauhinia* são conhecidas no Brasil como “pata de vaca”, “unha-de-boi”, “casco-de-vaca”, “bauínia” e “miroró” (Nogueira e Sabino, 2012). Estas são estudadas quanto à possível ação hipoglicemiante, pois são utilizados no tratamento de diabetes na medicina popular (Silva e Filho, 2002). As folhas são consideradas antidiabéticas, diuréticas e hipocolesterolemiantes, sendo empregadas também contra cistites, parasitoses intestinais e elefantíase (Nogueira e Sabino, 2012). São atribuídas ainda propriedades antifúngicas e antibacterianas (Nogueira e Sabino, 2012).

Para a extração de compostos bioativos, os métodos clássicos empregados são: destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, extração com solventes orgânicos e extração por prensagem (Filippis, 2001; Luque de Castro e García-Ayuso, 1998; Wang e Weller, 2006). Estes métodos geralmente são demorados, demandam grandes quantidades de solventes de alta pureza e energia para a evaporação de grandes quantidades de solvente, podendo degradar alguns dos compostos ativos devido às altas temperaturas utilizadas (Aspé e Fernández, 2011; Cruz *et al.*, 2017; Mezzomo e Ferreira, 2016), além da baixa seletividade de extração (Mezzomo e Ferreira, 2016).

Técnicas inovadoras, tais como: extração com fluídos supercríticos, extração assistida por ultrassom e extração com líquidos pressurizados, têm sido exploradas e podem ser aplicadas na extração de muitos compostos bioativos e comparadas às técnicas tradicionais.

Extratos naturais têm recebido muita importância devido às suas propriedades biológicas, tais como antimicrobianas e antioxidantes, podendo ser utilizados como conservantes de alimentos, repelentes e medicamentos (Rodriguez *et al.*, 2018). No

entanto, nem todos os extratos causam o efeito desejado, devido à variabilidade das condições extrativas utilizadas, comprometendo a eficácia terapêutica (Klein *et al.*, 2009).

A qualidade de um extrato natural e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, estão relacionadas à composição, que depende do processo de extração, o solvente utilizado, a origem da matéria prima, assim como as condições de armazenamento e pré-tratamento aplicados (Cruz *et al.*, 2019).

Dessa forma, o presente projeto de pesquisa visa avaliar diferentes métodos de extração dos compostos bioativos das folhas de pata de vaca, entre eles: extração assistida por ultrassom, extração com fluido supercrítico e extração com fluido pressurizado, assim como avaliar a composição química e atividade antioxidante, a fim de se obter produtos com qualidade e baixo custo, visto que é um material sem valor agregado encontrado nas matas e beiras de estradas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O presente projeto de pesquisa visa investigar métodos de extração (Soxhlet, maceração, assistida por ultrassom, com CO<sub>2</sub> supercrítico, com a adição de cossolvente e com solvente pressurizado) na preparação de extratos de folhas de pata de vaca (*Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa*), realizar a modelagem matemática do processo de extração supercrítica e determinar a atividade antioxidante e composição de voláteis dos extratos obtidos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar solventes com diferentes polaridades (etanol, acetato de etila e *n*-hexano) na extração de folhas de pata de vaca (*Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa*) assistida por ultrassom, por líquido pressurizado, por Soxhlet e por maceração;
- Avaliar os efeitos das variáveis: potência de irradiação do ultrassom, temperatura e razão volume de solvente/massa de folha na extração assistida por ultrassom;
- Otimizar as condições de extração das folhas assistida por ultrassom.
- Avaliar os efeitos da temperatura e pressão na solubilidade e rendimento do extrato obtido com CO<sub>2</sub> supercrítico na extração de folhas de pata de vaca;
- Modelar matematicamente as curvas cinéticas da extração supercrítica;
- Avaliar o efeito da adição de diferentes volumes de cossolvente (etanol) no rendimento do extrato produzido com CO<sub>2</sub> supercrítico;
- Avaliar os efeitos da temperatura na extração das folhas de pata de vaca com líquido pressurizado;
- Caracterizar quimicamente os extratos por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina), FRAP e de Folin Ciocalteu;
- Determinar o teor de flavonoides dos extratos;
- Quantificar a canferitrina em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;
- Comparar o desempenho das diferentes técnicas utilizadas em relação à composição dos extratos, teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e rendimento.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Apresenta-se a seguir uma revisão sobre os métodos de extração empregados na obtenção de compostos bioativos; informações a respeito da pata de vaca (*Bauhinia forficata*), planta empregada neste trabalho para a obtenção dos extratos, uma breve revisão das metodologias para quantificação da atividade antioxidante, teor de flavonoides e do modelo de Sovová.

#### 3.1. *Bauhinia forficata*

A pata de vaca (*B. forficata*) é uma espécie nativa da América do Sul e é conhecida popularmente como tratamento alternativo para diabetes.

##### 3.1.1. Caracterização botânica

O gênero *Bauhinia* está incluído na família Leguminosae (Fabaceae), de acordo com a lista de espécies da Flora do Brasil (Vaz, 2015). Este gênero possui aproximadamente 300 espécies amplamente distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Silva-López e Santos, 2015; Silva e Filho, 2002), sendo que 200 destas podem ser encontradas no Brasil (Vaz e Tozzi, 2005). São comumente conhecidas como “pata de vaca” ou “unha de vaca” devido ao formato de suas folhas que são compostas de dois folíolos unidos na base (Silva-López e Santos, 2015). As plantas do gênero *Bauhinia* apresentam porte arbóreo médio ou arbustivo (Silva-López e Santos, 2015). Possuem flores zigomorfas (simetria bilateral) dispostas em racemos axilares que variam de cor, de acordo com a espécie e subespécie, geralmente róseas ou brancas (Silva-López e Santos, 2015). Seus frutos são legumes ou vagens achatados e deiscentes do tipo linear (Fortunato, 1986).

O nome do gênero foi dado por Bentham em homenagem aos irmãos Jean e Caspar Bauhin, médicos e botânicos suíços que viveram no final do século XVI e início do século XVII (Fortunato, 1986).

A *Bauhinia forficata* Link. pertence ao gênero *Bauhinia*, família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae (Silva-López e Santos, 2015). Suas folhas se assemelham muito com as folhas de outras espécies do gênero *Bauhinia*, contudo sua principal característica morfológica é a presença de espinhos pareados na base foliar (estípulas modificadas) e suas folhas que apresentam ápices bem pontiagudos (Domingos e Júnior, 2016; Silva-López e Santos, 2015). Se a planta estiver florida, então suas flores são

exclusivamente brancas com pétalas estreitas (Domingos e Júnior, 2016; Silva-López e Santos, 2015).

A *B. forficata* é uma espécie nativa da América do Sul e distribui-se pela Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Brasil (Marques, Graziella Silvestre *et al.*, 2013). Na literatura, relata-se a existência das subespécies *B. forficata pruinoso* (Vogel) Fortunato & Wunderlin (sinonímia *B. candicans* Benth.), e *B. forficata forficata* (Domingos e Júnior, 2016; Fortunato, 1986; Marques, Graziella Silvestre *et al.*, 2013; Pontes *et al.*, 2017). As subespécies, porém, têm áreas distintas de ocorrência, como pode ser observado na Figura 1: a *B. forficata* subsp. *forficata* ocorre unicamente no Brasil, distribuindo-se pela região Nordeste e Sudeste, alcançando o estado de Santa Catarina, enquanto que a *B. forficata* subsp. *pruinoso* concentra-se apenas nos estados da Região Sul e São Paulo, além de Paraguai, Uruguai e Argentina (Domingos e Júnior, 2016; Fortunato, 1986; Marques, Graziella Silvestre *et al.*, 2013).



**Figura 1. Distribuição geográfica das subespécies: *B. forficata* subsp. *pruinoso* e *B. forficata* subsp. *forficata* – Adaptado de Vaz (2015)**

As árvores da espécie *B. forficata* L. são espinhentas, semidecíduas (as folhas caem durante todo o ano, mas não totalmente), de copa aberta, que atingem em média de 5-9 metros (Marques, Graziella Silvestre *et al.*, 2013; Nogueira e Sabino, 2012), conforme Figura 2 (a).

As folhas são simples, medem geralmente, quando adultas, de 7 a 12 cm de comprimento e apresentam-se divididas em dois lobos, os quais atingem o terço superior ou, com mais frequência, a metade do comprimento da folha (Miyake, Akisue e Akisue, 1986; Nogueira e Sabino, 2012). A base foliar varia de arredondada a

subcordiforme (formato de coração), como pode ser observado na Figura 2 (b). Apresentam de 9 a 11 nervuras de forte curvatura e tendem a se unirem de quatro a seis no ápice de cada lóbulo. O pecíolo foliar é de comprimento mediano e apresenta dois espinhos em sua base, junto à inserção no caule (Miyake, Akisue e Akisue, 1986), apresentado na Figura 2 (d).

As flores são pentâmeras (5 pétalas), de coloração branca e com pétalas largolineares (Marques, Graziella Silvestre *et al.*, 2013), conforme Figura 2 (c). Os frutos são do tipo legume, indicado na Figura 2 (c), as vagens são achatadas e deiscentes (se abrem quando maduras), medindo de 15 a 25 cm de comprimento, de coloração escura, amarronzada quando na época da abertura (Marques, Graziella Silvestre *et al.*, 2013; Nogueira e Sabino, 2012).

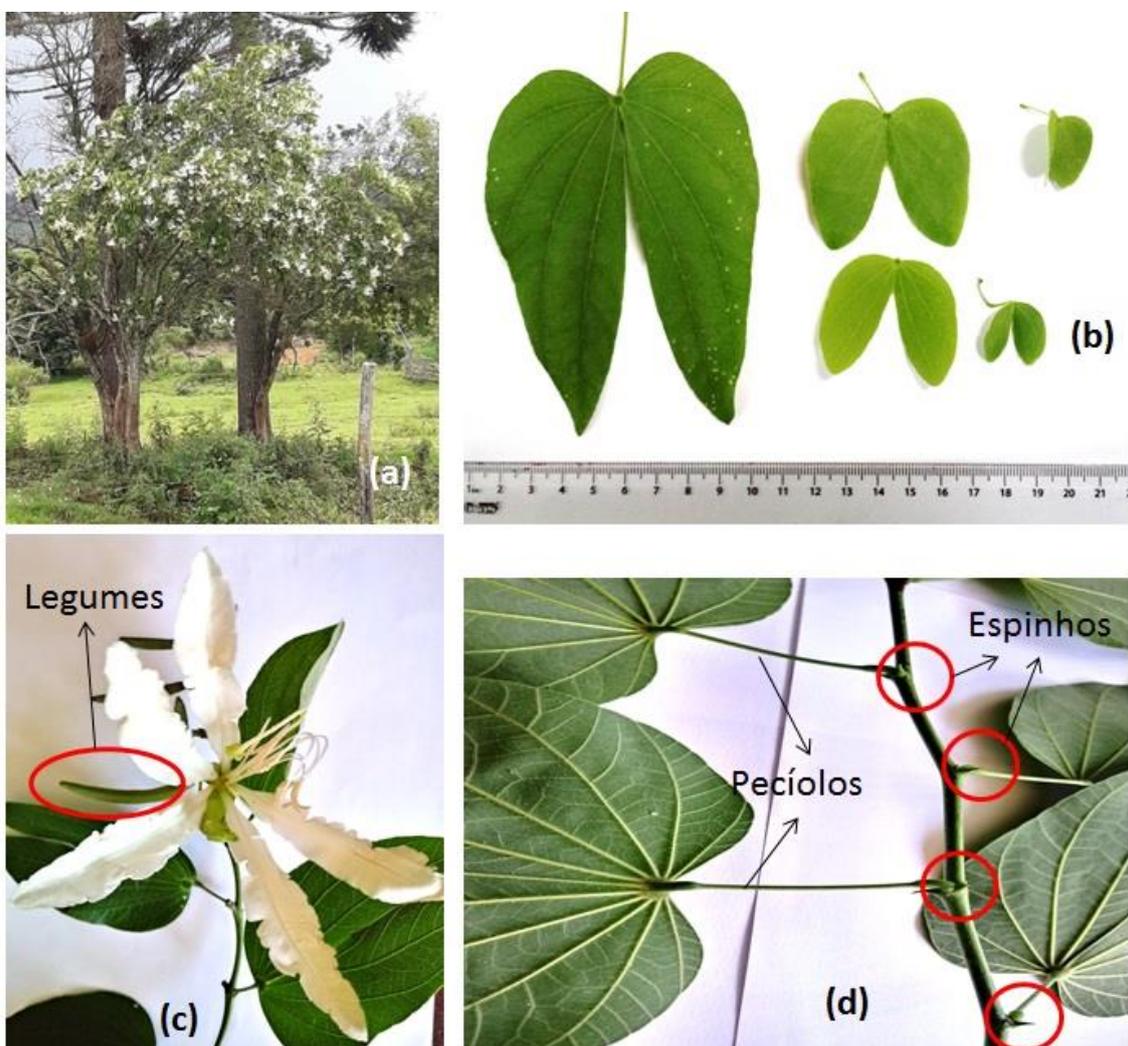


Figura 2. *B. forficata* subsp. *pruinosa*: (a) árvore, (b) folhas, (c) flor e legumes, (d) folhas, pecíolos e espinhos.

### 3.1.2. Aspectos químicos

Muitas espécies de plantas do gênero *Bauhinia* têm sido estudadas química e farmacologicamente, especialmente *B. candicans*, *B. uruguayensis*, *B. purpurea*, *B. forficata* e *B. splendens* (Duarte-Almeida, Negri e Salatino, 2004; Nogueira e Sabino, 2012; Silva e Filho, 2002). Várias classes de metabólitos de interesse medicinal existentes nessas espécies foram relatadas, entre elas lactonas, terpenóides, esteróis, triterpenos, taninos e quinonas (Silva e Filho, 2002). Os flavonoides, livres e glicosilados, principalmente os glicosídeos canferólicos e quercetínicos, predominam em praticamente todo o gênero, sendo também os principais compostos presentes na *Bauhinia forficata* (Marques *et al.*, 2013).

Estudos referentes à composição química das folhas de *Bauhinia forficata* indicam a presença de álcoois alifáticos,  $\beta$ -sitosterol (Silva *et al.*, 2000), kaempferol 3,7-dirhamnoside (canferitrina), alcaloides, flavonoides (especialmente canferol, rutina e quercetina), mucilagens, óleos essenciais, taninos (Miyake, Akisue e Akisue, 1986; Oliveira e Saito, 1987; Silva *et al.*, 2012), heterosídeos cianogênicos, saponinas, catecois (Marques *et al.*, 2013; Pepato *et al.*, 2004), triterpenos, esteroides e açúcares redutores (Marques *et al.*, 2012; Silva-López e Santos, 2015), embora haja controvérsias quanto à presença de taninos em folhas jovens (Paula *et al.*, 2002).

Pizzolatti *et al.* (2003) fracionaram os extratos hidroalcoólicos das folhas de *B. forficata* em acetato de etila e *n*-butanol, isolando o  $\beta$ -sitosterol, canferol [1], canferol 3,7-di-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo [2], quercetina 3,7-di-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo [3], canferol 3-O- $[\beta$ -D-glucopiranosídeo-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo]-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo [4] e quercetina 3-O- $[\beta$ -D-glucopiranosídeo-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo]-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo [5], apresentados na Figura 3.

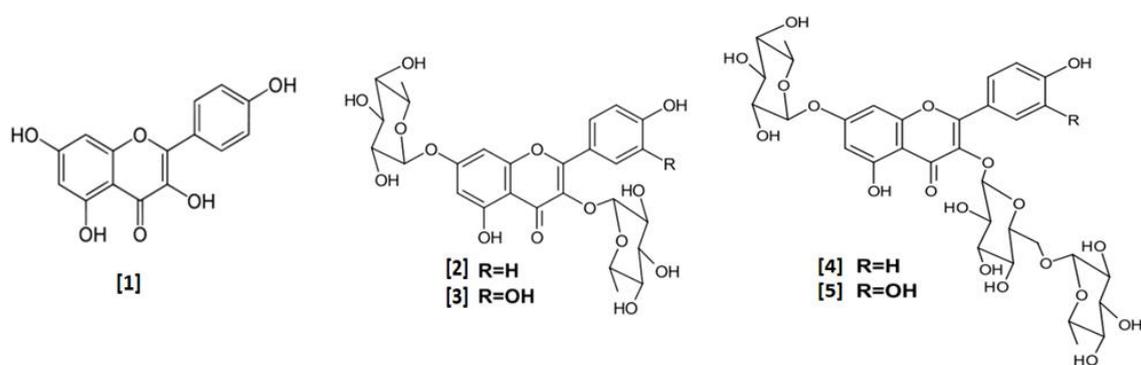


Figura 3. Flavonoides presentes nas folhas de *Bauhinia forficata* – Adaptado de Pizzolatti *et al.* (2003)

Dentre esses flavonóides, o canferol 3,7-di-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, também conhecido como canferitrina, é considerado por muitos autores como o marcador químico para o controle de qualidade em preparações com as folhas de *B. forficata* (Silva *et al.*, 2000). Ele é o composto químico presente nas folhas de pata de vaca que tem maior correlação com o efeito hipoglicemiante.

Os principais constituintes identificados por Duarte-Almeida *et al.* (2004) dos óleos voláteis de *B. forficata* obtidos por destilação a vapor em aparato Clevenger são sesquiterpenos ( $\alpha$ -Copaene,  $\beta$ -Elemeno,  $\beta$ -Cariofileno, Bicyclogermacreno,  $\alpha$ -Humuleno) e monoterpenos ( $\alpha$ -pineno) com rendimentos menores que 0,25%.

Em geral, os extratos de plantas medicinais e produtos fitofarmacêuticos são misturas complexas de centenas de metabólitos primários e secundários, com variações biológicas inerentes, devido às diferenças no ambiente de cultivo, época de colheita, secagem, armazenamento e condições de extração (Pinheiro *et al.*, 2006). Além disso, são relatadas diferenças na composição dos extratos devido à equívocos em relação à autenticidade do material vegetal, principalmente em análises com *B. forficata*, em virtude da semelhança entre as folhas das diferentes espécies do gênero *Bauhinia* (Marques *et al.*, 2012; Miyake, Akisue e Akisue, 1986; Pinheiro *et al.*, 2006).

### 3.1.3. Aspectos farmacológicos

Apesar de muitos dos compostos presentes em espécies do gênero *Bauhinia* serem conhecidos, pouco se sabe sobre a atividade farmacológica da maioria das substâncias isoladas (Silva e Filho, 2002).

#### 3.1.3.1. Atividade antioxidante

Na literatura científica são encontrados relatos a respeito da propriedade antioxidante da *B. forficata*, que está relacionada à presença marcante de flavonoides, grupo representativo de antioxidantes vegetais. Esta atividade é de extrema importância na prevenção de complicações do diabetes mellitus e outros processos patológicos humanos associados ao estresse oxidativo (Damasceno *et al.*, 2004; Khalil, Pepato e Brunetti, 2008; Marques *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2012).

Arigony (2005) verificou que os extratos butanólico, aquoso e etanólico das folhas possuem atividade antioxidante devido à presença de sequestradores de radicais livres, como os flavonoides. Santos *et al.* (2018) também atribuem o efeito antioxidante

do chá de *B. forficata* à presença de flavonoides. De acordo com Salgueiro *et al.* (2013), a *B. forficata* subsp. *pruinosa* apresenta importantes propriedades antioxidantes e quelantes que podem estar relacionadas à presença de diferentes compostos fenólicos e flavonoides assim como componentes como terpenos, esteroides, ácidos aromáticos, quinonas, lactonas e alcaloides.

Salgueiro *et al.* (2016) afirmam que a *B. forficata* subsp. *pruinosa* é capaz de eliminar as espécies reativas ao oxigênio (ROS) por possuir flavonoides entre seus constituintes, principalmente os compostos derivativos de quercetina e canferol.

Damasceno *et al.* (2004) ao avaliarem a administração oral do extrato aquoso das folhas em ratas prenhes diabéticas, evidenciaram uma diminuição na concentração de ácido úrico e aumento na concentração de glutathiona reduzida (GSH). Os autores sugerem que esta planta pode ter ação sobre o sistema de defesa antioxidante, uma vez que o sistema antioxidante da glutathiona é fundamental na defesa celular contra radicais livres reativos e outras espécies oxidantes.

Sousa *et al.* (2004) testaram o potencial antioxidante de um dos produtos isolados das folhas de *B. forficata*, o canferol – 3,7- O –  $\alpha$  – diraminosídeo (canferitrina). Eles demonstraram que este composto possui uma elevada atividade antioxidante frente às metodologias empregadas (DPPH, inibição da atividade mieloperoxidase e diminuição da peroxidação lipídica) e que é apenas 2 ou 3 vezes menos potente que a quercetina, um antioxidante forte e bem-caracterizado.

### 3.1.3.2. Atividade hipoglicemiante

A ação hipoglicemiante da *B. forficata* é observada empiricamente em seu emprego como antidiabético há muitos anos, sendo considerada, muitas vezes pela comunidade rural, como pata de vaca verdadeira, utilizada na forma de chás e outras preparações fitoterápicas (Silva e Filho, 2002).

Os primeiros relatos acerca da atividade antidiabética desta espécie foram demonstrados por Juliane (1929) através de ensaios clínicos com pacientes diabéticos. Muitos outros estudos científicos têm sido desenvolvidos para avaliação da propriedade hipoglicemiante e antidiabética com diferentes modelos experimentais, sendo a propriedade antidiabética atribuída à presença dos glicosídeos canferólicos e quercetínicos presentes nas folhas (Marques *et al.*, 2013).

Curcio *et al.* (2012) avaliaram o efeito hiperglicêmico do extrato aquoso das folhas de *B. forficata* em ratos diabéticos. Eles concluíram que este tratamento reduziu

os níveis de glicose e contribuiu na recuperação do peso desses animais, no entanto, não foi eficaz na recuperação dos danos causados aos tecidos.

Pepato *et al.* (2002) observaram que a decocção das folhas de *B. forficata* apresentou ação hipoglicemiante apenas em ratos diabéticos, não reduzindo a glicemia de animais não diabéticos. Concluíram assim que o mecanismo de ação dos compostos da *B. forficata* é diferente dos mecanismos de ação da insulina e das sulfonilureias (fármacos que promovem a liberação de insulina a partir das células  $\beta$  do pâncreas), confirmando a hipótese de que essa planta contém compostos com atividade anti-insulinase, que podem ser úteis na manutenção dos níveis de qualquer insulina residual que possa estar presente em diabéticos, ou seja, para diabetes moderadas a decocção aumenta a eficiência da insulina.

Resultados obtidos por Lino *et al.* (2004) confirmam a validade do uso clínico da *B. forficata* no tratamento do diabetes mellitus tipo II, uma vez que os extratos desta planta podem reduzir os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL.

Ao avaliar o efeito da ingestão oral de canferitrina por ratos, Sousa *et al.* (2004) observaram efeito hipoglicemiante tanto nos ratos normais quanto nos que tinham diabetes previamente induzidas. Eles sugeriram que o mecanismo hipoglicêmico da canferitrina envolve a inibição da reabsorção da glicose pelo rim, um atraso no catabolismo da insulina (inibição das insulinas) e/ou potenciação do efeito da insulina residual.

Ferreres *et al.* (2012) demonstraram que a redução glicêmica promovida pela *B. forficata* é resultante de inibição da  $\alpha$ -glicosidase, enzima responsável por catalisar o processo final na digestão de carboidratos. Inibidores de  $\alpha$ -glicosidase são geralmente usados para controlar os níveis de glicose no sangue de pacientes com diabetes mellitus (Ferreres *et al.*, 2012). Segundo os autores, tal ação pode ser decorrente da presença dos derivados quercetínicos e canferólicos da espécie.

Mais recentemente, Souza *et al.* (2018) observaram que os flavonoides presentes nas folhas de *B. forficata* agem como agentes hipoglicemiantes através da redução da absorção intestinal de carboidratos, inibindo a  $\alpha$ -glicosidase (envolvida no metabolismo da glicose), melhorando a secreção e ação da insulina e devido às suas propriedades antioxidantes.

Embora a maioria dos estudos apresentem resultados positivos no que se refere à confirmação das atividades antidiabética e hipoglicemiante, alguns são controversos

(Damasceno *et al.*, 2004; Ferreres *et al.*, 2012; Salgueiro *et al.*, 2016). Os resultados discrepantes podem estar relacionados a diferentes aspectos não levados em consideração nestas investigações, como: o modelo experimental empregado, os tipos e métodos de preparação de extratos e/ou frações, as diferentes doses e vias de administração utilizadas. Assim também, podem estar envolvidos vários fatores que podem influenciar o teor dos metabólitos, mas que muitas vezes não são levados em consideração nas investigações, quais sejam: constituição genética da espécie, fatores ambientais (tipo de solo), variações sazonais e condições em que foi feito o cultivo e o armazenamento da planta (Marques *et al.*, 2013; Silva e Filho, 2002).

#### 3.1.3.3. Atividade antimicrobiana

Souza *et al.* (2014) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas *B. forficata* frente às bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* através da determinação da Concentração Bactericida Mínima. Eles obtiveram resultados positivos e relevantes para a odontologia e atribuem a atividade antimicrobiana aos taninos e flavonoides encontrados nessa planta.

Pereira *et al.* (2014) observaram que o extrato hidroalcoólico de *B. forficata* demonstrou atividade sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *epidermidis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*), porém não foi eficaz para as cepas fúngicas.

Embora a maioria dos estudos apresentem resultados positivos no que se refere à atividade antimicrobiana, Miceli *et al.* (2015) não observaram tal atividade frente às bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, as bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* e ao fungo *Candida albicans*.

#### 3.1.3.4. Atividade anticoagulante e antifibrinogênica

Oliveira *et al.* (2005) verificaram que o extrato aquoso de partes aéreas de *B. forficata* é capaz de neutralizar a coagulação induzida pelo veneno das cobras *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*, provavelmente devido a inibição das enzimas serina-proteases envolvidas nos distúrbios de coagulação sanguínea pelos princípios ativos da planta.

A atividade antiedematogênica foi demonstrada por Arigony (2005) ao utilizar o método de edema em pata de ratos induzido pela carragenina. De acordo com a autora, essa atividade demonstrada pode estar relacionada a um possível sinergismo entre seus constituintes majoritários canferol e quercetina glicosilados ou relacionada ao grupamento catecol.

#### 3.1.3.5. Outras atividades

A infusão das folhas de *B. forficata* ainda é utilizada na medicina popular brasileira como agente diurético, tônico, depurativo, no combate à elefantíase, na redução da glicosúria (Ferrerres *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2013; Nogueira e Sabino, 2012; Pizzolatti *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2019; Silva e Filho, 2002; Souza, Bott e Oliveira, 2007), contra cistites e parasitoses intestinais (Lorenzi e Matos, 2002; Souza *et al.*, 2018). Essas propriedades biológicas diversas são atribuídas aos seus constituintes, entre eles: lactonas, flavonóides, terpenóides, glicolipídeos, esteroides e taninos (Souza *et al.*, 2018).

Ferrerres *et al.* (2012) constataram que as subespécies de *B. forficata* possuem potencial farmacológico contra a doença de Alzheimer, ocasionada por uma inibição parcial das colinesterases devido à presença de quercetina e seus derivados nas amostras.

Tendo em visto os aspectos farmacológicos, verifica-se assim o grande potencial de uso desta planta no tratamento alternativo de diversas doenças.

## 3.2. Radicais livres e Atividade antioxidante

Os radicais livres são produzidos durante várias reações que ocorrem no corpo humano, tais como em processos metabólicos nas mitocôndrias, em processos inflamatórios e durante a prática de exercícios físicos (Carocho e Ferreira, 2013; Sikora *et al.*, 2008). Esses radicais livres são necessários em quantidades pequenas e equilibradas, pois atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas importantes (Alves *et al.*, 2010; Sukmasari *et al.*, 2018).

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons não emparelhados, altamente instáveis e exibem caráter eletrofílico (Infante *et al.*, 2016). Ou

seja, eles são capazes de atacar rapidamente moléculas com alta densidade eletrônica, tais como ácidos graxos insaturados encontrados em alimentos e no corpo humano, assim como biomoléculas (proteínas, DNA e RNA) (Carocho e Ferreira, 2013; Infante *et al.*, 2016). Em relação às espécies radicalares, existem três classes maiores: as espécies reativas ao oxigênio (ROS), espécies reativas ao nitrogênio (RNS) e espécies reativas ao enxofre (RSS) (Carocho e Ferreira, 2013; Carocho, Morales e Ferreira, 2018).

Alguns fatores externos tais como fumo, poluição ambiental, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio ajudam a promover a produção de radicais livres (Carocho e Ferreira, 2013). A produção excessiva de radicais livres gera efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, enzimas, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares, distúrbio conhecido como estresse oxidativo (Alves *et al.*, 2010; Carocho e Ferreira, 2013; Sukmasari *et al.*, 2018). Esses danos contribuem para muitas doenças como: doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, acelera o processo de envelhecimento, tumores malignos, inflamações, catarata, choque hemorrágico, disfunções cognitivas, mal de Alzheimer e Parkinson (Alves *et al.*, 2010; Sikora *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010).

Os organismos vivos possuem sistemas naturais de defesa capazes de regenerar ou prevenir os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio: as enzimas (como superóxido dismutase, catalase e peroxidase) (Sikora *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010), ou compostos (como ácido ascórbico, tocoferóis e glutatona), que estão presentes naturalmente no corpo humano (Silva *et al.*, 2010). Essas substâncias são conhecidas como antioxidantes.

Antioxidantes são substâncias que podem interagir com radicais livres e acabar com reações em cadeia antes que moléculas vitais sejam danificadas (Oroian e Escriche, 2015). Mesmo quando presentes em baixas concentrações, comparadas àquela do agente oxidante, os antioxidantes são capazes de retardar ou impedir os efeitos adversos das espécies reativas (Amorati, Foti e Valgimigli, 2013; Benzie e Strain, 1996; Huang, Boxin e Prior, 2005; Karadag, Ozelik e Saner, 2009; Tiveron *et al.*, 2012), uma vez que absorvem os radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais livres (Silva *et al.*, 2010; Stieven, Moreira e Silva, 2009). A menos que o antioxidante previna a geração de ROS, a reação redox continua ocorrendo. A diferença é que as espécies oxidantes

reagem com o antioxidante ao invés de reagirem com o substrato, isto é, o antioxidante reduz o oxidante (Benzie e Strain, 1996).

Embora os antioxidantes endógenos sejam extremamente importantes e eficientes, eles não são o suficiente para eliminar o excesso de radicais livres produzidos, sendo necessário o consumo de antioxidantes exógenos para manter o sistema corporal saudável (Barros, Baptista e Ferreira, 2007; Carochi, Morales e Ferreira, 2018; Sukmasari *et al.*, 2018), entre eles: ácidos fenólicos, flavonoides, vitaminas, carotenoides e minerais, sendo frutas, folhas e sementes as principais fontes destes compostos (Barros, Baptista e Ferreira, 2007; Carochi e Ferreira, 2013; Carochi, Morales e Ferreira, 2018; Sikora *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010).

Para a indústria alimentícia, também é altamente interessante encontrar novos antioxidantes seguros a partir de fontes naturais. Embora antioxidantes sintéticos sejam muito estáveis e eficazes, eles têm seu uso limitado em vários países devido à possibilidade de causar efeitos adversos à saúde humana (Tiveron *et al.*, 2012).

Diversas pesquisas sobre extração e purificação de compostos antioxidantes a partir de diferentes plantas estão sendo desenvolvidas em todo o mundo (Ayoub e Mehta, 2018; Cavalheiro, 2013; Dagnon *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2012; Vicente e Boscaiu, 2018; Wang e Weller, 2006) e apesar dessa grande quantidade de pesquisas, muito do potencial existente permanece inexplorado.

Para se obter compostos antioxidantes a partir de materiais vegetais, normalmente é necessário um alto rendimento na extração para que o processo seja eficiente, além de métodos que previnam a oxidação e a degradação térmica, uma vez que os compostos bioativos são muito sensíveis ao calor e ao oxigênio (Aspé e Fernández, 2011).

### *3.2.1. Métodos de avaliação da atividade antioxidante*

Os antioxidantes agem nos organismos vivos por meio de diferentes mecanismos: complexação de íons metálicos, captura de radicais livres, decomposição de peróxidos, inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e por modulação de vias sinalizadoras celulares (Oliveira *et al.*, 2009).

Devido aos diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio e suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para

avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* de amostras, porém dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (Oliveira *et al.*, 2009). Assim, a busca por testes rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade antioxidante de extratos obtidos de matrizes vegetais (Alves *et al.*, 2010; Karadag, Ozcelik e Saner, 2009; Oliveira *et al.*, 2009).

Os principais métodos de avaliação da capacidade antioxidantes podem ser divididos em duas categorias de acordo com o mecanismo das reações químicas envolvidas: reação de transferência de átomo de hidrogênio (HAT, do inglês *Hydrogen Atom Transfer*) e reação de transferência de um elétron (SET, do inglês *Single Electron Transfer*) (Huang, Boxin e Prior, 2005; Karadag, Ozcelik e Saner, 2009).

Os métodos baseados em HAT medem a capacidade de um antioxidante eliminar radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio para formar compostos estáveis (Karadag, Ozcelik e Saner, 2009). Os métodos baseados no mecanismo SET detectam a habilidade de um potencial antioxidante em transferir um elétron para reduzir o agente oxidante, incluindo metais, carbonilas e radicais livres (Hidalgo e Almajano, 2017; Karadag, Ozcelik e Saner, 2009). Esses ensaios destinam-se a medir a capacidade de eliminar radicais (ou oxidantes) e não a capacidade antioxidante preventiva de uma amostra (Huang, Boxin e Prior, 2005).

Os métodos baseados no mecanismo HAT são geralmente compostos por um gerador sintético de radicais livres, pelos antioxidantes (da amostra ou do padrão) e por uma sonda molecular (substrato oxidável), que quando oxidada pela espécie reativa, apresenta um sinal mensurável (absorbância UV-Vis ou fluorescência) (Castelo-Branco e Torres, 2011). O antioxidante inibe, por competição, a oxidação do substrato pela espécie reativa de oxigênio, conseqüentemente ocorrerá uma mudança no sinal medido, e a capacidade antioxidante da amostra pode ser quantificada (Castelo-Branco e Torres, 2011). O teste ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) está incluso nessa categoria (Hidalgo e Almajano, 2017).

Os métodos baseados no mecanismo SET envolvem apenas dois componentes na mistura de reação, os antioxidantes e o agente oxidante, que também será a sonda molecular, responsável pelo sinal mensurável da reação (absorbância UV-Vis) (Castelo-Branco e Torres, 2011). Ao abstrair um elétron do antioxidante, a cor da sonda oxidante é alterada, permitindo mensurar a reação e determinar a capacidade antioxidante da amostra através da absorbância em espectrofotômetro (Castelo-Branco e Torres, 2011;

Karadag, Ozcelik e Saner, 2009). Dessa forma, os ensaios com mecanismo de SET detectam a capacidade da amostra em reduzir o oxidante, que não precisa ser estritamente um radical livre, ao contrário dos ensaios com mecanismo de HAT ) (Castelo-Branco e Torres, 2011). Compostos carbonílicos e metais também participam como agentes oxidantes nesse tipo de ensaio (Castelo-Branco e Torres, 2011). Dentre os ensaios desta categoria estão o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), FRAP (*Ferric Ion Reducing Antioxidant Power*) e TPC (*Total Phenolic Content*) utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (RFC) (Hidalgo e Almajano, 2017).

Os mecanismos SET e HAT quase sempre ocorrem simultaneamente na maioria das amostras e o mecanismo dominante é determinado pelas propriedades químicas dos antioxidantes e pelas características físico-químicas da amostra (Castelo-Branco e Torres, 2011; Hidalgo e Almajano, 2017). O radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pode ser neutralizado tanto por redução direta via transferência de elétron ou por sequestro de radical via transferência de átomo de hidrogênio, é difícil determinar o mecanismo dominante sem informações sobre a composição e estrutura dos antioxidantes investigados (Aburas *et al.*, 2013; Hidalgo e Almajano, 2017).

Os métodos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* são: Método de Folin-Ciocalteu (TPC) (Hidalgo e Almajano, 2017), atividade sequestradora do radical DPPH (Oliveira *et al.*, 2009; Oroian e Escriche, 2015), ABTS (Ayoub e Mehta, 2018; Hidalgo e Almajano, 2017), FRAP (Oroian e Escriche, 2015) e ORAC (Castelo-Branco e Torres, 2011; Oroian e Escriche, 2015). Eles são vantajosos devido à simplicidade metodológica, tempo de análise, custo e relativa especificidade, sendo cada um deles direcionado a um mecanismo antioxidante particular. Esses métodos se utilizam de equipamentos disponíveis na maioria dos laboratórios (Benzie e Strain, 1996; Oliveira *et al.*, 2009).

### 3.2.1.1. Método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza (Silva *et al.*, 2010) e são os principais antioxidantes inseridos na dieta humana (Balasundram, Sundram e Samman, 2006). Entre as fontes mais comuns de compostos fenólicos estão os vegetais, as frutas, os chás e vinhos (Balasundram, Sundram e Samman, 2006). Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura um anel aromático com um mais grupamentos hidroxilas variando desde moléculas simples até

compostos polimerizados (Silva *et al.*, 2010). Esses compostos apresentam elevada capacidade antioxidante, que é atribuída à habilidade em complexar íons metálicos, inativar reações radicalares, e prevenir conversão de hidroperóxido em oxirradicais reativos (Oliveira *et al.*, 2009).

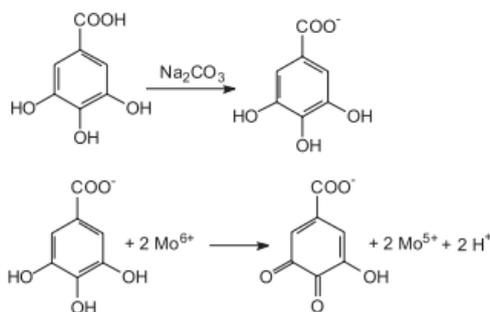
A quantificação de compostos fenólicos pode ser realizada por vários métodos; todavia, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) é o mais extensivamente empregado (Oliveira *et al.*, 2009). O método de Folin-Ciocalteu, também conhecido como teor de fenólicos totais ou teor de fenóis totais (TPC), inicialmente era destinado para a análise de proteínas, devido à atividade do reagente frente à proteína tirosina (que contém um grupo fenol) (Box, 1983; Huang, Boxin e Prior, 2005). Muitos anos mais tarde, Singleton e Rossi (1965) aplicaram este ensaio na análise do teor de fenóis em vinhos, desde então este ensaio foi utilizado em muitas outras aplicações. O método baseado no RFC ganhou popularidade, é simples, sensível, reprodutível e, por isso, tem sido empregado há anos na rotina das análises de compostos fenólicos em extratos de plantas (Huang, Boxin e Prior, 2005; Karadag, Ozcelik e Saner, 2009).

O reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, de cor amarela (Oliveira *et al.*, 2009). A desprotonação de compostos fenólicos em meio básico (ajustada pela adição de carbonato de sódio para pH~10) gera ânions fenolatos (Karadag, Ozcelik e Saner, 2009; Oliveira *et al.*, 2009). A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (Oliveira *et al.*, 2009). Essa mudança na coloração pode ser monitorada espectrofotometricamente com comprimentos de onda entre 750 e 765 nm (Karadag, Ozcelik e Saner, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010) e permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica (Oliveira *et al.*, 2009). Vários interferentes não fenólicos são conhecidos, entre eles, a vitamina C (Oliveira *et al.*, 2009).

É necessária a utilização de uma curva padrão, sendo o padrão mais utilizado o ácido gálico (Hidalgo e Almajano, 2017). Por este motivo os resultados são, em geral, expressos em mg de ácido gálico equivalente por grama de amostra ou de extrato (Hidalgo e Almajano, 2017; Silva *et al.*, 2010).

A Figura 4 mostra a desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos e a reação de

oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual, o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (Oliveira *et al.*, 2009).



**Figura 4. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do RFC.**

Fonte: Oliveira *et al.* (2009).

Uma das desvantagens é a falta de padronização deste método, que pode levar a diferenças de várias ordens de magnitude nos resultados (Karadag, Ozcelik e Saner, 2009).

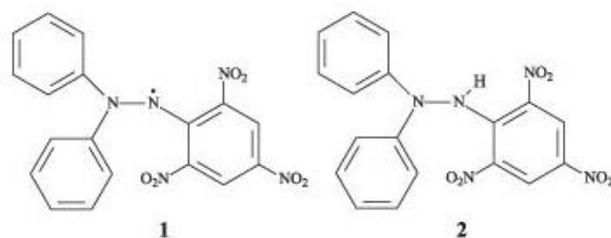
### 3.2.1.2. Método DPPH

Um dos métodos mais utilizado para verificar a capacidade antioxidante é baseado na capacidade do antioxidante em reduzir o radical DPPH<sup>•</sup>. Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, rápidos, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenóides (Alves *et al.*, 2010; Ayoub e Mehta, 2018; Karadag, Ozcelik e Saner, 2009; Oliveira *et al.*, 2009).

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre orgânico de nitrogênio, disponível comercialmente e estável a temperatura ambiente. A deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula confere a este radical uma coloração púrpura intensa, caracterizada por uma banda de absorção máxima em aproximadamente 515 nm (Alves *et al.*, 2010; Huang, Boxin e Prior, 2005).

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>), reduzindo-o a 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (Alves *et al.*, 2010; Huang, Boxin e Prior, 2005; Karadag, Ozcelik e Saner, 2009), ilustrado na Figura 5. Quando a reação de redução ocorre, verifica-se uma mudança simultânea na coloração de púrpura a amarelo pálido, com

consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorvância (Alves *et al.*, 2010; Huang, Boxin e Prior, 2005; Karadag, Ozcelik e Saner, 2009).



**Figura 5. Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH**  
Fonte: Alves *et al.* (2010)

A interação do potencial antioxidante com DPPH depende da conformação estrutural. O número de moléculas de DPPH que são reduzidas parece estar correlacionado com o número de hidroxilas livres (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995). A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH• consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (Oliveira *et al.*, 2009).

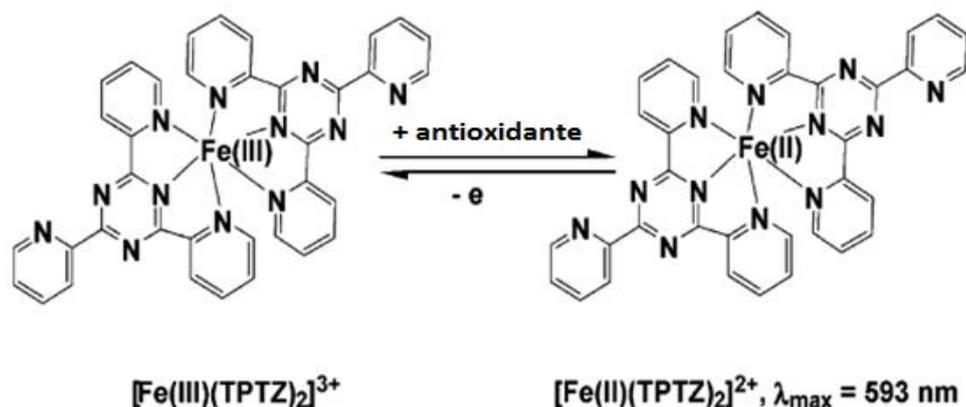
A avaliação da capacidade antioxidante pela mudança na absorvância do DPPH deve ser cuidadosamente medida, uma vez que a absorvância do radical DPPH depois da reação com o antioxidante é diminuída pela luz e pelo oxigênio, além disso, muitos antioxidantes podem reagir muito lentamente ou até serem inertes ao DPPH (Karadag, Ozcelik e Saner, 2009).

### 3.2.1.3. FRAP - Método de redução do ferro

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) foi desenvolvido por Benzie e Strain (1996) para avaliar a capacidade de redução férrica do plasma e de soluções aquosas de compostos isolados e, posteriormente adaptado para a determinação da atividade antioxidante em plantas. Este é um método simples, rápido, barato, robusto e não requer um equipamento específico (Karadag, Ozcelik e Saner, 2009).

Em pH baixo, quando o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe(III)-TPTZ) amarelo é reduzido a forma ferrosa (Fe(II)-TPTZ) pela ação de antioxidantes doadores

de elétrons (Figura 6), se desenvolve uma coloração azul intensa com máxima absorção em aproximadamente 593 nm (Benzie e Strain, 1996; Karadag, Ozcelik e Saner, 2009). A coloração azul resultante medida espectrofotometricamente a 593 nm é considerada linearmente proporcional à capacidade de redução total dos antioxidantes doadores de elétrons (Karadag, Ozcelik e Saner, 2009).



**Figura 6. Complexo férrico-tripiridiltriazina e Complexo ferroso-tripiridiltriazina**  
 Fonte: Huang, Boxin e Prior (2005)

Uma das desvantagens do método FRAP é que nem todos os redutores capazes de reduzir Fe(III) a Fe(II) são antioxidantes (Karadag, Ozcelik e Saner, 2009).

Sendo assim, como muitos métodos estão disponíveis para analisar a atividade antioxidante, com diferentes conceitos, mecanismos de reação, espécies-alvo, condições reacionais e formas de expressar os resultados e aplicações (Oliveira *et al.*, 2009; Tiveron *et al.*, 2012), a atividade antioxidante de uma amostra não deve ser concluída a partir dos resultados de um único método *in vitro*, sendo recomendada a avaliação por pelo menos dois ensaios diferentes, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes para assegurar resultados confiáveis (Castelo-Branco e Torres, 2011).

### 3.3. Métodos de extração convencionais

A extração é uma operação unitária que se baseia na transferência de um ou mais componentes de uma matriz, sólida ou líquida, para outra fase fluida por meio de processos químicos, físicos ou mecânicos (Chemat e Cravotto, 2011) seguida pela separação da fase fluida e recuperação dos componentes (Danielski, 2002). Os principais processos convencionais de extração são: hidrodestilação, maceração,

percolação e Soxhlet (Azmir *et al.*, 2013; Vazquez-Roig e Picó, 2015; Wang e Weller, 2006).

A extração utilizando solventes orgânicos é uma operação de transferência de massa muito utilizada na indústria de alimentos e é utilizada para isolar compostos bioativos de matérias primas vegetais (Andreo e Jorge, 2006). A eficiência da extração de qualquer método convencional depende do tipo de solvente. A polaridade do composto alvo é o fator mais importante na escolha do solvente. A afinidade molecular entre o solvente e o soluto, a transferência de massa, o uso de cossolventes, toxicidade e competitividade econômica também devem ser levados em consideração na escolha do solvente (Azmir *et al.*, 2013).

Após o processo de extração, os solventes devem ser removidos por evaporação ou destilação (Filippis, 2001). A remoção de todo o solvente residual consome muita energia e os resíduos de solvente podem provocar alterações químicas nas moléculas provocando alterações no sabor e aroma dos extratos e até efeitos tóxicos nos consumidores (Filippis, 2001; Maul, Wasicky e Bacchi, 1996). Além disso, os métodos convencionais de extração são geralmente mais demorados, requerem solventes de alta pureza, apresentam baixa seletividade e decomposição térmica de compostos termolábeis (Azmir *et al.*, 2013; Luque de Castro e García-Ayuso, 1998).

### 3.3.1. Soxhlet

O extrator Soxhlet foi inventado por Franz von Soxhlet em 1879, sendo desenvolvido originalmente para a extração de lipídeos de materiais sólidos. Esta técnica vem sendo muito utilizada na extração de compostos bioativos de diversos materiais vegetais e é considerado um modelo de referência para comparar com novas técnicas de extração alternativas (Azmir *et al.*, 2013; Luque de Castro e García-Ayuso, 1998; Luque de Castro e Priego-Capote, 2010; Wang e Weller, 2006).

O processo de extração utilizando Soxhlet é realizado com uma pequena quantidade de material sólido, que após ter seu tamanho reduzido é envolvido por um cartucho poroso e colocado no interior do extrator. O solvente, inicialmente presente em um balão de destilação, é evaporado e quando condensa entra em contato com a matriz vegetal. Quando o solvente atinge o ponto de transbordamento, a solução, carregando o extrato, é aspirada por um sifão que devolve a solução para o frasco de destilação. O extrato permanece no balão de destilação enquanto o solvente retorna para o leito de

extração, e o processo se mantém até que a extração seja interrompida (Azmir *et al.*, 2013; Luque de Castro e García-Ayuso, 1998; Luque de Castro e Priego-Capote, 2010; Wang e Weller, 2006). O extrator Soxhlet utiliza um solvente que, em contato com a matriz sólida solubiliza o extrato (Luque de Castro e Priego-Capote, 2010). Depois de interrompida a extração o solvente deve ser evaporado para se obter a substância desejada (Luque de Castro e García-Ayuso, 1998; Luque de Castro e Priego-Capote, 2010; Wang e Weller, 2006). O rendimento, a composição dos extratos e o tempo de extração variam com o solvente utilizado, as características da matriz e o tamanho das partículas, uma vez que a difusão interna pode ser considerada a etapa limitante da extração (Wang e Weller, 2006).

As vantagens do método de Soxhlet são: amostra está sempre em contato com o solvente renovado a cada ciclo, deslocando o equilíbrio de transferência de massa; é uma metodologia barata e simples, que não requer treinamento especializado e possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação a outros métodos mais recentes; não necessita filtrar a miscela após o término da extração, pois a amostra permanece envolta no cartucho durante todo o procedimento; temperaturas de extração relativamente altas mantidas pelo calor do balão de destilação fazem com que a tensão superficial e a viscosidade sejam baixas comparadas àquelas a baixas temperaturas (Luque de Castro e García-Ayuso, 1998; Luque de Castro e Priego-Capote, 2010; Mazzutti *et al.*, 2017; Wang e Weller, 2006).

Entre as desvantagens da extração em Soxhlet tem-se: o longo tempo de processo, podendo variar de 1 h a 72 h; o aparelho convencional de Soxhlet não permite a utilização de agitação, o que poderia acelerar o processo; a elevada quantidade de solvente empregada, necessitando de uma etapa posterior para eliminar o solvente após a extração, exigindo grandes gastos energia, e ainda podendo tornar-se um problema ambiental devido ao descarte inadequado dos resíduos; além do risco da decomposição térmica dos compostos extraídos, já que, durante a extração, o balão que contém o solvente e os compostos já solubilizados é mantido na temperatura de ebulição do solvente (Luque de Castro e García-Ayuso, 1998; Luque de Castro e Priego-Capote, 2010; Wang e Weller, 2006).

### 3.3.2. Maceração

A maceração foi usada por muito tempo no preparo de tônicos caseiros. Ela se tornou uma forma popular e barata de se obter óleos essenciais e compostos bioativos (Azmir *et al.*, 2013) e por isso é uma técnica amplamente aplicada para extrair compostos não-voláteis de plantas para aplicações na indústria farmacêutica (Azwanida, 2015; Radojković *et al.*, 2016).

O processo de maceração consiste na imersão da matéria-prima (inteira ou em pó) em um recipiente fechado contendo solvente e deixada repousar à temperatura ambiente com frequente agitação até o material solúvel se dissolver, para extrair os compostos de interesse (Azwanida, 2015; Mazzutti, 2012; Singh, 2008). O objetivo do processo é amolecer e quebrar as paredes celulares da planta para liberar os fitoquímicos solúveis. Depois do tempo determinado de extração, a mistura é prensada ou separada por filtração. A escolha do solvente determinará o tipo de composto a ser extraído das plantas (Azwanida, 2015; Singh, 2008).

O mecanismo geral envolvido no processo de maceração é a lixiviação e pode ser afetado por vários fatores, tais como: a área superficial do material a ser extraído, o tempo de extração, a temperatura, o volume de solvente e o uso de agitação (Singh, 2008).

Este método apresenta algumas limitações, entre elas: baixo rendimento; longos períodos de extração, mesmo com agitação; grande quantidade de material vegetal; elevado consumo de solvente, necessitando eliminar esse solvente após a extração e a presença de resíduos de solvente (Jovanovic *et al.*, 2017; Mazzutti, 2012).

### 3.4. Métodos de extração não convencionais

Para suprir as limitações dos métodos convencionais de extração, novas técnicas promissoras têm sido introduzidas. Essas técnicas são conhecidas como técnicas de extração não convencionais. Entre as mais promissoras estão: extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração com fluido supercrítico e extração com líquido pressurizado. Algumas destas técnicas são consideradas como “tecnologias verdes” (Azmir *et al.*, 2013; Vazquez-Roig e Picó, 2015).

### 3.4.1. Extração assistida por ultrassom (UAE)

O ultrassom é uma onda sonora que precisa de um meio, sólido, líquido ou gás, com propriedades elásticas para se propagar. A frequência do ultrassom é de 20 kHz a 10 MHz, sendo inaudível pelos seres humanos (Chemat, Zill-e-Huma e Khan, 2011; Pingret, Fabiano-Tixier e Chemat, 2013).

À medida que uma onda sonora passa através do meio elástico, ela cria ciclos de expansão e compressão. O processo pelo qual as bolhas se formam, crescem e sofrem implosões é conhecido por cavitação, que é responsável pelos efeitos ultrassônicos (Azmir *et al.*, 2013; Castro, Priego-Capote e Peralbo-Molina, 2011; Cavalheiro, 2013; Zhao *et al.*, 2014)

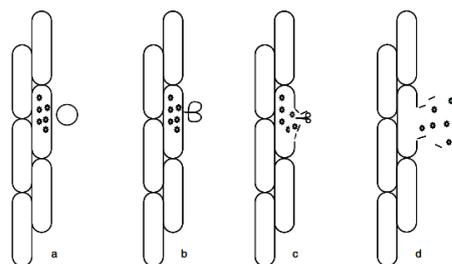
As bolhas de cavitação crescem durante a fase de expansão e quando o tamanho dessas bolhas atinge um ponto crítico, elas entram em colapso durante o ciclo de compressão liberando grandes quantidades de energia (Chemat, Zill-e-Huma e Khan, 2011; Pingret, Fabiano-Tixier e Chemat, 2013).

A rápida compressão adiabática dos gases e vapores dentro das bolhas de cavitação geram temperaturas e pressões extremamente altas, estimadas em 5000 °C e 2000 atm, respectivamente (Castro, Priego-Capote e Peralbo-Molina, 2011; Chemat, Zill-e-Huma e Khan, 2011). Como o tamanho das bolhas é muito pequeno em relação ao volume total do líquido, o calor que elas produzem é rapidamente dissipado no meio sem mudanças significativas na temperatura (Castro, Priego-Capote e Peralbo-Molina, 2011).

A extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês: *ultrasound assisted extraction*) é um método não convencional simples, barato que tem sido muito utilizado nas indústrias químicas e alimentícias (Albuquerque *et al.*, 2017; Chemat *et al.*, 2017) e é uma alternativa eficiente na extração de compostos bioativos a partir de materiais vegetais (Azmir *et al.*, 2013; Jovanovic *et al.*, 2017; Tomšik *et al.*, 2016). Esta técnica tem a vantagem de ser mais rápida e operar em temperaturas mais baixas que as metodologias convencionais de extração, resultando em economia de energia (Albuquerque *et al.*, 2017; Chemat *et al.*, 2017; Pingret, Fabiano-Tixier e Chemat, 2013; Zhao *et al.*, 2014), além de serem condições essenciais para extração de compostos termolábeis (Zhao *et al.*, 2014).

Quando as bolhas de cavitação são geradas próximas à superfície de materiais sólidos imersos ocorrem implosões assimétricas das microbolhas, gerando microjatos de

solvente voltados para as superfícies sólidas e criando fortes forças de cisalhamento. Como apresentado na Figura 7 (a), durante o ciclo de compressão, a bolha entra em colapso (b) e micro-injeções na direção do material sólido são criadas (b e c). As altas pressões e temperaturas do processo irão gerar efeitos como erosão e desintegração das paredes celulares da matriz vegetal, expondo novas camadas à superfície e liberando seu conteúdo no meio (d) (Chemat e Cravotto, 2011; Chemat, Zill-e-Huma e Khan, 2011; Pingret, Fabiano-Tixier e Chemat, 2013).



**Figura 7. Representação do processo de extração pelo fenômeno de cavitação: colapso da bolha de cavitação e liberação do conteúdo vegetal**  
Fonte: Chemat, Zill-e-Huma e Khan (2011)

O fenômeno da cavitação permite uma maior penetração do solvente na amostra, que pode romper as paredes celulares, melhorando a transferência de massa e liberando o conteúdo a ser extraído, levando a um aumento no rendimento da extração e diminuindo o consumo de solventes (Albuquerque *et al.*, 2017; Chemat *et al.*, 2017; Wang e Weller, 2006).

Além disso, a implosão das bolhas de cavitação no meio líquido permite uma mistura mais efetiva, devido à turbulência gerada (Cavalheiro, 2013; Chemat *et al.*, 2017; Chemat e Cravotto, 2011), redução dos gradientes térmicos, diminuição na perda de substâncias inertes e consequentemente uma melhor utilização da matéria prima (Chemat, Zill-e-Huma e Khan, 2011). Altas concentrações de extrato são alcançadas devido à pequena quantidade de solvente utilizada (Chemat e Cravotto, 2011; Chemat, Zill-e-Huma e Khan, 2011; Tomšik *et al.*, 2016).

As maiores desvantagens da extração assistida por ultrassom são: a impossibilidade de renovar o solvente durante o processo, fazendo com que a capacidade de dissolver mais solutos na fase líquida diminua com o tempo (Luque de Castro e García-Ayuso, 1998); a necessidade de uma etapa adicional de filtração após a extração (Chemat e Cravotto, 2011; Luque de Castro e García-Ayuso, 1998); os extratos obtidos não são livres de solvente, sendo necessária mais uma etapa de concentração

após a extração (Rabelo *et al.*, 2016); além disso, as ondas ultrassônicas não são uniformes e são restritas às áreas próximas da sonda ultrassônica, o que torna um desafio a sua aplicação em escala industrial muito grande (Zhao *et al.*, 2014).

Evidências dos efeitos mecânicos do ultrassom, principalmente a destruição das paredes celulares e liberação do conteúdo celular podem ser obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Wang e Weller, 2006).

A escolha do solvente utilizado no processo de extração assistido por ultrassom deve levar em consideração a solubilidade dos compostos de interesse e parâmetros físicos, como viscosidade, tensão superficial e pressão de vapor do solvente, já que estes influenciam no fenômeno de cavitação (Castro, Priego-Capote e Peralbo-Molina, 2011; Chemat *et al.*, 2017; Pingret, Fabiano-Tixier e Chemat, 2013).

O início da cavitação em um líquido requer que a pressão negativa durante o ciclo de rarefação supere as forças coesivas entre as moléculas que compõem o líquido (Chemat *et al.*, 2017). Um aumento na viscosidade, ou um aumento na tensão superficial, geram um aumento nas interações moleculares, aumentando significativamente o limite de cavitação, por isso a amplitude ou intensidade deve ser aumentada ao trabalhar com solventes com alta viscosidade (Chemat *et al.*, 2017). Um solvente com alta pressão de vapor forma mais bolhas, porém o colapso é menos intenso devido à menor diferença entre a pressão externa e a pressão interna (Tiwari *et al.*, 2010), por isso baixa pressão de vapor é preferível (Purohit e Gogate, 2015). Porém, a pressão de vapor depende da temperatura do meio líquido (Chemat *et al.*, 2017).

A temperatura afeta o rendimento do processo de extração pela mudança na solubilidade do soluto assim como tem grande impacto nas propriedades do solvente. Um aumento na temperatura resulta numa diminuição da viscosidade e da tensão superficial e um aumento na pressão de vapor (Chemat *et al.*, 2017).

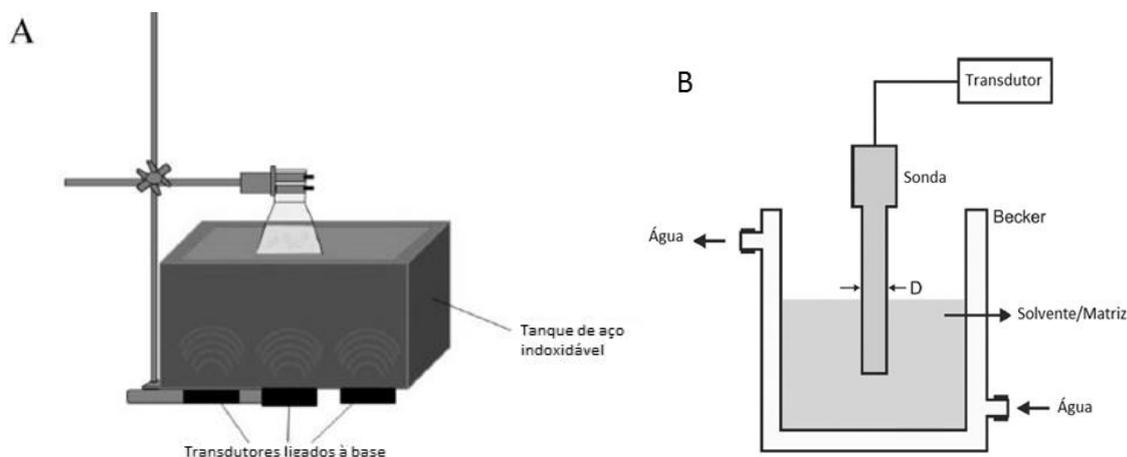
Em baixas temperaturas, o número de bolhas geradas é menor, porém a intensidade do colapso das bolhas é maior, enquanto que, em altas temperaturas, a maior pressão de vapor causa a formação de mais bolhas, mas o colapso é menos intenso (Purohit e Gogate, 2015; Tiwari *et al.*, 2010). Como resultado, em altas temperaturas o efeito do ultrassom devido ao colapso das bolhas de cavitação tende a ser reduzido (Chemat *et al.*, 2017).

Por outro lado, alguns autores relatam o efeito benéfico do aumento da temperatura na UAE (Hani *et al.*, 2017; Klein *et al.*, 2018; Rostagno, Palma e Barroso, 2003), que pode ser justificado pelo aumento no número de bolhas de cavitação,

maiores áreas de contato entre o sólido e o solvente, aumento a difusividade do solvente com consequente aumento da solubilidade do composto de interesse (Chemat *et al.*, 2017; Ramić *et al.*, 2015; Rostagno, Palma e Barroso, 2003). Contudo, este efeito é diminuído quando a temperatura fica próxima ao ponto de ebulição e muitos autores reportam o efeito benéfico de temperaturas menores (Chemat *et al.*, 2017). O controle da temperatura é necessário para prevenir a degradação de compostos termolábeis. A otimização da temperatura pode ser realizada a fim de se obter maiores rendimentos dos compostos esperados sem que ocorra degradação (Chemat *et al.*, 2017).

Outros fatores que afetam a eficiência da extração por ultrassom são: teor de umidade da amostra, presença de gases, tamanho das partículas, intensidade e tempo de sonicação (Azmir *et al.*, 2013; Castro, Priego-Capote e Peralbo-Molina, 2011; Wang e Weller, 2006).

Os processos de extração podem ser realizados em diferentes tipos de equipamentos de ultrassom, sendo o banho de ultrassom e a sonda ultrassônica, apresentados na Figura 8, os mais utilizados (Chemat e Cravotto, 2011; Jerman, Trebše e Mozetič Vodopivec, 2010; Priego-Capote e Luque De Castro, 2004).

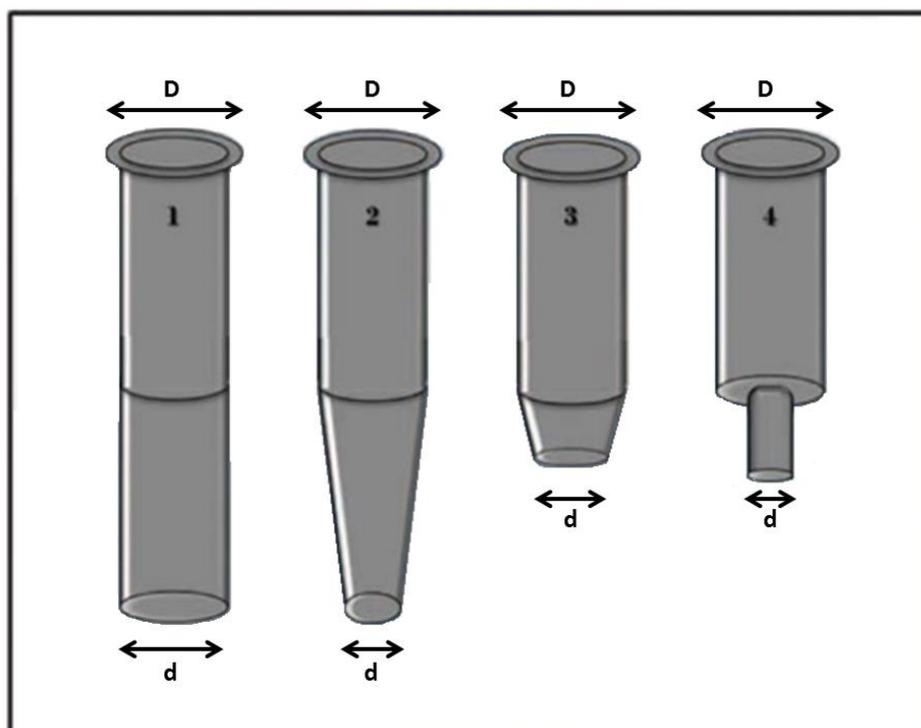


**Figura 8. Sistemas ultrassônicos utilizados comumente: (A) banho ultrassônico; (B) sonda ultrassônica - Adaptado de (A) Chemat *et al.* (2017); (B) Dias *et al.* (2017)**

Os banhos de ultrassom são dispositivos relativamente simples, são mais baratos, operam em uma frequência próxima de 40 kHz, podendo ser equipados com controladores de temperatura e estão presentes na maioria dos laboratórios de química (Chemat *et al.*, 2017; Chemat e Cravotto, 2011), por isso são os mais utilizados. No entanto, esta configuração apresenta algumas desvantagens, tais como: com o passar do tempo, a energia ultrassônica tende a perder a intensidade e a ser distribuída de maneira não uniforme, o que interfere na repetitividade e reprodutibilidade dos resultados

(Cavalheiro, 2013; Priego-Capote e Luque De Castro, 2004). Além disso, a posição em que a amostra é colocada no interior do recipiente e o tamanho do mesmo contribuem para a variação dos resultados (Cavalheiro, 2013; Chemat *et al.*, 2017).

Existem vários modelos de sondas com diferentes tamanhos, diâmetros e formas geométricas, conforme apresentado na Figura 9. Esses parâmetros podem influenciar na eficiência da extração, por isso, a seleção da sonda é feita de acordo com a aplicação e o volume de amostra a ser sonicada (Pingret, Fabiano-Tixier e Chemat, 2013).



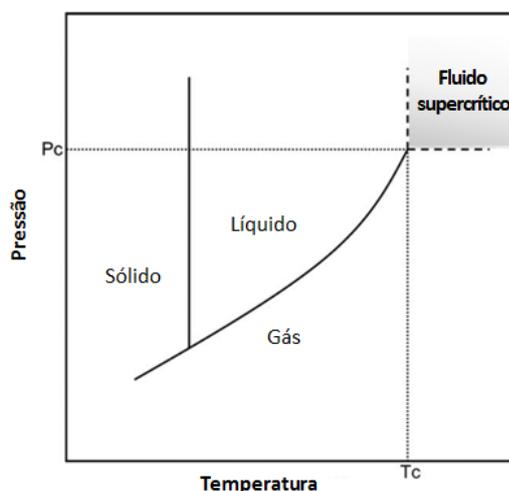
**Figura 9. Formatos de sonda: (1) cilíndrica uniforme; (2) cônica exponencial; (3) cônica linear ou cônica; (4) stepped - Adaptado de: Pingret, Fabiano-Tixier e Chemat (2013)**

Como a sonicação é direta há um aumento da temperatura dentro do reator, o que pode resultar na degradação de substâncias termolábeis, sendo conveniente resfriar o sistema de extração (Cavalheiro, 2013; Pingret, Fabiano-Tixier e Chemat, 2013; Shirsath, Sonawane e Gogate, 2012).

### 3.4.2. Extração por fluido supercrítico (SFE)

A Figura 10 apresenta um diagrama de fases, a curva de equilíbrio vapor-líquido começa no ponto triplo, onde coexistem as três fases em equilíbrio, sólido, líquido e vapor. Esta curva termina no ponto crítico, onde o limite que separa as fases líquido e vapor desaparece e surge apenas uma única fase. Os valores correspondentes de temperatura ( $T_c$ ) e pressão ( $P_c$ ) neste ponto, são chamados de temperatura e pressão

crítica, respectivamente (Mendes *et al.*, 2003). Uma substância é dita no estado supercrítico quando a temperatura e a pressão estão acima do seu ponto crítico (Azmir *et al.*, 2013; Brunner, 1994; Herrero, Cifuentes e Ibañez, 2006; Wang e Weller, 2006).



**Figura 10. Diagrama pressão-temperatura para um composto puro - Adaptado de: Herrero, Cifuentes e Ibañez (2006)**

A temperatura crítica de um gás ( $T_c$ ) é a temperatura acima da qual o vapor não pode mais ser liquefeito por um aumento de pressão (Riera *et al.*, 2004). A pressão crítica ( $P_c$ ) é a maior pressão na qual um líquido pode ser convertido em vapor por um aumento de temperatura (Maul, Wasicky e Bacchi, 1996). Estes valores de temperatura e pressão definem um ponto crítico que é único para cada substância (Azmir *et al.*, 2013).

Na região supercrítica há apenas uma fase, que possui propriedades físicas tanto de vapor quanto de líquido (Azmir *et al.*, 2013; Herrero, Cifuentes e Ibañez, 2006; Riera *et al.*, 2004; Wang e Weller, 2006). A Tabela 1 apresenta as condições críticas de alguns solventes.

**Tabela 1. Pontos críticos de solventes utilizados em extrações supercríticas**

Solvente	Temperatura crítica ( $T_c$ ) ( $^{\circ}\text{C}$ )	Pressão crítica ( $P_c$ ) (bar)
$\text{CO}_2$	31,10	73,76
Água	374,20	220,48
Etanol	240,75	61,40
Propano	96,70	42,45
Tolueno	318,60	41,14
Ciclohexano	280,30	40,73

Fonte: Diehl (2008)

A extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês: *supercritical fluid extraction*) é facilitada pelas propriedades dos fluidos no estado supercrítico, tais como: a densidade do fluido supercrítico e a capacidade de dissolução de solutos são similares à dos líquidos, sua viscosidade, coeficiente de difusão, tensão superficial e compressibilidade assemelham-se à dos gases (Azmir *et al.*, 2013; Herrero, Cifuentes e Ibañez, 2006; Mendes *et al.*, 2003). A Tabela 2 mostra as faixas, em termos de ordem de grandeza, das propriedades termofísicas de gases, fluidos supercríticos e líquidos.

**Tabela 2. Faixas de grandezas para diversas propriedades dos fluidos**

Estado do fluido	Densidade (kg · m <sup>-3</sup> )	Coef. Difusão (m <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	Viscosidade (N·s·m <sup>-2</sup> )
Gases	1-100	10 <sup>-4</sup> – 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-4</sup>
Fluidos supercríticos	250-800	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-3</sup>
Líquidos	800-1200	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-2</sup>

Fonte: Mendes *et al.* (2003)

A grande difusividade de um fluido supercrítico, a sua baixa viscosidade e tensão superficial, quando comparado à de solventes líquidos, facilitam a sua penetração nos poros do material vegetal, favorecendo a transferência de massa a partir do qual o componente ativo é extraído, resultando em melhores rendimentos nas extrações e diminuindo o tempo de extração em relação às extrações convencionais com solventes líquidos (Andreo e Jorge, 2006; Azmir *et al.*, 2013; Riera *et al.*, 2004; Wang e Weller, 2006).

A solubilidade do composto alvo no fluido supercrítico é um fator muito importante na eficiência da extração (Wang e Weller, 2006). Uma das principais características dos fluidos supercríticos é a possibilidade de modificar a solubilidade de um composto pela mudança na pressão e/ou temperatura (Azmir *et al.*, 2013; Cheah, Heng e Chan, 2010; Herrero, Cifuentes e Ibañez, 2006; Wang e Weller, 2006). A solubilidade está diretamente relacionada à densidade (Herrero, Cifuentes e Ibañez, 2006; Wang e Weller, 2006), a qual é sensível a pequenas alterações de temperatura e pressão na região do fluido supercrítico (Mendes *et al.*, 2003).

A temperatura adequada para a extração de compostos termolábeis está entre 35 e 60 °C, ou seja, próximo ao seu ponto crítico para evitar a degradação. O aumento da temperatura diminui a densidade do fluido supercrítico (para uma pressão constante) e assim reduz o poder de solvatação do fluido supercrítico, porém aumenta a pressão de

vapor dos compostos a serem extraídos, aumentando a tendência destes compostos passarem para a fase fluida (Reverchon e Marco, 2006).

O parâmetro mais relevante em um processo de extração supercrítica é a pressão, e deve ser ajustada para controlar a seletividade. Quanto maior a pressão, maior é o poder de solvatação do fluido e menor é a seletividade da extração (Reverchon e Marco, 2006). A densidade adequada do fluido supercrítico é crucial para aumentar o poder de solvatação e seletividade do fluido e o principal fenômeno a ser explorado na extração supercrítica (Wang e Weller, 2006).

Os compostos extraídos podem ser recuperados pela redução da densidade do fluido supercrítico, que geralmente é realizada pela despressurização. Assim, a extração com fluidos supercríticos pode eliminar o processo de concentração que geralmente consome tempo (Azmir *et al.*, 2013; Wang e Weller, 2006). Além disso, os solutos podem ser separados do solvente supercrítico sem a perda de voláteis devido à extrema volatilidade do fluido supercrítico (Andreo e Jorge, 2006; Wang e Weller, 2006).

A eficiência da extração supercrítica pode ser influenciada pelo tamanho das partículas, uma vez que o processo é controlado pela resistência a transferência de massa interna. Partículas grandes podem resultar em longos períodos de extração devido ao maior caminho de difusão do solvente, enquanto que pós finos podem acelerar a extração, mas também podem dificultar o fluxo adequado devido a formação de caminhos preferenciais dentro do leito de extração, deixando de entrar em contato com todo o material a ser extraído, causando perda de rendimento da extração (Reverchon e Marco, 2006; Wang e Weller, 2006).

O tempo de extração é um fator que pode alterar a composição do extrato: compostos com menores massas molares e compostos menos polares são extraídos mais rapidamente durante a extração supercrítica com CO<sub>2</sub>, uma vez que o mecanismo de extração geralmente é controlado pela difusão interna (Wang e Weller, 2006). A solubilidade dos solutos em gases supercríticos apolares diminui com o aumento da massa molecular e com o aumento da polaridade e número de grupos funcionais polares (Brunner, 1994).

Altos teores de umidade podem causar dificuldades mecânicas, tais como entupimento da válvula devido à formação de gelo, além disso, solutos altamente solúveis em água se solubilizarão na fase aquosa, resultando em baixa eficiência da extração supercrítica (Wang e Weller, 2006).

A técnica de extração utilizando fluido supercrítico é uma tecnologia adequada para a extração de uma ampla gama de compostos, especialmente aqueles que têm baixa volatilidade ou são susceptíveis de degradação térmica (Azmir *et al.*, 2013). Esta técnica é reconhecida como um procedimento promissor para aplicações em alimentos, na área farmacêutica e cosmética, pois proporciona maior seletividade, menores tempos de extração e produz extratos livres de resíduos (Andreo e Jorge, 2006; Díaz-Reinoso *et al.*, 2006).

A extração de compostos a partir de fontes naturais utilizando fluidos supercríticos tem sido amplamente estudada, tendo centenas de artigos científicos publicados (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Melo, Silvestre e Silva, 2014; Reverchon e Marco, 2006).

No entanto, a extração com fluidos supercríticos apresenta algumas desvantagens, entre elas: o alto custo de equipamentos e a periculosidade, uma vez que os equipamentos operam a altas pressões e são mais caros que aqueles utilizados em extrações convencionais, assim, não é economicamente viável realizar extrações de produtos de baixo valor agregado e baixo rendimento (Andreo e Jorge, 2006). Outra desvantagem é a dificuldade em se extrair compostos polares sem a adição de um cossolvente adequado (Andreo e Jorge, 2006; Wang e Weller, 2006).

O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) supercrítico é reconhecido como um solvente ideal para extrair seletivamente compostos bioativos solúveis de materiais vegetais (Cheah, Heng e Chan, 2010; Garcia-Mendoza *et al.*, 2017). Quando utilizado puro (sem adição de cossolventes orgânicos) o CO<sub>2</sub> supercrítico ao se despressurizar em condição ambiente, deixa o extrato livre de resíduos indesejáveis de solvente (Cheah, Heng e Chan, 2010; Melo, Silvestre e Silva, 2014).

O CO<sub>2</sub> é o fluido mais utilizado em extrações supercríticas devido as suas características: não tóxico, não inflamável, ambientalmente seguro, inerte, não oferecendo riscos de reações secundárias, como oxidações, reduções, hidrólises e degradações químicas, é inodoro, insípido, facilmente disponível e apresenta baixo custo com alto grau de pureza (Cheah, Heng e Chan, 2010; Cruz *et al.*, 2017; Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Riera *et al.*, 2004).

O dióxido de carbono possui temperatura crítica de 31,3 °C é considerado adequado para extração de vários compostos valiosos, principalmente aqueles com baixa volatilidade ou susceptíveis a degradação térmica, já que as extrações podem ser conduzidas a temperaturas suficientemente baixas para manter as propriedades

organolépticas e químicas dos extratos (Cruz *et al.*, 2017; Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Hasnida *et al.*, 2014; Maul, Wasicky e Bacchi, 1996; Wang e Weller, 2006) e por possuir pressão crítica baixa, de 73,8 bar, oferece a possibilidade de ser operado em pressões moderadas, geralmente entre 100 e 450 bar (Azmir *et al.*, 2013; Maul, Wasicky e Bacchi, 1996). Além disso, a ausência de luz e oxigênio durante a extração evita as reações de degradação de substâncias bioativas (Cheah, Heng e Chan, 2010; Cruz *et al.*, 2017, 2019).

Como este método não usa ou usa apenas pequenas quantidades de solventes orgânicos durante a extração, ele é considerado mais ambientalmente correto que outros métodos de extração convencionais (Wang e Weller, 2006).

A única desvantagem do dióxido de carbono é sua baixa polaridade, ideal para a extração de compostos não polares tais como hidrocarbonetos (Azmir *et al.*, 2013; Wang e Weller, 2006) ou compostos de baixa polaridade (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017).

#### 3.4.3. Extração por fluido supercrítico com cossolventes

Muitos nutracêuticos e compostos com maior polaridade, como flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos e compostos glicosídicos, são pouco solúveis em dióxido de carbono e conseqüentemente não são extraídos aplicando o método de extração supercrítica com gás carbônico puro (Wang e Weller, 2006). Para suprir essa limitação, a adição de um cossolvente polar (modificador químico) ao CO<sub>2</sub> supercrítico aumenta o poder total de solvatação de moléculas polares durante a extração (Cruz *et al.*, 2019; Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Reverchon e Marco, 2006; Wang e Weller, 2006).

Geralmente, uma pequena quantidade de modificador é considerada suficiente para aumentar significativamente a polaridade do dióxido de carbono (Azmir *et al.*, 2013) e mudar as características do solvente de extração, aumentando o rendimento e a velocidade de extração ou ainda alterando a especificidade do processo (Kupski, 2015).

O efeito do aumento da solubilidade do soluto em razão da adição de um cossolvente pode ser denominado efeito “entrainer” (Queiroz e Cajaiba, 2016; Ruckenstein e Shulgin, 2001; Souza *et al.*, 2018). Estudos mostraram que esse efeito aumenta o rendimento e seletividade de compostos de matrizes vegetais (Queiroz e Cajaiba, 2016; Souza *et al.*, 2018). O aumento da seletividade com a adição de um

cossolvente é devido à maior dependência do poder de dissolução com a temperatura e pressão (Almeida, 2006; Brunner, 1994).

O uso de cossolvente geralmente eleva a densidade da mistura, o que contribui no aumento das interações físicas dipolo/dipolo, dipolo/dipolo induzido e dipolo induzido/dipolo induzido entre as moléculas do soluto e do solvente e, conseqüentemente, o poder de extração e solvatação do CO<sub>2</sub> supercrítico (Ekart *et al.*, 1993; Kopcak e Mohamed, 2005). A polaridade e interações específicas com o soluto, como pontes de hidrogênio, favorecem a interação com sítios ativos da matriz sólida, a qual aumenta a capacidade do CO<sub>2</sub> de extrair eficientemente os compostos desejados (Almeida, 2006; Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Hollender *et al.*, 1997; Kopcak e Mohamed, 2005; Lang e Wai, 2001; Michielin *et al.*, 2009). Essas mudanças, por sua vez, podem alterar significativamente a densidade e a compressibilidade do fluido supercrítico original (Sidanius, 2007).

Além disso, os modificadores podem alterar a matriz sólida devido ao inchaço (swell), facilitando o transporte do soluto dos poros intersticiais para a superfície da matriz (Almeida, 2006; Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Hollender *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2018).

Como a seletividade está ligada à polaridade do solvente empregado e do soluto, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja extrair, as propriedades da amostra e resultados experimentais prévios são base para selecionar o solvente ou mistura de solventes mais adequados para determinada (Almeida, 2006; Azmir *et al.*, 2013; Maran, Priya e Manikandan, 2014; Wang e Weller, 2006). O uso de cossolventes adequados durante extrações supercríticas é chave para melhorar a eficiência do processo e a relação custo-benefício dos processos (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Sidanius, 2007).

Na escolha de um cossolvente, além dos fatores relacionados à eficiência do processo extrativo, devem ainda ser considerados a toxicidade e/ou os riscos que seu manuseio representa, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade e o custo do solvente e suas propriedades físico-químicas (Almeida, 2006).

Metanol, etanol, acetona, água, estão entre os cossolventes mais aceitos para fins alimentícios (Balachandran, Kentish e Mawson, 2006). Contudo, os solventes orgânicos são altamente inflamáveis, e por isso têm seu uso restrito industrialmente (Balachandran, Kentish e Mawson, 2006). O etanol é o modificador mais utilizado, em torno de 53% dos trabalhos publicados, de acordo com Melo, Silvestre e Silva (2014).

Ele pode ser a melhor escolha como cossolvente na extração supercrítica por ser inócuo para a saúde humana e para o ambiente, o que o torna vantajoso em relação a outros solventes, principalmente para aplicações em indústrias alimentícia, cosmética ou farmacêutica (Melo, Silvestre e Silva, 2014; Wang e Weller, 2006). O etanol é o único solvente orgânico permitido para fins nutracêuticos e farmacêuticos (Reverchon e Marco, 2006).

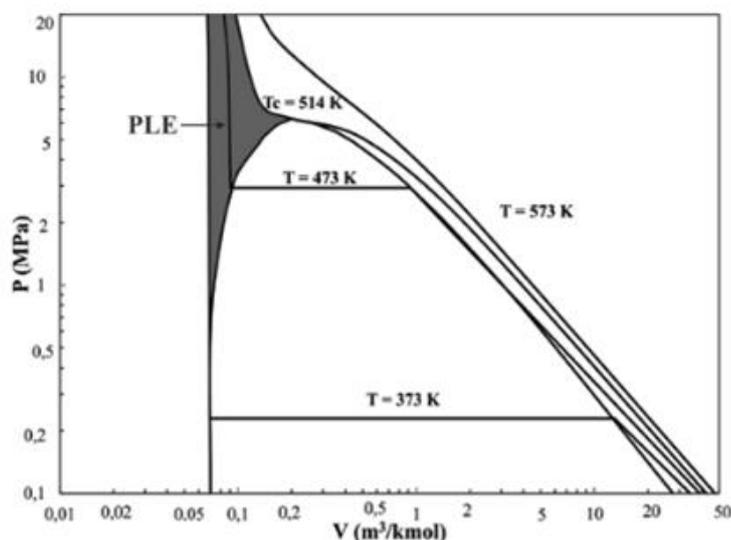
Uma desvantagem do uso de modificadores é que pode resultar numa baixa seletividade de extração (Reverchon e Marco, 2006; Wang e Weller, 2006) e como o cossolvente é líquido à pressão atmosférica, ele será coletado juntamente com os compostos extraídos e assim será preciso um processo subsequente para eliminação do solvente (Reverchon e Marco, 2006), uma vez que, para propósitos alimentícios, é necessário garantir que todos os solventes tenham sido eliminados do produto. Além disso, a quantidade desse modificador deve ser adequada para evitar um efeito indesejado, porque ao utilizar grandes quantidades podem ocorrer interações competitivas que minimizam a eficiência da interação entre soluto e cossolvente, como interação entre cossolvente e cossolvente, e CO<sub>2</sub> e cossolvente (Santos *et al.*, 2017).

#### 3.4.4. Extração por líquido pressurizado (PLE)

A extração utilizando líquido pressurizado (PLE, em inglês: *pressurized liquid extraction*), também conhecida como extração acelerada por solvente, é um método de extração relativamente novo, utilizado para extrair compostos de amostras sólidas ou semissólidas.

Este método tem sido amplamente utilizada para extração de vários compostos bioativos de plantas medicinais, tais como flavonoides e polifenóis (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Leyva-Jiménez *et al.*, 2018; Okiyama *et al.*, 2018; Søltoft *et al.*, 2009; Zhang, Li e Wu, 2008), assim como vários compostos antioxidantes de diferentes materiais vegetais. Além disso, este método tem mostrado resultados promissores, pois permite uma extração mais rápida (Azmir *et al.*, 2013; Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Melgar-Lalanne *et al.*, 2017; Okiyama *et al.*, 2018; Viganó *et al.*, 2016), caracteriza-se por ser facilmente automatizada, com baixo custo e ambientalmente favorável devido ao baixo volume de solvente utilizado (Azmir *et al.*, 2013; Osorio-Tobón e Meireles, 2013; Viganó *et al.*, 2016).

A extração utilizando líquido pressurizado pode ser realizada em uma ampla gama de condições na região líquido comprimido, localizada à esquerda da curva de líquido saturado e abaixo da linha de temperatura crítica ( $T_c$ ), como mostrado no diagrama pressão-volume do etanol da Figura 11 (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).



**Figura 11. Diagrama pressão-volume para o etanol calculado usando a equação de estado de Peng-Robinson - Fonte: Osorio-Tobón e Meireles (2013)**

O método é realizado em temperaturas elevadas (40 – 200 °C) sem atingir o ponto crítico, enquanto aplica altas pressões (3,5 – 20 MPa) para manter o solvente no estado líquido (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Mustafa, Trevino e Turner, 2012; Vazquez-Roig e Picó, 2015; Wang e Weller, 2006) e também para forçar o solvente contra a matriz para penetrar mais eficientemente dentro de lugares em que normalmente não seriam atingidos por solventes sob pressão atmosférica, e assim melhorar a eficiência da extração (Azmir *et al.*, 2013; Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Mustafa, Trevino e Turner, 2012; Osorio-Tobón e Meireles, 2013; Vazquez-Roig e Picó, 2015; Wang e Weller, 2006).

Altas pressões resultam na ruptura da matriz, facilitando a transferência de massa de compostos localizados dentro dos poros da matriz para o solvente, melhorando assim a eficiência da extração (Mustafa, Trevino e Turner, 2012). Embora altas pressões facilitem o processo de extração (Azmir *et al.*, 2013), este parâmetro não apresenta grande influência no rendimento do processo de extração (Osorio-Tobón e Meireles, 2013; Vazquez-Roig e Picó, 2015). Na região de líquido pressurizado, os líquidos são altamente incompressíveis, portanto, mesmo quando os solventes são submetidos a um aumento de pressão com temperatura constante, sua densidade e poder de solvatação

não são afetados significativamente (Osorio-Tobón e Meireles, 2013). No entanto, se a pressão de vapor do composto alvo é importante para sua solubilização no solvente, a pressão pode ter um papel importante no processo de PLE (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

Dependendo da estrutura da matriz e das particularidades de cada processo, o uso de altas pressões pode ser uma influência positiva ou negativa no processo de extração, por exemplo, em altas pressões, a matriz pode ser compactada, afetando o fluxo do solvente (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

Os principais parâmetros que influenciam na eficiência da extração são: temperatura, tempo de extração, volume de descarga, número de ciclos de extração, tipo de sorvente e solventes e, em menor influência, a pressão (Osorio-Tobón e Meireles, 2013; Vazquez-Roig e Picó, 2015). A performance do processo depende da natureza da matriz, das características específicas do composto desejado e sua localização dentro da matriz (Mustafa e Turner, 2011; Osorio-Tobón e Meireles, 2013). Desta forma, é necessário conhecer e estabelecer a influência dos fatores no processo de extração a fim de se obter elevados rendimentos e extratos de alta pureza (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

A temperatura é o principal parâmetro responsável pela aceleração do processo de extração (Osorio-Tobón e Meireles, 2013). Altas temperaturas diminuem a viscosidade e a tensão superficial do solvente, aumentam a solubilidade dos compostos alvo e suas difusividades, rompem as interações matriz-composto e alcançam altas taxas de transferência de massa dos compostos da matéria prima para o solvente, aumentando a cinética e a eficiência do processo de extração (Azmir *et al.*, 2013; Cheah, Heng e Chan, 2010; Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Osorio-Tobón e Meireles, 2013; Wang e Weller, 2006).

A estabilidade dos compostos de interesse e da matriz pode ser afetada pela combinação de altas temperaturas e pressões, dessa forma, a temperatura do processo deve ser selecionada cuidadosamente para não causar degradação dos compostos bioativos ou da matriz, ou o aumento da extração de compostos não desejáveis (Osorio-Tobón e Meireles, 2013; Wang e Weller, 2006). Um limite máximo de temperatura deve ser fixado e depende de vários fatores, principalmente do tempo de extração (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

O transporte dos analitos a partir da matriz é altamente influenciado pela polaridade do solvente e suas propriedades físicas, que está relacionado a vários

parâmetros do processo (Vazquez-Roig e Picó, 2015). Assim como para as extrações convencionais, o solvente utilizado para a extração deve ser altamente seletivo, com alta capacidade de solvatação do composto alvo e minimizar a co-extração de outros componentes da matriz, ou seja, a polaridade do solvente deve ser semelhante a do composto alvo (Osorio-Tobón e Meireles, 2013; Vazquez-Roig e Picó, 2015).

O tamanho da partícula exerce grande influência na performance do processo PLE. Partículas menores geram uma maior porcentagem de sólidos extraíveis, permitindo uma maior recuperação dos compostos bioativos (Cheah, Heng e Chan, 2010; Osorio-Tobón e Meireles, 2013). A redução do tamanho da partícula por moagem aumenta não apenas a área específica do material, mas também rompe as paredes celulares, liberando grandes quantidades de compostos bioativos (Osorio-Tobón e Meireles, 2013). Partículas com tamanhos maiores possuem maior resistência à transferência de massa (Cheah, Heng e Chan, 2010).

A PLE pode ser realizada no modo estático, no modo dinâmico ou pela combinação desses modos (Vazquez-Roig e Picó, 2015). O modo estático é um processo batelada constituído de um ou mais ciclos de extração com adição de solvente novo a cada ciclo. O extrator é pressurizado através da entrada de solvente enquanto que a válvula de saída é mantida fechada. Após a extração, a válvula é aberta, liberando a mistura de solvente e extrato a ser coletada (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

No modo dinâmico, o solvente é bombeado continuamente no extrator contendo a matriz, normalmente sob um fluxo de  $0,5 - 2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (Vazquez-Roig e Picó, 2015), enquanto que a válvula de saída é mantida aberta durante a extração (Osorio-Tobón e Meireles, 2013). O equilíbrio é completamente deslocado devido à injeção contínua de solvente novo através da amostra, acelerando a taxa de transferência de massa (Vazquez-Roig e Picó, 2015). Porém, o modo dinâmico requer maiores volumes de solvente do que no modo estático, diluindo ainda mais a concentração do extrato, exigindo uma etapa de concentração do composto alvo (Vazquez-Roig e Picó, 2015).

A cinética do processo de extração com líquido pressurizado é caracterizada por uma curva de extração global com três estágios distintos, semelhante à curva de extração obtida na extração supercrítica (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

A PLE é realizada em um reator fechado, na ausência de luz e oxigênio, o que reduz a degradação oxidativa de compostos sensíveis à degradação por oxidação (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

Vários solventes orgânicos são usados para extração de compostos bioativos de alimentos e ervas utilizando-se de líquidos pressurizados (Mustafa e Turner, 2011). A escolha do solvente deve levar em consideração os aspectos econômicos, de segurança e sustentáveis, solventes menos tóxicos, mais seguros e de fácil recuperação devem ser preferidos (Mustafa e Turner, 2011).

A desvantagem desse método de extração está relacionada às elevadas temperaturas, que podem levar a degradação do analito, principalmente quando combinadas com longos períodos de extração (Vazquez-Roig e Picó, 2015; Wang e Weller, 2006).

### **3.5. Modelagem matemática**

As curvas cinéticas de extração podem ser estudadas empregando-se modelos matemáticos. Esses modelos permitem prever o comportamento do processo de extração em condições diferentes daquelas experimentadas, dentro de faixas delimitadas pelo modelo, fornecendo dados importantes para projetar unidades industriais, tais como dimensões dos equipamentos, fluxo de solvente e tamanho de partículas da matriz, contribuindo na avaliação da viabilidade econômica deste processo (Brum, 2010; Filippis, 2001; Mezzomo, Martínez e Ferreira, 2009; Reis, 2013; Santos *et al.*, 2016).

Existem três tipos de abordagem matemática que descrevem as curvas de extração supercrítica: empírica, baseadas em analogia entre transferência de calor e massa; e aquelas por balanço de massa diferencial (Reverchon e Marco, 2006). Os modelos empíricos, formulados a partir de dados experimentais, podem ser usados quando faltam informações relacionadas ao mecanismo que rege o fenômeno de transferência de massa e equilíbrio (Filippis, 2001). Esses modelos geralmente envolvem parâmetros ajustáveis que podem não permitir uma interpretação física. Apesar disso, os modelos empíricos podem ser muito úteis para certas aplicações industriais ou para simplificar o estudo de sistemas complexos, difíceis de formular e/ou resolver por modelos fenomenológicos (Blasco *et al.*, 2006).

Modelos baseados em balanços de massa levam em consideração a existência de duas fases: uma sólida, composta da matriz vegetal, de onde se busca extrair os compostos de interesse; e uma fluida, composta do solvente supercrítico mais o extrato dissolvido nele (Brunner, 1994).

Dentre os inúmeros modelos de transferência de massa empregados para modelagem de curvas de extração de óleos voláteis com CO<sub>2</sub> supercrítico, foi selecionado o modelo baseado em balanço de massa diferencial: o modelo de Sovová (1994)

### 3.5.1. Modelo de Sovová

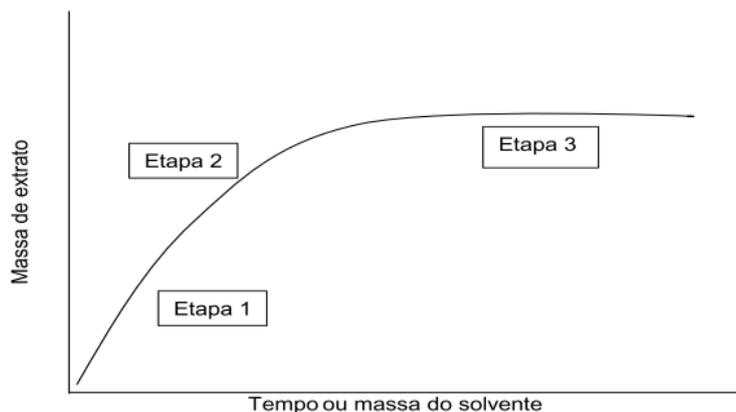
Sovová (1994) desenvolveu um modelo para extração com fluidos supercríticos de óleos de sementes, onde pressupôs que parte das células vegetais que contêm o soluto é rompida durante a moagem. O soluto facilmente acessível das células trituradas é extraído primeiro, e a fração mais protegida pelas paredes celulares é extraída mais lentamente.

A vantagem deste modelo é que ele pode ser aplicado em qualquer tipo de matriz vegetal contendo diferentes tipos de solutos, lipídios ou óleos essenciais (Nascimento, 2017; Santos, 2012).

O modelo descrito por Sovová (1994) se baseia em balanços de massa na condição em que o solvente escoar axialmente com velocidade superficial  $U$  através do leito de material vegetal moído em um extrator cilíndrico. As considerações do modelo são:

- Na entrada do extrator o solvente é livre de soluto;
- A temperatura e a pressão são constantes ao longo do extrator;
- O leito sólido é homogêneo em relação ao tamanho das partículas e distribuição inicial do soluto;
- O soluto está presente nas células vegetais e protegido pelas paredes celulares;
- As transferências de massa devido à dispersão axial e radial são negligenciáveis;
- Existem duas resistências à transferência de massa durante a extração com fluido supercrítico: difusivo e convectivo;

As curvas de extração obtidas em processos com fluidos supercríticos são divididas em três períodos, conforme Figura 12, controlados por diferentes mecanismos de transferência de massa (Campos *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 1999; Ferreira e Meireles, 2002; Mezzomo, Martínez e Ferreira, 2009; Piantino *et al.*, 2008; Reis, 2013).



**Figura 12. Curva global de extração típica obtida em processos com fluidos supercríticos com as três etapas do processo**  
 Fonte: Reis (2013)

**Etapa 1** – Taxa de extração constante (CER, do inglês: *constant extraction rate*): Neste período há grandes quantidades de compostos disponíveis para extração, as superfícies externas das partículas estão completamente cobertas com soluto (mais acessível ao solvente) devido à ruptura das paredes celulares com a trituração, isto permite uma rápida remoção dos compostos adsorvidos na matriz. A convecção na fase fluida é o mecanismo de transferência de massa dominante (Brum, 2010; Brunner, 1994; Ferreira *et al.*, 1999; Mezzomo, Martínez e Ferreira, 2009; Piantino *et al.*, 2008; Reis, 2013).  $t_{CER}$  é o tempo final da etapa de taxa de extração constante;

**Etapa 2** – Taxa de extração decrescente (FER, do inglês: *falling extraction rate*): No período intermediário a quantidade de soluto disponível na superfície das partículas diminui e parte do soluto de dentro das partículas começa a se difundir para a superfície, iniciando o mecanismo de difusão combinado com a convecção (Brum, 2010; Campos *et al.*, 2005; Mezzomo, Martínez e Ferreira, 2009; Piantino *et al.*, 2008; Reis, 2013).  $t_{FER}$  é o tempo final da etapa de taxa de extração decrescente.

**Etapa 3** – Período controlado pela difusão no sólido (DCP, do inglês: *Diffusion-controlled period*): A taxa de extração diminui quase inteiramente, a transferência de massa ocorre principalmente por difusão do interior das partículas da matriz sólida (remoção do soluto da parte interna da partícula sólida) (Ferreira *et al.*, 1999; Ferreira e Meireles, 2002; Mezzomo, Martínez e Ferreira, 2009; Reis, 2013; Santos, 2012).

A massa de óleo contida inicialmente na fase sólida (O) pode ser dividida em duas partes: uma na qual o óleo é de fácil acesso ao solvente representado por (P) e outra na qual o óleo é de difícil acesso denotado por (K), a qual se encontra no interior das partículas da fase sólida e se relacionam de acordo com a Equação (1):

$$O = P + K \quad (1)$$

Em que:

O: massa de soluto inicial;

P: massa de soluto facilmente acessível;

K: massa de soluto de difícil acesso, depositado no interior do sólido;

A massa de sólido inerte é denotada por (N) e permanece constante durante a extração. A concentração de soluto na fase sólida é dada pela Equação (2):

$$\frac{O}{N} = \frac{P}{N} + \frac{K}{N} = x_O = x_P + x_K \quad (2)$$

Em que:

N: massa de sólido livre de soluto;

$x_O$ : concentração inicial de soluto;

$x_P$ : concentração inicial de soluto de fácil acesso;

$x_K$ : concentração inicial de soluto de difícil acesso;

O modelo de Sovová (1994) emprega o coeficiente de transferência de massa na fase fluida para descrever a primeira etapa da extração, período de taxa de extração constante (CER), e o coeficiente de transferência de massa na fase sólida para descrever a etapa na qual a resistência à transferência de massa é controlada pela difusão, em que o óleo é de difícil acesso (Benelli *et al.*, 2010).

Sendo assim, a característica do modelo é computar as contribuições de cada etapa em termos de quantidade de óleo (Campos *et al.*, 2005). Esta diferença se reflete no termo  $J(x,y)$  do balanço de massa, que representa o fluxo de transferência de massa interfacial (Reis, 2013).

$$\text{Fase sólida: } -\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (3)$$

$$\text{Fase fluida: } \rho_f \cdot \varepsilon \cdot \frac{\partial y}{\partial t} + \rho_f \cdot U \cdot \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y) \quad (4)$$

Em que:

$\rho_s$ : densidade da fase sólida ( $\text{g}_{\text{sólido}} \cdot \text{cm}^{-3}$ );

$\varepsilon$ : porosidade do leito

x: razão mássica de soluto (concentração) na fase sólida ( $\text{g}_{\text{óleo}} \cdot \text{g}_{\text{sólido}}^{-1}$ );

t: tempo (s);

$J(x,y)$ : taxa de transferência de massa interfacial ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ );

y: razão mássica de soluto (concentração) na fase fluida ( $\text{g}_{\text{óleo}} \cdot \text{g}_{\text{solvente}}^{-1}$ );

$\rho_f$ : densidade da fase fluida ( $\text{g}_{\text{solvente}} \cdot \text{cm}^{-3}$ );

$U$ : velocidade superficial do solvente ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ );

$h$ : distância axial ao longo do leito (cm);

Como citado anteriormente, o modelo de Sovová desconsidera os termos de transferência de massa por dispersão, tanto na fase sólida quanto fluida. Sovová ainda considera como desprezível o primeiro termo da Equação (4), pois todos estes fenômenos são desprezíveis quando comparados à transferência de massa por convecção. Assim, as equações de balanço de massa para as duas fases (sólido e solvente) são dadas pelas Equações (5) e (6):

$$\text{Fase sólida: } \frac{\partial x}{\partial t} = - \frac{J(x,y)}{\rho_s(1-\varepsilon)} \quad (5)$$

$$\text{Fase fluida: } U \frac{\partial y}{\partial h} = \frac{J(x,y)}{\rho_f} \quad (6)$$

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

$$x(h, t = 0) = x_0 \quad \text{C. I.}$$

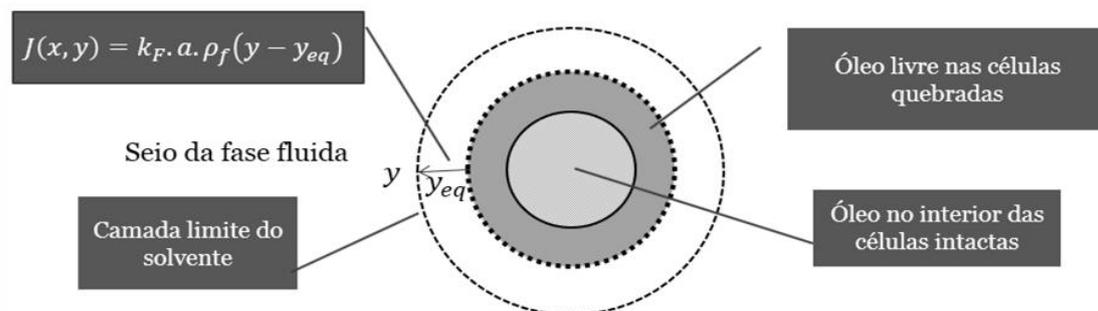
$$y(h = 0, t) = 0 \quad \text{C. C.}$$

Em que:

$x_0$ : razão mássica inicial de soluto na fase sólida ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ );

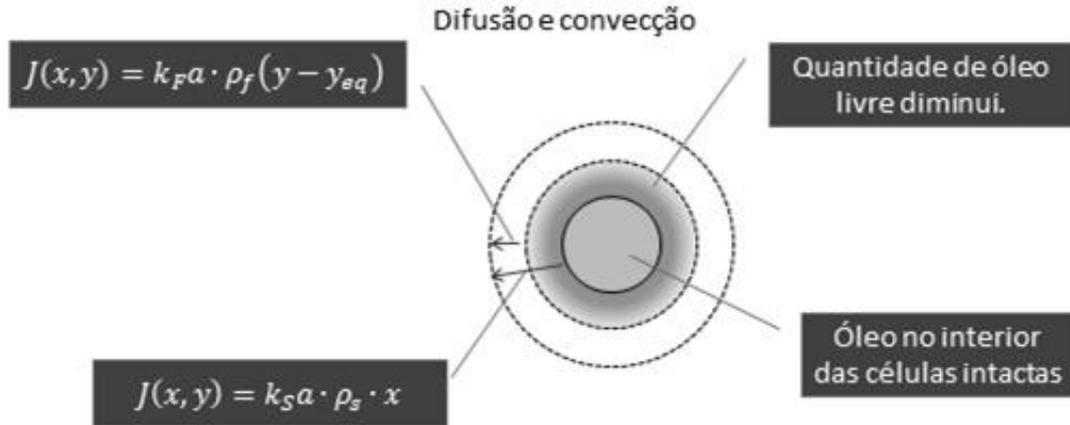
A equação matemática que define a taxa de extração é dividida em duas expressões de acordo com o mecanismo que controla o processo de transferência de massa, representada pelas Equações (7) e (8).

Inicialmente o soluto facilmente acessível pelo solvente é extraído, neste caso a etapa limitante do processo é a resistência do filme externo isto é, a difusão do soluto da superfície da matriz sólida até o seio da fase fluida, representada pela Figura 13 e utiliza-se a Equação (8).



**Figura 13. Representação da convecção do soluto da superfície da matriz sólida até o seio da fase fluida**

Posteriormente, após o término da primeira fase de extração, observa-se um decréscimo da taxa de extração e o mecanismo que passa a controlar a transferência de massa é a difusão do óleo no interior do sólido, conforme representado pela Figura 14, neste caso, usa-se a Equação (7).



**Figura 14. Representação da convecção na fase fluida e difusão na fase sólida**

$$J(x, y) = \begin{cases} k_S a \cdot x & x < r \text{ (fase sólida)} \quad (7) \\ k_F a \cdot (y - y_{eq}) & x > r \text{ (fase fluida)} \quad (8) \end{cases}$$

Em que:

$k_F a$ : coeficiente volumétrico de transferência de massa no filme externo ( $\text{min}^{-1}$ );

$k_S a$ : coeficiente volumétrico de transferência de massa no sólido ( $\text{min}^{-1}$ );

$r$ : fração de óleo disponível de difícil acesso ao solvente;

A solução analítica do modelo Sovová é formada por três equações distintas, correspondentes aos diferentes mecanismos que controlam a transferência de massa.

Para  $t < t_{\text{CER}}$ , tem-se que:

$$m_{\text{óleo}} = \dot{m}_f \cdot S_b \cdot t [1 - \exp(-Z)] \quad (9)$$

Em que:

$t_{\text{CER}}$ : tempo em que o óleo de fácil acesso na entrada da coluna se esgota (min);

$m_{\text{óleo}}$ : massa de óleo extraída;

$\dot{m}_f$ : vazão mássica do solvente ( $\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ );

$S_b$ : solubilidade de óleo ( $\text{g}_{\text{óleo}} \cdot \text{g}_{\text{solvente}}^{-1}$ );

$Z$ : parâmetro ajustável do modelo de Sovová referente à transferência de massa na fase fluida;

Pode-se dizer que a quantidade  $Z$ , apresentada na Equação (9), é um parâmetro para a etapa CER porque essa quantidade ( $Z$ ) é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa na fase fluida ( $k_F a$ ) e este coeficiente controla a taxa de extração no período CER.

Para  $t_{CER} \leq t \leq t_{FER}$ , tem-se que:

$$m_{\acute{o}leo} = \dot{m}_f \cdot S_b [t - t_{CER} \exp(Zm(t) - Z)] \quad (10)$$

Para  $t > t_{FER}$ , tem-se que:

$$m_{\acute{o}leo} = m_s \left\{ q_0 - \frac{S_b}{W} \ln[1 + (A - 1)Br] \right\} \quad (11)$$

Em que:

$t_{FER}$ : tempo em que esgota o óleo de fácil acesso na saída da coluna (min);

$m_s$ : massa de sólido isenta de óleo (g);

$q_0$ : concentração inicial do óleo na matriz sólida ( $g_{\acute{o}leo} \cdot g_{s\acute{o}lido}^{-1}$ );

$r$ : fração de óleo de difícil acesso.

As variáveis para estas equações são propostas pelas Equações a seguir:

$$A = \exp\left(\frac{W \cdot q_0}{S_b}\right) \quad (12)$$

$$B = \exp\left(\frac{W \cdot \dot{m}_f}{m_s}\right) (t_{CER} - t) \quad (13)$$

$$Z_m(t) = \frac{Z \cdot S_b}{W \cdot q_0} \ln\left\{\frac{1}{1-r}(B-r)\right\} \quad (14)$$

$$Z = \frac{k_F a \cdot m_s \cdot \rho_f}{\dot{m}_f (1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (15)$$

$$W = \frac{m_s \cdot k_{Sa}}{m_f (1 - \varepsilon)} \quad (16)$$

$$t_{CER} = \frac{(1-r)m_s \cdot q_0}{S_b \cdot Z \cdot \dot{m}_f} \quad (17)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_s}{W \cdot \dot{m}_f} \ln[r + (1-r)A] \quad (18)$$

Em que:

$\rho_f$ : densidade do solvente ( $g \cdot cm^{-3}$ );

$\rho_{leito}$ : densidade do leito ( $g_{s\acute{o}lido} \cdot cm^{-3}$ );

No modelo de Sovová, o parâmetro  $r$  representa a fração de óleo dificilmente disponível e depende do processo de preparação da matéria-prima, como moagem e peneiramento. O valor deste parâmetro foi considerado constante para conferir a ele

significado físico, visto que o procedimento de pré-tratamento foi o mesmo para todo o material, e independe das condições de extração. No ajuste deste parâmetro utilizou-se o método “golden search”, com a seguinte função objetivo:

$$F = \sum_{i=1}^{n\_exp} \sum_{j=1}^N (m_{\acute{o}leo,i,j}^{Calc} - m_{\acute{o}leo,i,j}^{Exp}) \quad (19)$$

Em que:

$m_{\acute{o}leo,i,j}^{Calc}$ : massa de óleo extraída obtida pelo modelo matemático;

$m_{\acute{o}leo,i,j}^{Exp}$ : massa de óleo obtida experimentalmente;

$n\_exp$ : o número experimentos;

$N$ : número de pontos da curva cinética experimental.

Os parâmetros adimensionais  $e$ , que estão relacionados aos coeficientes de transferência de massa no filme externo e no sólido, respectivamente, foram determinados com o emprego do método de otimização multivariável Simplex Down-Hill a partir da minimização da função objetivo dada pela Equação (20).

$$F = \sum_{j=1}^{n\_exp} (m_{\acute{o}leo,j}^{Calc} - m_{\acute{o}leo,j}^{Exp})^2 \quad (20)$$

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é uma medida da proporção da variabilidade em uma variável que é explicada pela variabilidade da outra e foi calculado de acordo com a Equação (21):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{j=1}^n (m_{\acute{o}leo,j}^{Exp} - m_{\acute{o}leo,j}^{Calc})^2}{\sum_{j=1}^n (m_{\acute{o}leo,j}^{Exp} - \bar{m}_{\acute{o}leo,j})^2} \quad (21)$$

### 3.6. Considerações parciais

A revisão da literatura apresentou as características pata de vaca (*Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa*), cujas folhas são muito utilizadas na medicina popular principalmente para tratamento de diabetes. As prospecções fitoquímicas de extratos de folhas de *B. forficata* já indicaram a presença de uma gama de composto bioativos, dentre os quais se destacam os flavonoides. Estudos já comprovaram a ação hipoglicemiante, antioxidante e antibacteriana destes metabólitos secundários, o que incentiva a otimização de extratos contendo altos tores destes compostos.

Aspectos como qualidade e composição de extratos naturais estão fundamentalmente relacionados à técnica de extração empregada na preparação destes extratos, e influenciam diretamente a atividade farmacológica do produto obtido.

Apesar das características dos extratos das folhas de *B. forficata*, que apresentam compostos bioativos com possíveis aplicações na indústria farmacêutica, não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliaram métodos não-convencionais de extração, tais como líquido pressurizado e com dióxido de carbono supercrítico, bem como a adição de cossolventes na extração. Na literatura são encontrados apenas dados sobre extração das folhas de pata de vaca utilizando percolação (Cunha *et al.*, 2010; Farias e Mendez, 2014; Miceli *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2006; Sayago *et al.*, 2013; Simões e Almeida, 2015), agitação (Ferrerres *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2012; Souza, Bott e Oliveira, 2007; Souza, 2003), decocção (Khalil, Pepato e Brunetti, 2008; Pepato *et al.*, 2002), maceração (Ferrerres *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014; Sousa, De Sousa *et al.*, 2004; Souza, Bott e Oliveira, 2007; Souza, 2003) e hidrodestilação (Duarte-Almeida, Negri e Salatino, 2004; Sartorilli e Correa, 2007). Embora a técnica de ultrassom tenha sido utilizada na extração das folhas de *B. forficata* por Ferrerres *et al.* (2012), Souza, Bott e Oliveira (2007) e Souza (2003), eles utilizaram o ultrassom de banho com soluções metanólicas ou etanólicas como solvente, sem avaliar os efeitos da potência, temperatura e proporção de massa e solvente. Não foram encontrados na literatura extrações das folhas de *B. forficata* utilizando acetato de etila, *n*-hexano e nem CO<sub>2</sub> como solvente.

A extração de compostos bioativos por tecnologias não convencionais, tais como CO<sub>2</sub> supercrítico, cossolventes, líquidos pressurizados e solvente assistido por ultrassom tem se mostrado atrativa em relação aos métodos convencionais. A técnica de extração supercrítica é considerada limpa, uma vez que o solvente é removido do extrato ao despressurizar o sistema. A adição de cossolvente torna a extração supercrítica ainda mais vantajosa, devido aos maiores rendimentos e mudanças na seletividade. A pressurização de solvente líquido e a utilização do ultrassom são vantajosas devido à redução no tempo de extração e no consumo de solvente, com obtenção de elevados rendimentos. Dessa forma, este trabalho visou avaliar métodos não convencionais de extração das folhas de pata de vaca (extração supercrítica com CO<sub>2</sub> puro e com adição de etanol como cossolvente, líquidos pressurizados e solventes assistido por ultrassom), assim como caracterizar os extratos obtidos.

Aspectos relacionados com a cinética de extração, assim como a composição química dos extratos são extremamente importantes para melhorar a compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de extração com fluidos pressurizados. A avaliação das curvas globais de extração por meio de modelos cinéticos é de suma importância, especialmente para estabelecer as condições ótimas, determinando parâmetros utilizados para aumento de escala e assegurar a viabilidade técnica e econômica de processos de extração por SFE em escala industrial.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes

Nas extrações foram utilizados os seguintes solventes: dióxido de carbono de alta pureza >99,9 % (White Martins) nas extrações supercríticas; álcool etílico 95% P.A. (Neon), acetato de etila 99,5% (Neon) e *n*-hexano (98,5%, Synth), nas extrações convencionais em Soxhlet e maceração, com líquido pressurizado e assistidas por ultrassom.

Os reagentes utilizados na análise de fenólicos totais foram: ácido gálico (Vetec), reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica), carbonato de sódio (Anidrol). Para análise da capacidade antioxidante foram utilizados: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Sigma Aldrich), Trolox® (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) (Sigma Aldrich), TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina), (Sigma Aldrich), cloreto férrico anidro (Neon). Para a determinação do teor de flavonoides totais foram utilizados: cloreto de alumínio hexa-hidratado (Neon), nitrito de sódio (F. Maia), hidróxido de sódio (Neon) e quercetina grau HPLC (Sigma).

A análise por cromatografia gasosa (CG-MS) foi realizada com gás hélio 99,9999% (White Martins) e a solubilização foi feita com etanol 99,8% PA (Neon).

### 4.2. Matéria prima

As folhas foram coletadas em propriedades rurais no município de São Jorge D'Oeste – PR, coordenadas 25°37'22" S, 52°58'13" O, nos meses de junho e julho de 2017.

A planta foi identificada pela especialista Lívia Godinho Temponi no herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – HERBÁRIO UNOP em Cascavel – PR como sendo *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* (Vogel) Fortunato & Wunderlin, sob o número de registro UNOP 9119.

As folhas foram secas à sombra e temperatura ambiente ( $25 \pm 5$  °C) por 7 dias. Estas folhas foram trituradas em um liquidificador doméstico (Mondial, Conceição do Jacupê, Bahia, Brasil).

As folhas moídas foram secas novamente em estufa com circulação de ar (40 °C) por 48 horas (Modelo TE-394/3 – Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) para diminuir

ainda mais a umidade, que estava fora da faixa recomendada para armazenamento, e então armazenadas a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o processo de extração.

#### 4.2.1. Determinação da umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com AOAC (2012), em triplicata, sendo que aproximadamente 5 gramas de folhas, pesados em balança analítica (Shimadzu – AUW220D, Minas Gerais, Brasil), foram acondicionados em placa de Petri devidamente tarada e levados a estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Depois de retirados da estufa foram transferidos para dessecador contendo sílica gel para resfriamento até temperatura ambiente e depois sendo pesados novamente. O percentual de umidade foi obtido de acordo com a Equação (22):

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{Mu - Ms}{Ms} \times 100 \quad (22)$$

Em que:

$Mu$ : massa da amostra úmida;

$Ms$ : massa da amostra depois de 24 horas em estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.2. Análise Granulométrica

Para a separação e classificação granulométrica das folhas moídas, utilizou-se uma série de Peneiras Tyler com aberturas de: 16, 28, 35, 48 e 60 mesh (Bertel, Caieiras, São Paulo, Brasil) com agitação vertical vibratória (Bertel) durante 15 minutos. As frações retidas nas peneiras 28, 35 e 48 foram usadas nos experimentos. A massa das frações retidas em cada peneira foi determinada e o diâmetro médio de partículas foi calculado de acordo com as Equações (23) e (24), propostas por Gomide (1983).

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i}{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i^3}} \quad (23)$$

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad (24)$$

Em que:

$\bar{d}_s$ : diâmetro médio superficial dos fragmentos (mm);

$m_i$ : massa de amostra retida na peneira  $i$  (g);

$m_t$ : massa total de amostra (g);

$\bar{d}_i$ : diâmetro médio das partículas que passaram pela peneira  $i$  (mm);

$n$ : número total de frações

#### 4.2.3. Massa específica real das folhas ( $\rho_s$ )

A determinação da massa específica real das folhas de *B. forficata*,  $\rho_s$ , foi realizada pela técnica de picnometria em gás hélio, utilizando-se o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos com o uso do equipamento da Micromeritics®, modelo AccuPyc II 1340, no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC da Faculdade de Engenharia Química, Unicamp. O resultado final de massa específica real foi obtido pela média de 10 determinações.

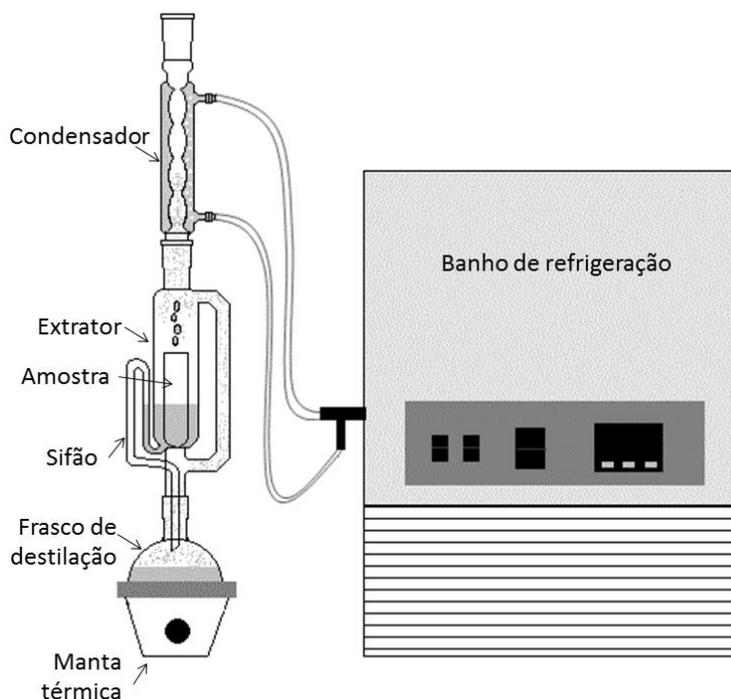
### 4.3. Métodos de extração

Neste trabalho foram avaliados vários métodos de extração, entre eles os métodos convencionais: Soxhlet e maceração e os métodos não-convencionais: extração supercrítica com e sem adição de cossolventes, assistida por ultrassom e com líquido pressurizado.

#### 4.3.1. Extração convencional – Soxhlet

As extrações convencionais das folhas de pata de vaca foram realizadas no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação (LPBS/PPG-EQ/UNIOESTE) na Universidade Estadual do Oeste do Paraná utilizando conjunto Soxhlet (Laborglass) de acordo com a metodologia proposta por Santos *et al.* (2017). Aproximadamente 10 g de folhas foram envolvidos em papel filtro (Melitta nº 102) e inseridos em um extrator Soxhlet. Foram realizadas extrações por um período de 360 minutos com 250 mL dos solventes orgânicos *n*-hexano, etanol e acetato de etila. Estes solventes foram escolhidos devido às diferenças de polaridade. A ebulição do solvente no balão volumétrico foi mantida com o auxílio de uma manta de aquecimento (WEA-500 mL). O condensador foi conectado a um banho termostático (Marconi, modelo MA- 184) com a temperatura mantida a 5 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A Figura 15 apresenta uma forma esquemática do Soxhlet utilizado na extração das folhas de pata de vaca.



**Figura 15. Esquema de montagem utilizando aparato Soxhlet, aquecido por uma manta térmica e acoplado a um condensador que é resfriado por um banho de refrigeração**

Ao final da extração, o solvente foi removido do extrato utilizando estufa a 60 °C por 24 horas. As massas dos extratos secos obtidos foram determinados em balança analítica e armazenados em frascos âmbar a -4 °C . Com a massa de extrato seco foi calculado o rendimento utilizando a Equação (25):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (25)$$

Em que:

$m_{\text{extrato}}$ : representa a massa de extrato obtido após a evaporação do solvente;

$m_{\text{amostra}}$ : representa a massa seca das folhas de pata de vaca.

O rendimento de uma extração demonstra a eficiência do solvente e da técnica em extrair componentes específicos do material original. O rendimento é apresentado em % e foi determinado para cada técnica testada.

#### 4.3.2. Extração convencional – Maceração

O método de maceração foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Guindani *et al.* (2016). Em erlenmeyer de 50 mL, 3,33 g de folhas (massa seca)

foram imersas em 50 mL de solvente. Com o auxílio de papel filme foi feita uma vedação no erlenmeyer, finalizando o encobrimento com papel alumínio. A extração foi à temperatura ambiente ( $25 \pm 5$  °C) durante 5 dias (7200 min), com agitação diária manual por 2 min. Após o tempo de maceração, uma filtração à vácuo com papel filtro foi realizada, os solventes foram removidos usando o evaporador rotativo a vácuo (a 50 °C). A massa de extrato foi determinada e eles foram armazenados em freezer a -4 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.3.3. Extração com líquido pressurizado (PLE)

As extrações com líquido pressurizado, em modo contínuo, foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Santos *et al.* (2019) com pequenas modificações. Foi utilizada uma unidade experimental no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de separação da Unioeste (LPBS/PPG-EQ/UNIOESTE), constituída basicamente de um reservatório do solvente, uma bomba de líquido de alta pressão (Waters, modelo 515), uma coluna de aço inox de 14,4 cm<sup>3</sup> (7,8 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento), aquecida por resistências elétricas, e uma válvula de controle de pressão no final do extrator.

Em cada extração, o extrator foi preenchido com aproximadamente 2,5 gramas de folhas trituradas de *B. forficata* para formar o leito, suportado por um filtro de aço inox com diâmetro de poro de 2 µm para evitar a passagem das partículas. Os experimentos foram realizados em três temperaturas diferentes (40, 50 e 60 °C) e pressão constante de 100 bar. Os solventes (*n*-hexano, acetato de etila e etanol) foram bombeados por uma bomba tipo HPLC para o extrator à uma vazão volumétrica de 2 mL.min<sup>-1</sup> e, imediatamente após o sistema atingir a pressão de 100 bar, a válvula de controle de pressão foi aberta para coleta da amostra.

Os extratos foram recolhidos em frascos âmbar durante 40 minutos de extração (cronometrado após a abertura da válvula de saída da amostra) e, após remoção do solvente residual, o rendimento da extração foi determinado. As curvas cinéticas de extração foram determinadas nas três temperaturas (40, 50 e 60 °C), para isso, a massa das amostras extraídas foram determinadas em intervalos de tempo previamente determinados. Os experimentos foram realizados em duplicata.

#### 4.3.4. Extração com solventes assistida por ultrassom (UAE)

As extrações assistidas por ultrassom foram realizadas no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação (LPBS/PPG-EQ/UNIOESTE) na Universidade Estadual do Oeste do Paraná de acordo com o procedimento descrito por Dias *et al.* (2017). O aparato experimental é constituído de um ultrassom (Sonics, VCX 750, Newtown – CT, EUA), equipado com uma ponteira de titânio de 13 mm de diâmetro, um reator encamisado de vidro com capacidade de 250 mL, conectado a um banho termostático (Marconi, MA-184/BB, Piracicaba – SP, Brasil) para controle da temperatura de extração. A potência nominal do equipamento é de 750 W, podendo ajustada de 20 a 99 % do total, com frequência fixa de 20 kHz. O aparelho de ultrassom do tipo sonda foi imerso aproximadamente 10 mm na solução.

#### *Avaliação da potência ultrassônica real*

A medida da potencia ultrassônica efetiva transferida para o meio foi baseada em calorimetria, de acordo com o procedimento descrito por González-Centeno *et al.* (2015). A temperatura exata do solvente foi determinada e registrada a cada segundo durante 5 minutos de aplicação de ultrassom utilizando um termômetro Omega HH376 ligado a um computador usando o Software SE376 RTD Thermometer, versão 4.1.0.0. O aumento da temperatura, devido à dissipação das ondas acústicas, foi usado para calcular a potencia ultrassônica efetiva aplicada (P), conforme expresso na Equação (26).

$$P(W) = m \cdot Cp \cdot \frac{dT}{dt} \quad (26)$$

Em que m (kg) é a massa de solvente; Cp (J·kg<sup>-1</sup>·°C<sup>-1</sup>) é a capacidade calorífica específica do solvente (água, 4200 J·kg<sup>-1</sup>·°C<sup>-1</sup>), e dT/dt, é a inclinação da curva temperatura-tempo. A medida da potencia ultrassônica foi medida em triplicata para cada percentagem de potência testada.

#### *Escolha do solvente para extração*

Foram realizados testes prévios com solventes de diferentes polaridades (etanol, acetato de etila e *n*-hexano) utilizando 50% da potência e 50 °C. Aproximadamente 3,33 gramas de folhas secas foram colocados em contato com 50 mL de solvente, resultando

numa relação de  $15 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ . A mistura (amostra + solvente) foi exposta as ondas sonoras de alta potência emitidas pelo ultrassom, por um período de 15 minutos.

Após a extração, os extratos foram filtrados em papel filtro utilizando vácuo e levados à estufa (a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para completa evaporação do solvente por 24 horas. A evaporação transcorreu até massa residual constante, a qual foi verificada e utilizada no cálculo do rendimento. Os extratos secos foram armazenados em freezer a  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para cada extrato foram realizadas análises de determinação da atividade antioxidante, do teor de flavonoides totais e composição química por cromatografia gasosa acoplada à espectro de massas. A partir destes resultados foi selecionado um solvente para realizar novos testes com o objetivo de otimizar as condições de extração das folhas assistida por ultrassom.

#### *Cinética da extração assistida por ultrassom*

A duração das extrações assistidas por ultrassom foi determinada pela análise da curva global de extração obtida. O experimento foi realizado com o solvente escolhido, a 50% da potência,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , e com uma relação volume solvente e massa de folha de  $15 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , onde as amostras de extratos foram coletadas em 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos.

#### *Planejamento Experimental*

Empregou-se um planejamento experimental Box-Behnken com três fatores e três níveis, num total de 15 experimentos, com triplicata no ponto central para avaliar o erro experimental. As três variáveis estudadas foram temperatura, percentagem da potência e razão volume de solvente/massa de folha, variando a massa de folhas e mantendo constante o volume de solvente. Os valores naturais e codificados dos fatores estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3. Valores experimentais e codificados dos níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento Box-Behnken**

Notação	Fator	Níveis dos fatores		
		Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)
$X_1$	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	40	50	60
$X_2$	Potência (%)	20	50	80
	Potência (W)	$11,66\pm 0,10$	$31,82\pm 0,97$	$48,87\pm 0,47$
$X_3$	Razão solvente/folha ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )	10	15	20
	Massa de folhas (g)	5,00	3,33	2,50

A Tabela 3 também apresenta a potência ultrassônica real obtida experimentalmente. Esses efeitos foram avaliados com base no rendimento global, teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante dos extratos. O período de extração foi baseado no perfil cinético.

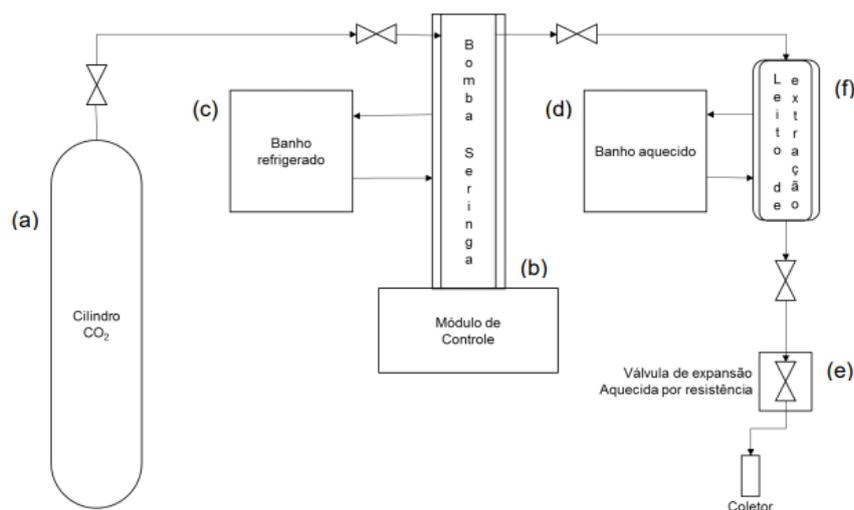
Este planejamento permite a construção de um modelo polinomial de segunda ordem para caracterizar ou otimizar um processo com um menor número de experimentos. O modelo resultante tem a forma da Equação (27):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (27)$$

Em que  $y$  é a variável resposta a ser otimizada (rendimento, teor de fenólicos, teor de flavonoides, DPPH e FRAP)  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  correspondem aos fatores independentes codificados,  $\beta_0$  é a constante do modelo e  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ , e  $\beta_{ij}$  são coeficientes lineares, quadráticos e de interação do modelo, respectivamente. Os coeficientes do modelo são úteis para predizer os resultados de condições operacionais não testadas, porém eles são empíricos e não podem não ter significado físico ou químico (Albuquerque *et al.*, 2017; Heleno *et al.*, 2016). Quanto maior o valor absoluto de um coeficiente, mais importante a influência deste fator (Heleno *et al.*, 2016).

#### 4.3.5. Extração com dióxido de carbono supercrítico (SFE)

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação (LPBS/PPG-EQ/UNIOESTE) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná de acordo com a metodologia descrita por Klein *et al.* (2018) com algumas modificações. O módulo experimental para a realização das extrações utilizando fluido supercrítico é constituído pelos seguintes itens: reservatório para o solvente, uma bomba seringa (Isco, Modelo 500D, Lincoln, Nebraska, EUA), e dois banhos termostáticos. O primeiro (Julabo, modelo FP-50, Seelbach, Alemanha) é utilizado para resfriar o solvente antes de entrar na bomba seringa e o segundo (Marconi, modelo MA- 159/BD, Piracicaba, São Paulo, Brasil) para manter o extrator aquecido na temperatura desejada, conforme ilustrado na Figura 16.



**Figura 16. Representação do módulo de extração supercrítica. (a) Cilindro de CO<sub>2</sub>; (b) bomba seringa do CO<sub>2</sub>; (c) banho de refrigeração da bomba seringa; (d) banho termostático do leito de extração; (e) válvula micrométrica; (f) leito de extração - Adaptado de Klein (2016)**

A vazão de solvente foi controlada pela válvula micrométrica acoplada na saída do extrator. As dimensões da célula de extração, onde o leito empacotado foi formado, são 1,91 cm de diâmetro interno e 16,8 cm de altura, resultando em um volume de aproximadamente 48,2 cm<sup>3</sup>. A célula foi abastecida completamente com as amostras em todos os experimentos (aproximadamente 10,4 gramas).

O solvente foi inicialmente resfriado a 5 °C na bomba seringa para prevenir sua vaporização e pressurizado (em intervalos de pressão de 10 bar) até alcançar a pressão desejada para então ser bombeado para o extrator que já havia estabilizado na temperatura desejada. O sistema foi estabilizado por 30 minutos nas condições de temperatura e pressão desejada antes de se iniciar a extração dinâmica. O tempo de 30 minutos foi escolhido com base em outros trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa (Frohlich *et al.*, 2018; Klein *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2016, 2017).

A vazão volumétrica para o dióxido de carbono foi de aproximadamente 2 mL.min<sup>-1</sup>, esta vazão foi escolhida com base em outros trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa (Frohlich *et al.*, 2018; Klein *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2016, 2017) e foi regulada a partir do ajuste da válvula micrométrica (expansão) na saída do extrator. A bomba seringa tem acoplado um sistema de monitoramento das seguintes variáveis: pressão e volume de solvente gasto. A temperatura na saída do extrator foi mantida a 90 °C pelo termostato (Tholz, modelo MSC-04E). 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 é coletado em um recipiente de vidro âmbar.

O frasco com o extrato foi pesado em balança analítica a cada 10 minutos, até 200 minutos. Com os valores obtidos 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 (25).

A fim de avaliar a influência das condições experimentais pressão e temperatura, foi realizado um planejamento experimental conforme Tabela 4. As condições experimentais foram definidas a partir de limitações operacionais.

**Tabela 4. Planejamento experimental das extrações com fluido supercrítico variando pressão e temperatura (2<sup>o</sup> ponto central)**

Pressão (bar)	Temperatura (°C)
180	40
200	50
220	60

#### *Solubilidade do extrato das folhas de B. forficata no CO<sub>2</sub> supercrítico*

A solubilidade aparente ( $S_b$ ) foi obtida pelo método dinâmico de extração (Ferreira *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016). No início do processo de extração, o soluto fica pressurizado no leito durante 30 minutos, tempo suficiente para que o sistema atinja o equilíbrio e o solvente fique saturado com a fração de extrato facilmente removível de forma que, a concentração na saída seja igual à concentração de equilíbrio. Os dados experimentais de massa total de extrato foram plotados versus a massa de solvente utilizada. As concentrações de equilíbrio (valores de solubilidade) para cada temperatura e pressão foram obtidas utilizando-se os dados da parte linear da curva de extração (CER). Foi feita uma regressão linear para cada condição e a solubilidade foi obtida da inclinação da linha ajustada aos valores experimentais (Ferreira *et al.*, 1999) conforme Equação (28).

$$S_b = \frac{m_{extrato}}{m_{solvente}} \quad (28)$$

Em que:

$S_b$ : solubilidade do extrato no solvente ( $g_{extrato} \cdot g_{solvente}^{-1}$ );

$m_{extrato}$ : massa total de extrato obtida apenas na parte inicial (linear) da curva de extração;

$m_{solvente}$ : massa de solvente gasto apenas na parte inicial (linear) da curva de extração;

### *Densidade do leito*

A densidade do leito de partículas ( $\rho_{leito}$ ) foi determinada pela Equação (29).

$$\rho_{leito} = \frac{m_s}{V_{leito}} \quad (29)$$

Em que:

$m_s$ : massa de inerte, sendo esta a massa de amostra alimentada no reator descontada a massa de extrato obtida (g);

$V_{leito}$ : volume do leito (cm<sup>3</sup>);

### *Porosidade do leito ( $\varepsilon$ )*

Conhecendo os valores de densidade real das folhas e densidade do leito, a porosidade do leito de SFE pode ser determinada através da Equação (30):

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{leito}}{\rho_s} \quad (30)$$

Em que:

$\rho_{leito}$ : densidade do leito;

$\rho_s$ : densidade real das folhas;

#### *4.3.6. Extração com dióxido de carbono supercrítico e cossolvente*

As extrações supercríticas com cossolvente foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Juchen (2019) com algumas modificações, no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação (LPBS/PPG-EQ/UNIOESTE) na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, com o mesmo módulo experimental utilizado para extração supercrítica, ilustrado na Figura 16 do tópico 4.3.5, porém com outra célula de extração, cujas dimensões são 1,8 cm de diâmetro interno e 20 cm de altura, resultando em um volume de aproximadamente 50,87 cm<sup>3</sup>.

A célula foi abastecida completamente com as amostras em todos os experimentos (aproximadamente 12 gramas em massa seca). O etanol foi escolhido como cossolvente com base nos resultados obtidos por Soxhlet, maceração e extração assistida por ultrassom.

Primeiramente as folhas com frações de etanol foram adicionadas ao extrator. A altura do empacotamento do leito foi mantida constante e as relações mássicas de cossolvente e folha (Rm) avaliadas foram: 6 g de etanol para 12 g de folhas (Rm

=0,5:1), 12 g de etanol para 12 g de folhas (Rm =1:1), 18 g de etanol para 12 g de folhas (Rm =1,5:1).

Após este procedimento, o CO<sub>2</sub> foi adicionado no extrator na pressão e temperatura desejada e o período de extração estática (EE) foi iniciado. Foi avaliada a influência desse período analisando 15, 30 e 45 minutos nas condições de extração de 50 °C, 200 bar e Rm=1:1.

Após esse período, iniciou-se a extração dinâmica (ED), ou seja, CO<sub>2</sub> foi injetado no extrator com fluxo constante igual a 2 mL·min<sup>-1</sup> e em tempos pré-determinados amostras foram coletadas na saída do extrator em um recipiente de vidro âmbar.

O período de extração estática foi fixado em 30 minutos, a fim de avaliar o efeito da temperatura, pressão e relação mássica de cossolvente e folha na extração supercrítica com cossolvente, foi realizado um planejamento experimental conforme Tabela 5.

**Tabela 5. Condições experimentais realizadas na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico e etanol como cossolvente (2<sup>3</sup>+ triplicata ponto central)**

<b>Experimento</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Pressão (bar)</b>	<b>Rm (g<sub>etanol</sub>:g<sub>folha</sub>)</b>
1	40	180	0,5:1
2	60	180	0,5:1
3	40	220	0,5:1
4	60	220	0,5:1
5	40	180	1,5:1
6	60	180	1,5:1
7	40	220	1,5:1
8	60	220	1,5:1
9	50	200	1,0:1
10	50	200	1,0:1
11	50	220	1,0:1

Após todo o extrato ser coletado, os frascos foram levados para estufa à temperatura de 60 °C por 24 horas para evaporação do etanol.

#### **4.4. Caracterização dos extratos**

Todos os extratos foram avaliados quanto ao teor de flavonoides e sua atividade antioxidante e alguns dos extratos tiveram sua composição química avaliada, conforme descrito a seguir.

#### 4.4.1. Determinação da composição química dos extratos

As análises para determinação da composição volátil dos extratos das folhas de *B. forficata* obtidos pelos diferentes métodos de extração foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá em Umuarama – PR, sob supervisão da Professora Dr. Camila da Silva, de acordo com a metodologia descrita por Frohlich *et al.* (2018), utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (GC–MS QP2010 SE, Shimadzu, Chiyoda-ku, Tóquio, Japão) com um autoamostrador (Shimadzu AOC–20i).

As amostras foram diluídas em etanol a  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  antes da injeção ( $1 \text{ }\mu\text{L}$ ) em uma coluna SH-RTx-5MS (Shimadzu, 5% fenil–metilsiloxane,  $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$ ). A vazão do gás de arraste hélio foi de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  com injeção split 2:1. A temperatura da coluna foi programada inicialmente para  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , aquecendo até  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  à  $6 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , aumentando até  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  à  $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e até  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  à  $15 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massa com os da livreria NIST - *National Institute of Standards and Technology* (versão 2014). Foi analisado um extrato obtido com cada solvente para cada uma das técnicas de extração. Das extrações assistidas por ultrassom os extratos foram obtidos na condição de 50% da potência,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 15 minutos de extração e razão solvente/folha de  $15 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , das extrações com líquido pressurizado, os extratos analisados foram obtidos na condição de 100 bar  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , das extrações com  $\text{CO}_2$  supercrítico, o extrato analisado foi obtido na condição de 200 bar e  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e o extrato obtido da extração com cossolvente foi obtido na condição de 200 bar,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e Rm: 1:1.

#### 4.4.2. Análise de HPLC-ESI-MS/MS para quantificação da canferitrina

A análise de HPLC-ESI-MS/MS foi realizada na Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos (Toledo – PR), em um equipamento HPLC Waters Alliance ® 2695 acoplado a um analisador de massas sequencial (MS/MS) (Micromass Quattro micro API™, Waldbronn, Alemanha) utilizando metodologia analítica descrita por Ferreres *et al.* (2012). Para identificação e quantificação da canferitrina, 20 mg de extrato foram dissolvidos em 3 mL de etanol (grau HPLC), sonificados por 10 minutos e redissolvidos em água ultrapura ( $500 \text{ }\mu\text{L}:500 \text{ }\mu\text{L}$  (v/v)). Esta mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 1 minuto e então filtrada ( $1 \text{ }\mu\text{m}$  – Chromafil® Xtra GF-100/25). As análises

cromatográficas foram realizadas em uma coluna Zorbax Eclipse XDB C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Agilent, EUA), com volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Foram utilizadas como fase móvel duas soluções: Solução A: água-ácido acético (1%) e Solvente B: metanol, com um fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com eluição em modo gradiente descrito na Tabela 6.

**Tabela 6. Gradiente utilizado na análise de HPLC-ESI-MS/MS**

Tempo (min)	Fase móvel A	Fase móvel B
0	80%	20%
30	50%	50%
35	10%	90%
36	80%	20%
40	80%	80%

O sistema de HPLC foi controlado pelo Software *MassLynx*<sup>TM</sup> v. 4.1 (Waters, Reino Unido). As condições de ionização foram ajustadas a 350 °C e 4,0 kV de temperatura de nebulização e voltagem do capilar, respectivamente. A vazão do gás de nebulização (nitrogênio) foi de 650  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ . A fragmentação induzida por colisão foi realizada usando argônio como gás de colisão, com energia de colisão de 25 eV e voltagem de cone de 50 V. O espectro de massas foi obtido em modo de ionização negativo. Foi analisado um extrato obtido com cada solvente para cada uma das técnicas de extração, com exceção da extração por maceração devido a baixa quantidade de extrato obtido. Das extrações assistidas por ultrassom os extratos foram obtidos na condição de 50% da potência, 50 °C, 15 minutos de extração e razão solvente/folha de 15  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , das extrações com líquido pressurizado, os extratos analisados foram obtidos na condição de 100 bar 50 °C, das extrações com  $\text{CO}_2$  supercrítico, o extrato analisado foi obtido na condição de 200 bar e 50 °C e o extrato obtido da extração com cossolvente foi obtido na condição de 200 bar, 50 °C e Rm: 1:1.

#### 4.4.3. Determinação do teor de flavonoides totais (TFC)

O teor de flavonoides totais (TFC) dos extratos foi determinado pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio descrito por Chang *et al.* (2002). Uma porção (0,5 mL) de solução etanólica (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de extrato foi misturada com 1,5 mL de etanol 95%, 0,1 mL de uma solução de cloreto de alumínio a 10%, 0,1 mL de uma solução 1

mol·L<sup>-1</sup> de acetato de potássio e 2,8 mL de água destilada. As soluções foram encubadas a temperatura ambiente por 30 minutos, as absorvâncias das misturas foram medidas a 415 nm contra o branco (todos os reagentes sem extrato) usando espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão). Quercetina foi utilizada para obter a curva de calibração (0–200 mg·mL<sup>-1</sup>) e os resultados foram expressos em miligramas equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>) por meio da equação da regressão linear (R<sup>2</sup>=0,999).

#### 4.4.4. Determinação do Teor de Fenólicos Totais (TPC) pelo método Folin Ciocalteu

A quantificação de compostos fenólicos nos extratos das folhas de *B. forficata* foi realizada utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A técnica utilizada foi adaptada de Aspé e Fernández (2011). Para a realização do teste, os extratos foram dissolvidos em etanol, a fim de se obter uma concentração de 1,0 mg·mL<sup>-1</sup>. Uma porção (2,5 mL) de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água (10%) foi adicionado a uma alíquota de 0,3 mL de solução de extrato diluída em etanol e 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%). A mistura foi incubada por 5 minutos a 50° C em banho-maria. A absorvância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão). A quantidade total de fenóis de cada extrato foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico com concentrações de 5 a 100 µg·mL<sup>-1</sup>. A partir da curva, foi calculado o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>=0,999). O branco foi obtido substituindo-se o volume de amostra por água, mantendo-se as mesmas quantidades de reagente de Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio. Por meio da correlação com a curva padrão de ácido gálico, determinou-se os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>), através da Equação (31). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

$$TPC \left[ \frac{mg \ EAG}{g_{extrato}} \right] = \frac{EAG \cdot 1000}{D_{ext}} \quad (31)$$

Em que EAG significa equivalente em ácido gálico, obtido através da curva padrão (µg EAG·mL<sup>-1</sup>) e  $D_{ext}$  significa diluição das amostras (mg<sub>extrato</sub>·mL<sup>-1</sup>).

#### 4.4.5. Determinação da atividade antioxidante pelo Método DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo monitoramento de suas habilidades em quelar radicais livres estáveis utilizando o método DPPH de acordo com Barzotto *et al.* (2019) com pequenas modificações. Em um tubo de ensaio, adicionou-se a 3,9 mL da solução etanólica a  $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de DPPH• e uma alíquota de 0,1 mL de solução de extrato diluída em etanol ( $1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). As misturas foram agitadas por 30 segundos e deixadas para reagir por 40 minutos no escuro à temperatura ambiente. A queda na absorvância a 515 nm foi determinada por espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Quioto, Japão), sendo todas as determinações realizadas em triplicata. Foi utilizado álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. A quantificação foi realizada usando uma curva padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) com concentrações de 25 a 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $R^2=0,997$ ).

#### 4.4.6. Determinação da atividade antioxidante pelo Método FRAP – Método de redução do ferro

O ensaio FRAP foi realizado segundo metodologia descrita por Tiveron *et al.* (2012) com modificações. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução etanólica do extrato ( $1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) foi misturada com 3 mL do reagente FRAP (25 mL de tampão acetato a  $0,3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  e pH 3,6 com 2,5 mL de solução de TPTZ  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  em HCl  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min e sua absorvância determinada em espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão) a 593 nm, utilizando como branco o reagente FRAP. Uma curva padrão de sulfato ferroso ( $100\text{--}2000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) foi utilizada para determinação da capacidade antioxidante e os resultados expressos em  $\mu\text{mol EFe}^{2+}$  por  $\text{g}_{\text{extrato}}$  ( $R^2=0,999$ ).

### 4.5. Análises estatísticas

Os resultados obtidos experimentalmente foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Eles foram submetidos à análises de variâncias (ANOVA). Foram realizadas análises estatísticas para detectar diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os resultados pelo teste de Tukey. O teste de correlação de Pearson foi realizado para obter os valores

de correlação ( $r$ ). A qualidade e adequabilidade dos modelos foram verificadas avaliando o coeficiente de determinação  $R^2$ , a falta de ajuste (Faj) e o valor do teste de Fisher (F-valor). A significância estatística do modelo e dos coeficientes de regressão foi estabelecida em  $p < 0,05$ . O software STATISTICA<sup>TM</sup> (versão 8.0, da StatSoft, Inc.) foi utilizado para analisar os dados experimentais a um nível de 95% de confiança. Além disso, foram realizadas análises de superfície de resposta, e determinação do modelo estatístico para a faixa utilizada das variáveis independentes.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Caracterização das folhas

Para a compreensão da cinética de extração, dos fenômenos de transferência de massa e fatores que influenciam nos processos de extração, é necessário a caracterização das partículas.

A umidade das folhas, determinada pelo Método Oficial de Análises (AOAC, 2012), obtida da análise em triplicata, apresentou um valor médio de 6,87% com um desvio padrão de 0,01%. Essa umidade foi alcançada depois de secar a temperatura ambiente e em estufa com circulação forçada de ar. O teor de umidade de um material vegetal está diretamente relacionado com a estabilidade dos compostos presentes nele durante o armazenamento. O elevado teor de umidade favorece o crescimento de microrganismos e a hidrólise dos compostos ativos (Souza, Bott e Oliveira, 2007). Além disso, o teor de umidade influencia nos processos de extração, podendo melhorar ou afetar negativamente o desempenho da extração, dependendo do teor, do solvente e do método utilizado na extração (Pourmortazavi e Hajimirsadeghi, 2007). O teor de umidade obtido neste trabalho está dentro da faixa de 6 a 14%, estabelecido para produtos armazenados sob condições não herméticas (Souza, Bott e Oliveira, 2007).

A Tabela 7 apresenta a distribuição granulométrica obtida das folhas após o processo de trituração.

**Tabela 7. Distribuição granulométrica das folhas após secagem e moagem**

Mesh (Tyler)	Fração	Abertura das peneiras (mm) <sup>a</sup>	Diâmetro médio ( $\bar{d}_i$ )	Amostra retida (g)
16	>16	0,597	>0,597	127,68
<b>28</b>	<b>16/28</b>	<b>0,318</b>	<b>0,458</b>	<b>965,50</b>
<b>35</b>	<b>28/35</b>	<b>0,310</b>	<b>0,314</b>	<b>369,84</b>
<b>48</b>	<b>35/48</b>	<b>0,234</b>	<b>0,272</b>	<b>257,46</b>
60	48/60	0,178	0,206	174,01
Fundo	<60		<0,178	417,96

<sup>a</sup>Braskem (2002)

Nos experimentos foram utilizadas as partículas que ficaram retidas nas peneiras de 28, 35 e 48 mesh, que correspondem a 60,6%, 23,2% e 16,2% em massa. Essas partículas foram escolhidas pois se tratam de um tamanho intermediário aos obtidos após moagem e apresentou maior proporção mássica em relação às demais frações. Assim, o diâmetro médio das partículas determinado conforme descrito por Gomide

(1983) foi de  $dp = 350 \mu\text{m}$ . A Figura 17 ilustra as folhas retidas em cada uma destas malhas.



Figura 17. Distribuição granulométrica das folhas

A massa específica real das folhas ( $\rho_s$ ) após secagem e moagem determinada por picnometria em gás hélio (Micromeritics Accupyc 1330) resultou em um valor de  $1,40 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ .

## 5.2. Rendimento

Neste trabalho foi avaliada a influência do solvente orgânico em diferentes métodos de extração, entre eles os métodos de Soxhlet, maceração, assistida por ultrassom e com líquido pressurizado. Os solventes orgânicos avaliados foram etanol, acetato de etila e *n*-hexano.

### 5.2.1. Métodos convencionais

A Tabela 8 apresenta as condições experimentais empregadas nos métodos convencionais Soxhlet e maceração, o rendimento obtido em cada extração e a polaridade de cada um dos solventes, uma vez que o solvente mais adequado é escolhido de acordo com a polaridade e afinidade com os compostos alvos (Ramić *et al.*, 2015). As determinações foram realizadas em triplicata, sendo os resultados médios e os desvios padrões mostrados na Tabela 8.

Ao se analisar a influência da polaridade dos solventes observa-se que o maior rendimento foi obtido com etanol, o solvente de maior polaridade. Este resultado sugere que a maior parte dos compostos presentes na matriz vegetal apresenta alta polaridade.

**Tabela 8. Propriedades dos solventes, condições empregadas e rendimentos obtidos nas extrações com solventes orgânicos**

Método	Solvente	Índice de Polaridade <sup>1</sup>	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento (%)
Sox	EtOH	5,2	78	360	20,03±1,76 <sup>a</sup>
	AcEt	4,4	77	360	5,25±0,33 <sup>c</sup>
	Hex	0,0	69	360	2,28±0,16 <sup>d</sup>
Mac	EtOH	5,2	25 ± 5	7200	9,16±0,08 <sup>b</sup>
	AcEt	4,4	25 ± 5	7200	2,45±0,07 <sup>d</sup>
	Hex	0,0	25 ± 5	7200	2,09±0,54 <sup>d</sup>

Sox: Soxhlet; Mac: maceração; EtOH: etanol; AcEt: acetato de etila; Hex: *n*-hexano; <sup>1</sup>Phenomenex (2010); A mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de 5%.

Em contrapartida, as extrações com o solvente de menor polaridade (acetato de etila e *n*-hexano), apresentaram os menores rendimentos, sugerindo menor concentração de compostos apolares presentes na matriz vegetal da folha. Pelo resultado do teste de Tukey, foi identificado que as extrações com acetato de etila e *n*-hexano com o método de maceração apresentaram rendimentos estatisticamente iguais, indicando uma larga variação na composição devido à ampla variação na polaridade destes solventes (de 0,0 a 4,4).

Dentre os métodos apresentados na Tabela 8, para o mesmo solvente, o método de Soxhlet apresentou os maiores rendimentos, com exceção do solvente *n*-hexano, que apresentou rendimento estatisticamente igual nos dois métodos, de acordo com o teste de Tukey. O maior rendimento obtido por Soxhlet é devido à recirculação do solvente em sua temperatura de ebulição. Maiores temperaturas contribuem para a extração de materiais, pois reduzem a tensão superficial e viscosidade. Dessa forma, o solvente atinge facilmente os locais ativos dentro da matriz e aumenta a solubilização dos compostos (Andrade *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2017; Markom *et al.*, 2007; Mazzutti *et al.*, 2017; Mezzomo *et al.*, 2010).

### 5.2.2. Extração com líquido pressurizado (PLE)

A Tabela 9 apresenta as condições aplicadas na extração utilizando líquido pressurizado. Estes resultados são referentes a 40 minutos de extração, quando praticamente todo soluto havia sido extraído no processo. Assim como para os métodos tradicionais de extração, na extração com líquido pressurizado o solvente é um dos parâmetros mais importantes a serem otimizados.

**Tabela 9. Condições aplicadas na extração com líquido pressurizado e rendimentos obtidos experimentalmente**

Solvente	Índice de Polaridade <sup>1</sup>	Pressão (bar)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
EtOH	5,2			40	6,88±0,40 <sup>c</sup>
				50	8,64±0,20 <sup>b</sup>
				60	12,69±0,69 <sup>a</sup>
AcEt	4,4	100	40	40	1,72±0,08 <sup>de</sup>
				50	1,72±0,05 <sup>de</sup>
				60	2,60±0,03 <sup>d</sup>
Hex	0,0			40	0,96±0,03 <sup>e</sup>
				50	1,42±0,05 <sup>e</sup>
				60	1,49±0,06 <sup>e</sup>

<sup>1</sup>Phenomenex (2010); A mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de 5%.

De acordo com a Tabela 9, o etanol é o solvente mais efetivo na extração das folhas de *B. forficata*, proporcionando rendimentos maiores quando comparados aos resultados obtidos com os solventes acetato de etila e *n*-hexano. Resultados similares foram obtidos por Santos *et al.* (2019) ao usar os mesmos solventes para extração de compostos da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*), que justifica o alto rendimento desse solvente pela baixa seletividade de solventes polares, ou seja, devido a extração de compostos não voláteis tais como flavonoides, taninos, saponinas e esteroides, que não eram de interesse no trabalho Santos *et al.* (2019) mas que são de interesse deste trabalho.

Moreau, Powell e Singh (2003) extraíram lipídeos polares e apolares de milho via PLE usando quatro diferentes solventes (hexano, diclorometano, isopropanol e etanol) em duas temperaturas (40 e 100 °C). Eles observaram tendências similares às encontradas neste trabalho, um aumento no rendimento com o aumento da temperatura e com o aumento da polaridade do solvente.

De acordo com a Tabela 9, é possível observar que houve um aumento do rendimento com o aumento da temperatura, principalmente para o etanol, cujo aumento foi significativo de acordo com o teste de Tukey. Os rendimentos obtidos com acetato de etila e *n*-hexano, embora aumentassem com a temperatura, não foram significativos ou foram pouco significativos.

Um aumento da temperatura geralmente melhora a eficiência da extração devido à quebra das interações entre os analitos e a matriz (Freitas *et al.*, 2013; Mustafa e Turner, 2011), tais como ligações de hidrogênio e ligações dipolo (Freitas *et al.*, 2013).

Em temperaturas mais elevadas ocorre o aumento da solubilidade dos compostos da matriz vegetal no solvente devido à diminuição da viscosidade (Freitas *et al.*, 2013; Trentini *et al.*, 2017) e devido à maior pressão de vapor dos solutos (Trentini *et al.*, 2017). A redução da viscosidade do solvente líquido melhora a sua penetração na amostra e a redução da tensão superficial solvente/matriz permite que os analitos se dissolvam mais rapidamente no solvente (Mustafa e Turner, 2011; Osorio-Tobón e Meireles, 2013), aumenta o coeficiente de difusão (Freitas *et al.*, 2013; Mustafa e Turner, 2011; Trentini *et al.*, 2017) e a espontaneidade do processo de extração (Trentini *et al.*, 2017), resultando em extrações mais rápidas (Freitas *et al.*, 2013; Mustafa e Turner, 2011; Trentini *et al.*, 2017).

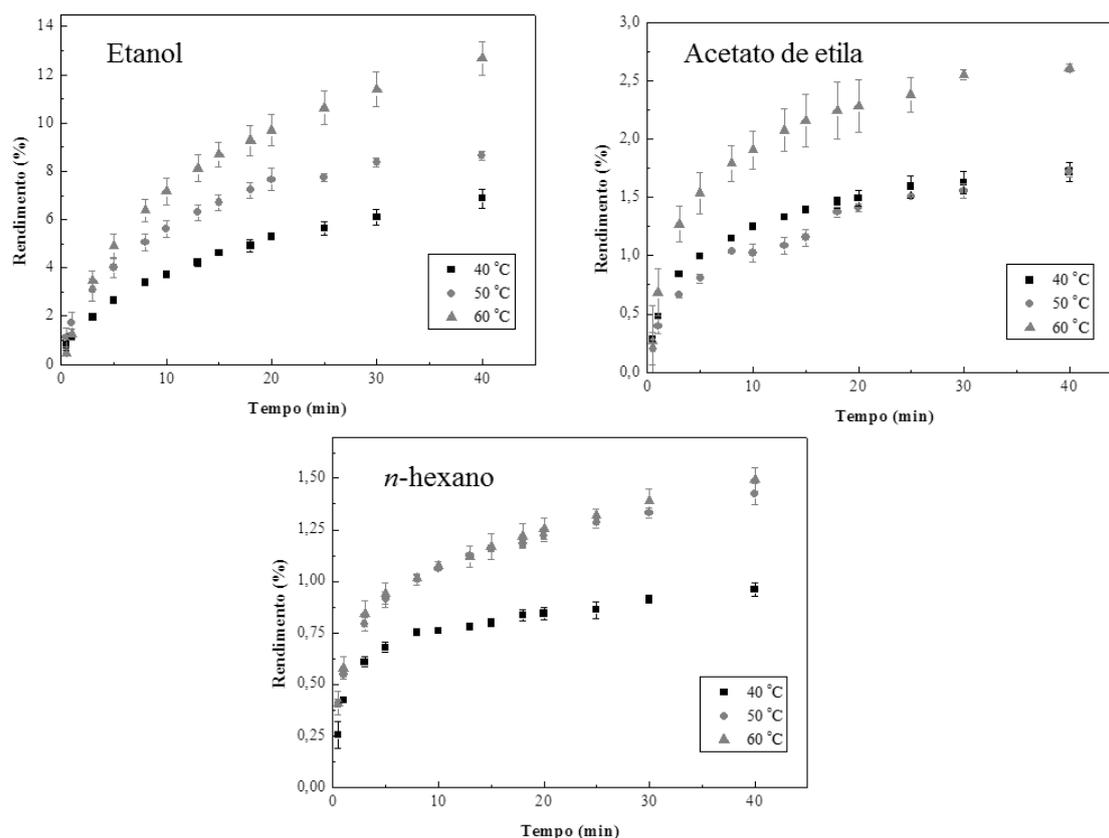
Além disso, a aplicação de elevadas temperaturas amolece o tecido da matriz sólida, facilitando a eluição do óleo ligado ao solvente (Trentini *et al.*, 2017).

Na maior temperatura, 60 °C, foram obtidos os maiores rendimentos da PLE com os solventes etanol, acetato de etila e *n*-hexano, 12,69%, 2,60% e 1,49%, respectivamente. Os maiores rendimentos obtidos na extração Soxhlet comparados ao método PLE com o mesmo solvente é devido à recirculação do solvente em sua temperatura de ebulição, o que aumenta a solubilização dos compostos (Santos *et al.*, 2019), além das maiores temperaturas diminuírem a viscosidade e tensão superficial do solvente, e assim a penetração na matriz sólida é facilitada, e conseqüentemente aumenta a transferência de massa (Markom *et al.*, 2007; Mezzomo *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2019).

Deve-se ressaltar que a quantidade de solvente empregada por massa de material e o tempo de extração empregados no método PLE foram menores em relação ao método convencional Soxhlet.

Embora a PLE com etanol e 60 °C tenha propiciado maiores rendimentos, essa condição não fornece, necessariamente, extratos com maiores concentrações de compostos bioativos, sendo necessário avaliar a composição dos extratos para determinar as melhores condições.

A Figura 18 apresenta as curvas cinéticas obtidas das extrações com líquidos pressurizados nas três temperaturas avaliadas (40, 50 e 60 °C).



**Figura 18. Cinéticas de extração com líquido pressurizado**

De acordo com a Figura 18 é possível observar que a extração ocorre em duas etapas. O início do processo de extração é dominado pelo mecanismo de lavagem (até aproximadamente 20 minutos para o etanol, até uns 10 minutos para o acetato de etila e até aproximadamente 5 minutos para o *n*-hexano), é um processo mais rápido, com uma inclinação maior da curva, seguido da etapa de difusão, etapa mais lenta, com inclinação menor da curva, até que o rendimento de equilíbrio seja alcançado.

### 5.2.3. Extração assistida por ultrassom (UAE)

As extrações assistidas por ultrassom também foram realizadas com os solventes etanol, acetato de etila e *n*-hexano. Inicialmente investigou-se o efeito do solvente na extração, utilizando 50% da potência, com temperatura controlada de 50 °C, numa proporção de solvente/folha de 15 (mL.g<sup>-1</sup>). A Tabela 10 apresenta os rendimentos médios obtidos experimentalmente junto com o desvio padrão, sendo que os experimentos foram realizados em triplicata.

**Tabela 10. Rendimentos obtidos nas extrações assistidas por ultrassom**

Solvente	Índice de Polaridade <sup>1</sup>	Temperatura (°C)	Potência (%)	Tempo (min)	Razão solvente/folha (mL·g <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)
EtOH	5,2	50	50	15	15	7,55±0,53 <sup>a</sup>
AcEt	4,4					1,72±0,05 <sup>b</sup>
Hex	0,0					0,96±0,14 <sup>b</sup>

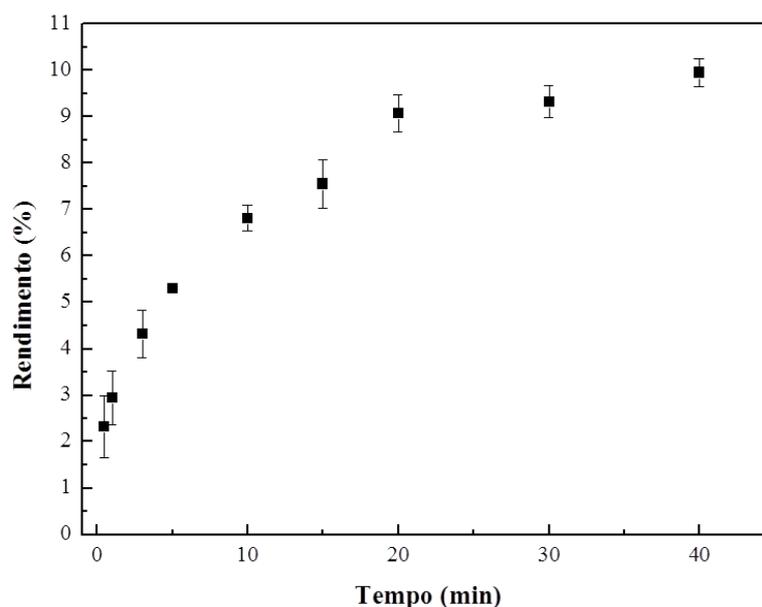
<sup>1</sup>Phenomenex (2010); A mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de 5%.

Estes resultados, juntamente com os apresentados pelos métodos anteriores comprovam a forte dependência do rendimento da extração com a polaridade do solvente empregado. Embora o rendimento de uma extração seja um parâmetro importante para determinar a viabilidade técnica e econômica de um processo, ele não é o único, por isso é importante que sejam realizadas análises em relação à composição dos extratos.

O etanol, além de resultar em maiores rendimentos em todos os métodos empregados e obter melhores resultados em relação à composição química e atividade antioxidante (como será apresentado nas próximas seções), é muito mais seguro e mais adequado que outros solventes para uso nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (Dias *et al.*, 2017; Jovanovic *et al.*, 2017). Desta forma, o etanol foi selecionado para realizar novos testes a fim de se otimizar as condições de extração das folhas assistida por ultrassom.

#### *Cinética da extração assistida por ultrassom*

Os experimentos cinéticos foram realizados com o objetivo de determinar o tempo para os próximos experimentos. As cinéticas foram realizadas com etanol, a 50% da potência, 50 °C, e com uma razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup>, onde as amostras de extratos foram coletadas em 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos. A Figura 19 apresenta o rendimento (%) em função do tempo de extração.



**Figura 19.** Curva da cinética experimental obtida pelo método de extração assistida por ultrassom das folhas de *B. forficata* utilizando etanol como solvente a 50 °C, 50% da potência e razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup>

Nos primeiros 5 minutos, a taxa de extração foi alta, quando o solvente estava relativamente fresco e os compostos bioativos solúveis localizados na ou próximos à superfície da planta foram facilmente extraídos, possivelmente devido à ruptura das paredes celulares ou devido à agitação promovida pelo ultrassom. A medida que prosseguia a extração, a concentração do soluto no solvente aumentou e o gradiente de concentração diminuiu, o que resultou em uma diminuição da taxa de extração. O rendimento máximo da extração foi alcançado quando os compostos bioativos solúveis localizados dentro da matriz vegetal se difundiram lentamente para a superfície. Como pode ser observado na Figura 19, quando a extração foi de 0 a 20 minutos, o rendimento aumentou em 9,07%, no entanto, de 20 a 40 minutos, o rendimento da extração aumentou apenas em 0,88%. Dessa forma, o tempo de 20 minutos foi selecionado para os próximos experimentos.

#### *Estudo do processo de extração usando planejamento Box-Behnken e análise de variância*

Um planejamento Box-Behnken com 15 experimentos foi empregado para investigar o efeito das variáveis temperatura, potência e razão folha/solvente no rendimento (apresentado nesta seção), teor de compostos fenólicos, teor de flavonoides

e atividade antioxidante (apresentados nas seções posteriores). A Tabela 11 apresenta os resultados experimentais para cada condição avaliada.

**Tabela 11. Variáveis independentes do planejamento Box-Behnken utilizadas nas extrações assistidas por ultrassom usando etanol como solvente e rendimento da extração**

Exp	Condições de extração			Rendimento (%)
	Temperatura (°C)	Potência (%)	Razão solvente/folha (mL·g <sup>-1</sup> )	
1	40	50	20	8,04
2	60	50	20	9,38
3	40	50	10	6,83
4	60	50	10	7,55
5	40	20	15	5,36
6	60	20	15	7,31
7	40	80	15	7,84
8	60	80	15	9,05
9	50	20	20	6,85
10	50	20	10	4,63
11	50	80	20	8,53
12	50	80	10	7,90
13	50	50	15	8,65
14	50	50	15	9,41
15	50	50	15	9,16

Neste estudo, foram utilizados 2,5, 3,33 e 5 gramas de folhas e o volume de solvente, etanol, foi mantido em 50 mL. O menor e o maior rendimento obtidos foram 4,63% (20% da potência, 50 °C e razão solvente/folha de 10 mL·g<sup>-1</sup> e 9,41% (50% da potência, 50 °C e razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup>, respectivamente.

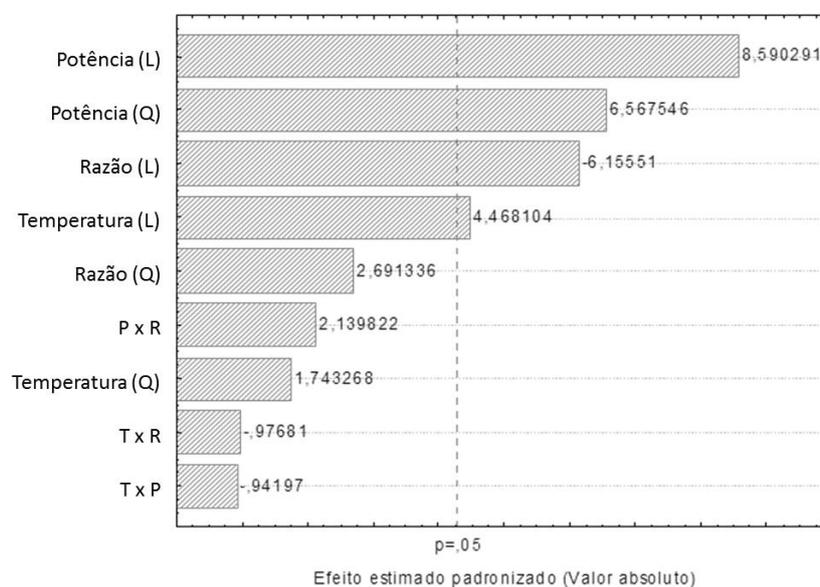
Da Tabela 11 e da Figura 21, apresentada mais adiante, pode ser observado que com o aumento da potência de 20% para 80%, o rendimento da extração aumentou em todas as condições testadas. De acordo com Purohit e Gogate (2015), os resultados obtidos podem ser associados ao aumento dos efeitos da cavitação em relação ao número de cavidades e ao colapso violento das cavidades em níveis de dissipação relativamente altos. Esse estresse mecânico resulta no aumento da destruição da matriz vegetal (Hani *et al.*, 2017).

Segundo Purohit e Gogate (2015), a otimização da razão massa/volume é muito importante para qualquer processo de extração. O uso de menores razões massa/solvente que um valor ótimo leva a um aumento no consumo de solvente, enquanto que razões massa/volume maiores do que o valor ótimo resultam numa extração incompleta. Como pode ser observado na Tabela 11 e na Figura 21 (b), o rendimento aumentou com o uso

de menores quantidades de folhas. Quantidades excessivas de material vegetal (razão solvente/folha de  $10 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ) podem causar aumento na viscosidade e assim inibir a difusão dos compostos no meio de extração (Jovanovic *et al.*, 2017). Além disso, grandes quantidades de material sólido contribuem para atenuação das ondas ultrassônicas, deixando ativa apenas a área próxima à sonda ultrassônica (Wang e Weller, 2006).

Como pode ser verificado na Tabela 11 e na Figura 21 (a), o aumento da temperatura de 40 a 60 °C levou a um aumento no rendimento das extrações para todas as condições testadas. De acordo com Chemat *et al.* (2017) isso pode ser justificado pelo aumento no número de bolhas de cavitação e uma área de contato sólido-solvente relativamente grande, o que aumenta a dessorção e solubilidade dos compostos. O rendimento também aumenta com a temperatura devido ao aumento da taxa de difusão do solvente e aumento da solubilidade dos analitos no solvente de extração, devido à modificação na densidade e viscosidade (Dias *et al.*, 2017; Hani *et al.*, 2017; Jovanovic *et al.*, 2017; Purohit e Gogate, 2015).

O gráfico de Pareto, exibido na Figura 20, permite visualizar os efeitos das variáveis do planejamento no rendimento da extração.



**Figura 20. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis potência, razão e temperatura no rendimento das extrações assistidas por ultrassom utilizando etanol como solvente**

O modelo polinomial de segunda ordem que descreve o efeito dos fatores independentes na resposta rendimento é dado pela Equação (32), a seguir:

$$\text{Rendimento (\%)} = 7,489 + 0,653 \cdot X_1 + 1,145 \cdot X_2 - 0,805 \cdot X_3 + 0,632 \cdot X_2^2 \quad (32)$$

Em que  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  representam os fatores codificados temperatura, potência e razão solvente:folha.

O modelo estatístico foi ajustado utilizando todos os parâmetros que mostraram significância 95% de confiança e foi analisado utilizando o teste ANOVA, conforme Tabela 12.

**Tabela 12. Análise de variância para predição do rendimento da extração assistida por ultrassom a 95% de confiança**

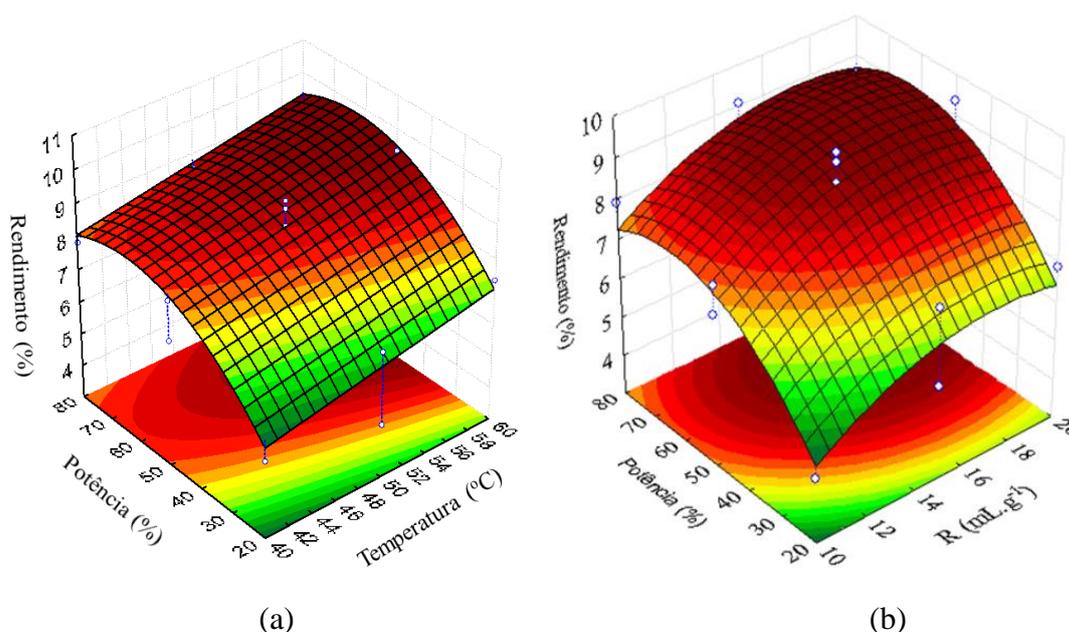
Fonte de variação	Soma quadrática	GL <sup>a</sup>	Média Quadrática	F calc.	F tab.	p-valor
Regressão	25,094	4	6,273	22,09	3,48 <sup>b</sup>	0,000
Resíduo	2,840	10	0,284			
Falta de ajuste	2,538	8	0,317	2,10	19,37 <sup>c</sup>	0,156
Erro puro	0,302	2	0,151			
Total	27,934	14				

% de variação explicada: 89,8%

% máxima de variação explicável: 98,9%

<sup>a</sup> Número de graus de liberdade; <sup>b</sup> F<sub>tabelado</sub>(4;10;0,05); <sup>c</sup> F<sub>tabelado</sub>(8;2;0,05).

A partir do 1º teste F tem-se que o modelo estatístico é significativo, uma vez que o valor de F calculado é maior do que o valor de F tabelado. Da análise do 2º teste F, tem-se que a falta de ajuste não é significativa, pois o F calculado é menor do que o F tabelado. O modelo apresentou um coeficiente de determinação de 0,898. Como pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 20) e na Equação (32), o fator que afetou mais significativamente o rendimento foi a potência em seu termo linear.



**Figura 21. Superfícies de resposta ilustrando os efeitos (a) da potência e da temperatura e (b) da potência e razão solvente/folha no rendimento da extração assistida por ultrassom utilizando etanol como solvente.**

Apesar de ligeiramente menor o rendimento obtido na extração por ultrassom, em comparação com maceração, os resultados foram estatisticamente iguais e o tempo de extração (20 minutos) foi consideravelmente mais curto (480 vezes), isto porque o efeito mecânico gerado pelas ondas de ultrassom, o aumento da temperatura e a redução da quantidade de folhas favoreceram a diminuição do tempo de extração.

#### 5.2.4. Extração por fluido supercrítico (SFE)

As condições experimentais de temperatura e pressão foram determinadas por planejamento experimental  $2^2$  com repetição no ponto central, selecionadas levando em consideração as limitações operacionais do equipamento, mas de forma a garantir uma ampla variação dos parâmetros. A Tabela 13 apresenta os valores da densidade do  $\text{CO}_2$  supercrítico ( $\rho_f$ ), a solubilidade aparente ( $S_b$ ) e o rendimento. A vazão de  $\text{CO}_2$  foi mantida constante ( $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), o tempo de extração foi o mesmo para todos os experimentos (200 minutos).

**Tabela 13. Condições operacionais das SFE e seus respectivos rendimentos**

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade $\text{CO}_2$ ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) <sup>1</sup>	Solubilidade ( $\text{g}_{\text{óleo}}\cdot\text{g}_{\text{solvente}}^{-1}$ ) $\times 10^4$	Rendimento (%)
1	180	40	819,51	4.37	0,83
2	180	60	687,25	5.78	1,03
3	200	50	784,29	5.46	$0,87\pm 0,01^2$
4	220	40	857,20	6.12	0,99
5	220	60	752,38	6.25	1,14

<sup>1</sup> NIST - National Institute of Standards and Technology; <sup>2</sup> Média e desvio padrão da triplicata realizada no ponto central.

Os valores de Solubilidade  $S_b$  foram obtidos da inclinação da parte inicial da curva de extração (massa de óleo vs. massa de  $\text{CO}_2$ ). O tempo necessário para a extração com fluido supercrítico foi determinado a partir dos ensaios cinéticos.

O maior rendimento obtido pelo método de extração supercrítica (1,14%) foi alcançado aplicando a maior temperatura e maior pressão do planejamento experimental (60 °C e 220 bar, respectivamente) e o menor rendimento (0,83%) foi obtido na menor temperatura e na menor pressão do planejamento experimental (40 °C e 180 bar, respectivamente).

Como discutido em tópicos anteriores, a polaridade do solvente tem papel importante no rendimento da extração. Os rendimentos obtidos das extrações supercríticas são próximos aos obtidos pelos métodos de extração com líquido pressurizado e assistida por ultrassom utilizando *n*-hexano como solvente, devido ao CO<sub>2</sub> também ser apolar e extrair apenas os compostos apolares presentes nas folhas.

Análises estatísticas foram realizadas a fim de se determinar os efeitos das variáveis (temperatura e pressão) sobre o rendimento global da extração. Para isso, foi considerado um modelo linear com intervalo de confiança de 95% e erro puro. Na Tabela 14 são apresentados os efeitos das variáveis sobre o rendimento global da extração.

**Tabela 14. Tabela de efeitos principais pressão e temperatura e de interação no rendimento da SFE**

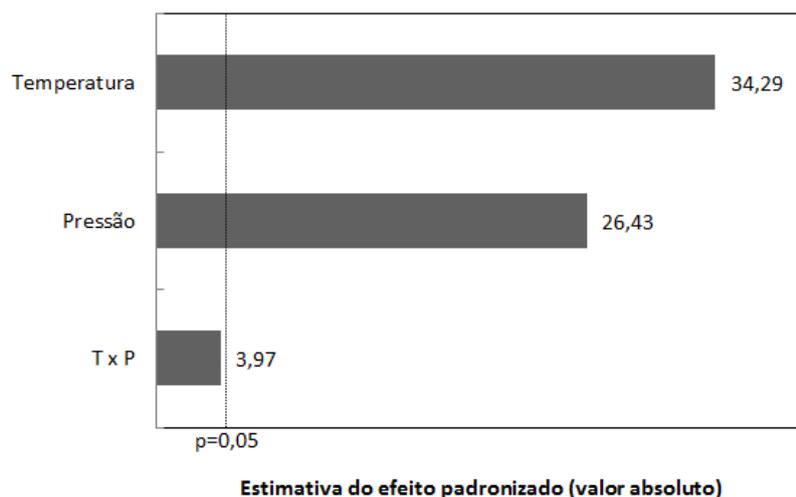
Fator	Efeito	Desvio padrão	t(2)	p-valor	Lim. Inf. 95% de confiança	Lim. Sup. 95% de confiança
Média	0,942	0,002	485,67	0,000004	0,933	0,950
Temperatura	0,176	0,005	34,29	0,000850	0,153	0,198
Pressão	0,136	0,005	26,43	0,001428	0,113	0,157
Interação PxT	-0,020	0,005	-3,96	0,058102	-0,042	0,001

\*As linhas destacadas indicam que o efeito é significativo.

Neste caso foi considerado erro puro, uma vez que os desvios foram obtidos a partir das repetições do experimento. Para três repetições no ponto central, tem-se que o número de graus de liberdade é igual a 2, o valor de t-student para 95% de confiança e 2 graus de liberdade é igual a 4,30. Como os valores obtidos para t(2) são maiores que o tabelado ( $t_2=4,30$ ), os efeitos temperatura e pressão são considerados significativos, já o efeito da interação pressão x temperatura não é significativo. O p-valor representa a probabilidade de erro envolvida ao aceitarmos o valor observado como válido, quanto maior o p-valor, menos confiamos que o efeito é significativo, neste trabalho, os p-valores obtidos para os efeitos da pressão e temperatura são menores que 0,05, indicando que a probabilidade de erro ao aceitarmos estes fatores como significativo é de menos de 5%.

Para as condições investigadas no planejamento experimental, a temperatura e a pressão tiveram efeito significativo ( $p<0,05$ ) e o rendimento da extração aumentou com o aumento de ambas as variáveis. A interação entre pressão e temperatura não teve efeito significativo no rendimento ( $p>0,05$ ).

O gráfico Pareto permite visualizar com clareza os efeitos das variáveis do planejamento sobre o rendimento global da extração supercrítica, pois apresenta a significância dos efeitos em ordem decrescente, sendo que a linha tracejada representa o limite de significância. Os efeitos à esquerda dessa linha são considerados não significativos e os à direita são significativos. Essa linha pode ser alterada de acordo com o limite de confiança escolhido. Para o limite de confiança de 95% ( $t_2$  tabelado=4,30) a probabilidade de erro é de 5%.



**Figura 22. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis pressão, temperatura e efeito de interação pressão x temperatura no rendimento da SFE**

De acordo com a Figura 22 e a Tabela 14, observa-se que o efeito da temperatura foi a variável mais significativa no rendimento das extrações com fluido supercrítico. A pressão também apresentou efeito positivo e bastante significativo. A interação temperatura x pressão não foi significativa, isso possivelmente porque esses fatores são independentes nesta faixa avaliada, ou seja, o comportamento de um fator independe da variação (ausência ou presença) do outro fator.

O modelo linear que descreve o efeito dos fatores independentes na resposta rendimento é dado pela Equação (33), a seguir:

$$\text{Rendimento (\%)} = 0,942 + 0,088 \cdot T + 0,068 \cdot P - 0,010 \cdot P \cdot T \quad (33)$$

Em que  $T$  e  $P$  representam os fatores codificados temperatura e potência, respectivamente. A validade do modelo foi verificada pela análise do teste F, mediante dados da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 15.

**Tabela 15. Análise de variância para predição do rendimento da extração CO<sub>2</sub> supercrítico a 95% de confiança**

Fonte de variação	Soma quadrática	GL <sup>a</sup>	Média Quadrática	F calc.	F tab.	p-valor
Regressão	0,049773	3	0,016591	1,69	9,27 <sup>b</sup>	0,338
Resíduo	0,029311	3	0,009770			
Falta de ajuste	0,029258	1	0,029258	1125,3	18,51 <sup>b</sup>	0,001
Erro puro	0,000053	2	0,000026			
Total	0,079084	6				

% de variação explicada: 62,94%  
% máxima de variação explicável: 99,93%

<sup>a</sup> Número de graus de liberdade; <sup>b</sup> Ftabelado(3;3;0,05); <sup>c</sup> Ftabelado(1;2;0,05);

O modelo obtido pela regressão linear explicou 62,94% das variações entre os valores experimentais e os previstos pelo mesmo, indicando uma má concordância. A análise da estatística “F” é apresentada na Tabela 15, no 1º teste F, como o valor de Fcalc é menor do que o Ftab, o modelo é considerado não significativo a um nível de significância de 5% e não representa bem os resultados experimentais obtidos. Além disso, a média quadrática da falta de ajuste é muito maior que a média quadrática do erro puro, resultando em um valor de F calculado muito maior do que o F tabelado, o que, de acordo com o 2º teste F, indica que os dados experimentais não são bem ajustados ao modelo.

Quando são realizadas repetições no ponto central, pode-se ainda fazer um teste de curvatura para determinar se o modelo linear é mesmo adequado, este teste é apresentado na Tabela 16.

**Tabela 16. Teste de curvatura do modelo rendimento para SFE**

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(2)	p-valor	Lim. Inf. 95% de confiança	Lim. Sup. 95% de confiança
Média	0,9979	0,0026	388,9	0,000007	0,9869	1,0090
Curvatura	-0,2612	0,0078	-33,3	0,000899	-0,2950	-0,2275
Temperatura	0,1759	0,0051	34,2	0,000850	0,1538	0,1980
Pressão	0,1356	0,0051	26,4	0,001428	0,1135	0,1577
Interação PxT	-0,0203	0,0051	-3,9	0,058102	-0,0424	0,0017

\*As linhas destacadas indicam que o efeito é significativo.

De acordo com a Tabela 16, conclui-se que a curvatura é significativa, o que mostra que seria necessário termos quadráticos no modelo para modelar a curvatura da superfície de resposta. Assim, o modelo linear não é adequado.

Em condições isobáricas, o desempenho da extração pode ser afetado pela temperatura por dois mecanismos. Um aumento na temperatura pode reduzir a

solubilidade devido à diminuição da densidade do solvente, ou aumentar a solubilidade devido ao aumento na pressão de vapor do soluto (Rodriguez *et al.*, 2018; Sodeifian, Sajadian e Ardestani, 2017). Estes dois efeitos opostos podem resultar no chamado *crossover* (cruzamento) de solubilidade (Andrade *et al.*, 2012; Guindani *et al.*, 2016; Mazzutti *et al.*, 2012). De acordo com Meireles (2008), o efeito da densidade do fluido é predominante na solubilidade próximo à pressão crítica, enquanto que, em altas pressões, o efeito do aumento da pressão de vapor do soluto com o aumento da temperatura excede o efeito da redução da densidade.

Como pode ser observado na Tabela 13, um aumento na temperatura de 40 °C para 60 °C proporcionou um aumento significativo no rendimento da extração ( $p < 0,05$ ). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que, embora a densidade do solvente diminua com o aumento da temperatura, a pressão de vapor dos compostos extraíveis aumentou em temperaturas mais elevadas. Assim, o rendimento da extração a diferentes temperaturas é dependente do complexo balanço entre a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico e a volatilidade dos compostos extraídos sob certas condições (Santos *et al.*, 2016). Portanto, pode-se concluir que, para a faixa de condições experimentais utilizadas neste estudo, o aumento da pressão de vapor foi o fator predominante.

Foi observado que a temperatura constante, o rendimento aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da pressão, de 180 bar para 220 bar. Tal resultado é atribuído ao aumento na densidade do CO<sub>2</sub> com a pressão (Tabela 12), o que aumenta o poder de solvatação do CO<sub>2</sub>. De acordo com Díaz-Reinoso *et al.* (2006), à medida que a pressão aumenta, a densidade do CO<sub>2</sub> aumenta e a distância intermolecular média entre as moléculas de CO<sub>2</sub> diminui, melhorando a interação específica entre as moléculas de soluto e de solvente. Além disso, o aumento na pressão pode levar a rupturas na matriz vegetal, facilitando a liberação de compostos e resultando na maior solubilidade do extrato e maior taxa de transferência de massa (Cruz *et al.*, 2017; Guindani *et al.*, 2016; Rodriguez *et al.*, 2018).

O valor da solubilidade aparente ( $S_b$ , expressa em  $\text{g}_{\text{oléo}} \cdot \text{g}_{\text{solvente}}^{-1}$ ) aumentou com o aumento da temperatura e aumentou substancialmente com o aumento da pressão (Tabela 13). Estes valores de solubilidade em CO<sub>2</sub> supercrítico possuem ordem de magnitude semelhante à de outras espécies reportadas na literatura. Barzotto *et al.* (2019) reportou valores de solubilidade entre 0,00071 e 0,0026  $\text{g}_{\text{oléo}} \cdot \text{g}_{\text{solvente}}^{-1}$  para extratos das folhas de *Eugenia involucrata*.

As curvas cinéticas experimentais do processo de extração com fluido supercrítico, obtidas a partir da pesagem periódica do extrato acumulado, são apresentadas na Figura 23. O resultado da extração foi representado em porcentagem (razão entre massa de extrato e massa de amostra seca).

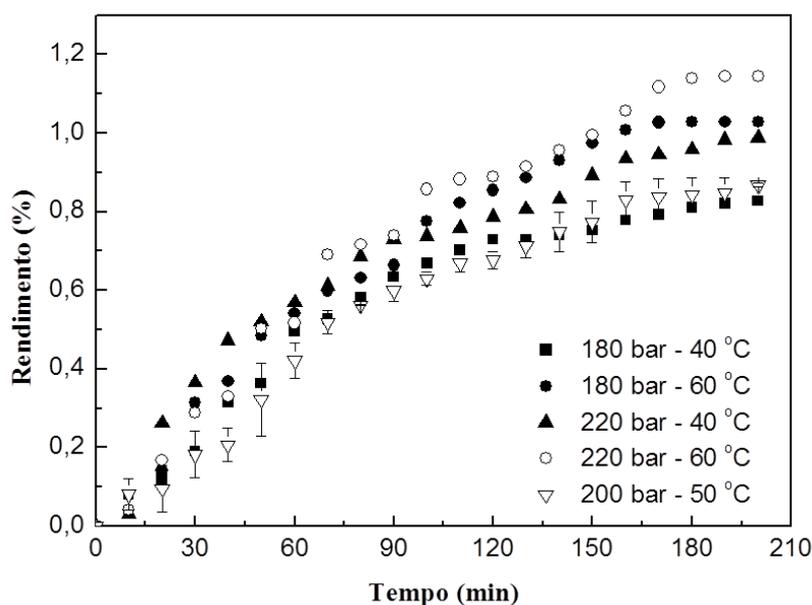


Figura 23. Curvas cinéticas experimentais das extrações das folhas de *B. forficata* por SFE

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.

#### Modelagem matemática da cinética de extração

A cinética de extração das folhas de *B. forficata* com CO<sub>2</sub> supercrítico foi investigada utilizando o modelo de Sovová. Os parâmetros utilizados para a modelagem matemática da cinética de extração foram: concentração inicial ( $q_0 = 0,0116 \text{ g}_{\text{óleo}} \cdot \text{g}_{\text{sólido}}^{-1}$ , dada pela razão entre a massa de óleo nas folhas, com base no maior rendimento, e a massa de sólido inerte), densidade do sólido ( $\rho_s = 1,40 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , determinada por picnometria de gás hélio), porosidade do leito ( $\varepsilon = 0,561$ ), densidade do leito ( $\rho_{\text{leito}} = 0,214 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), massa de material inerte ( $m_s = 10,3 \text{ g}$ ), além da densidade do solvente, apresentada na Tabela 13.

De acordo com o modelo de Sovová, a cinética de extração é dividida em três períodos, com transferência de massa na fase fluida e na fase sólida. As condições operacionais e os parâmetros ajustáveis Z, W e r do modelo de Sovová estão detalhados

na Tabela 17. O coeficiente volumétrico de transferência de massa na fase fluida,  $k_F a$ , foi obtido usando o valor de Z e a Equação (15), enquanto que o coeficiente volumétrico de transferência de massa na fase sólida,  $k_S a$ , foi obtido empregando W e a Equação (16).

O parâmetro 1-r (fração de óleo presente na superfície das células) é constante, ou seja, considera-se a eficiência da moagem como sendo a mesma para todas as amostras devido à utilização da mesma granulometria de folhas nos experimentos.

**Tabela 17. Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico**

T (°C)	P (bar)	$\rho_f$ (kg·m <sup>-3</sup> )	Z	W	r	t <sub>CER</sub> (min)	t <sub>FER</sub> (min)	k <sub>Fa</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>Sa</sub> (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
60	220	752,4	6,168	0,163	0,638	7,3	92,7	0,263	0,011	0,987
40	220	857,2	12,952	0,064	0,638	3,2	61,8	0,533	0,005	0,977
60	180	687,2	12,889	0,156	0,638	4,2	108,9	0,537	0,009	0,962
40	180	819,5	12,952	0,050	0,638	4,5	87,0	0,542	0,004	0,980
50	200	784,3	2,157	0,061	0,638	23,4	95,9	0,090	0,004	0,986

Como esperado, os valores de  $k_F a$  foram maiores que os valores de  $k_S a$  em todas as condições avaliadas, como pode ser observado na Tabela 17, isso porque o primeiro coeficiente, relacionado à transferência de massa externo, está associado à extração da fração liberada da superfície da partícula, ou seja, aquela de fácil acesso ( $1 - r$ , que é, 0,362), no primeiro período da extração. Esse período (CER) é mais rápido (entre 3,2 e 23,4 min), devido à elevada taxa de extração ( $k_F a$  entre 0,090 a 0,542 min<sup>-1</sup>).

Após o período CER, inicia-se o período FER. Nesta etapa, a fração de óleo disponível na superfície das células começa a se esgotar passando a ocorrer transferência de massa por difusão juntamente com a convecção. O coeficiente de transferência de massa na fase sólida,  $k_S a$ , representa a extração do soluto dentro do sólido, relacionado ao último período de extração (DCR). Nesse período, os valores dos coeficientes são menores (0,004 a 0,011 min<sup>-1</sup>).

No terceiro período não há mais óleo de fácil remoção por convecção, existindo somente a transferência de massa por difusão, ou seja, a extração do óleo depende da eficiência do solvente em acessar a parte interna das folhas, na qual as paredes celulares ainda estão intactas. Devido à dificuldade em extrair esta parcela de óleo, considera-se o período DCR como etapa limitante da extração. Como descrito na seção 5.2.2., temperaturas maiores podem aumentar a pressão de vapor dos extratos, favorecendo a

penetração do fluido nos poros dentro da matriz e assim facilitando a extração pelo solvente devido ao aumento na difusividade do soluto, além disso, o aumento na temperatura pode romper as ligações matriz-soluto (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017). O melhor rendimento foi obtido no experimento com maior valor de  $k_S a$ . O valor deste parâmetro aumenta com a pressão, como pode ser observado na Tabela 17, possivelmente devido à ruptura das paredes celulares (Barzotto *et al.*, 2019). Embora a difusividade aumente com a temperatura, a densidade do solvente foi o fator predominante que afetou o coeficiente de transferência de massa externo,  $k_F a$ . O aumento da temperatura também causou uma diminuição da densidade do solvente e consequentemente a diminuição da solubilidade do soluto.

O modelo de Sovová proporcionou bom ajuste aos dados experimentais, com coeficientes de determinação  $R^2 > 0,96$ . Vários autores reportaram bom ajuste deste modelo à diferentes matérias primas (Andrade *et al.*, 2012; Barzotto *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2017; Solana, Rizza e Bertucco, 2014).

As curvas cinéticas experimentais de extração em função do rendimento ajustadas com o modelo de Sovová são apresentadas na Figura 24.

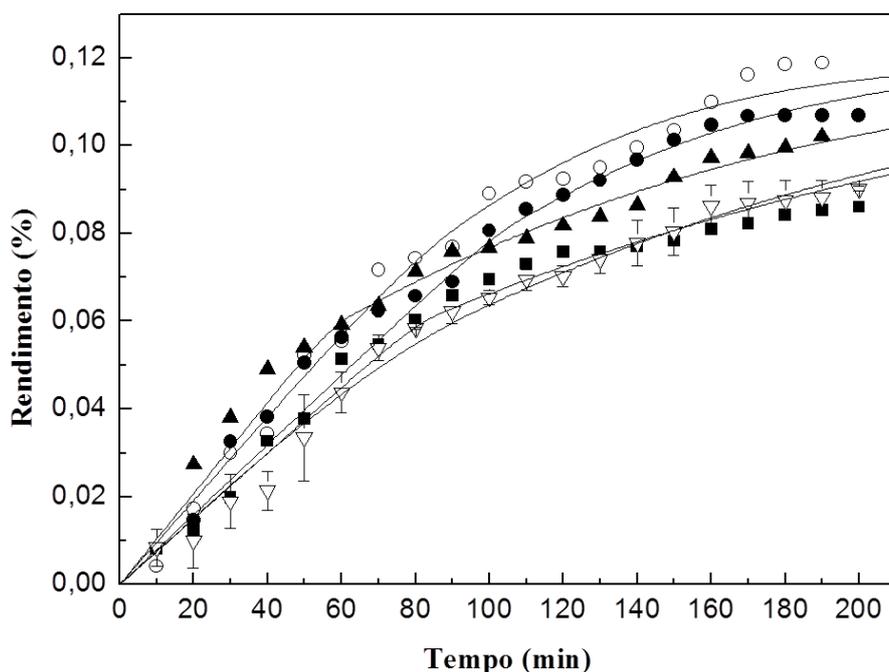


Figura 24. Curvas experimentais das cinéticas de extração das folhas de *B. forficata* com  $\text{CO}_2$  supercrítico ajustadas pelo modelo de Sovová:  $\circ$ (60 °C – 220 bar);  $\bullet$ (60 °C – 180 bar);  $\blacktriangle$ (40 °C – 220 bar);  $\blacksquare$ (40 °C – 180 bar);  $\blacktriangledown$ (50 °C – 20 bar). Barras de erros representando o desvio padrão da triplicata no ponto central do planejamento experimental.

### 5.2.5. *Extração por fluido supercrítico com cossolvente*

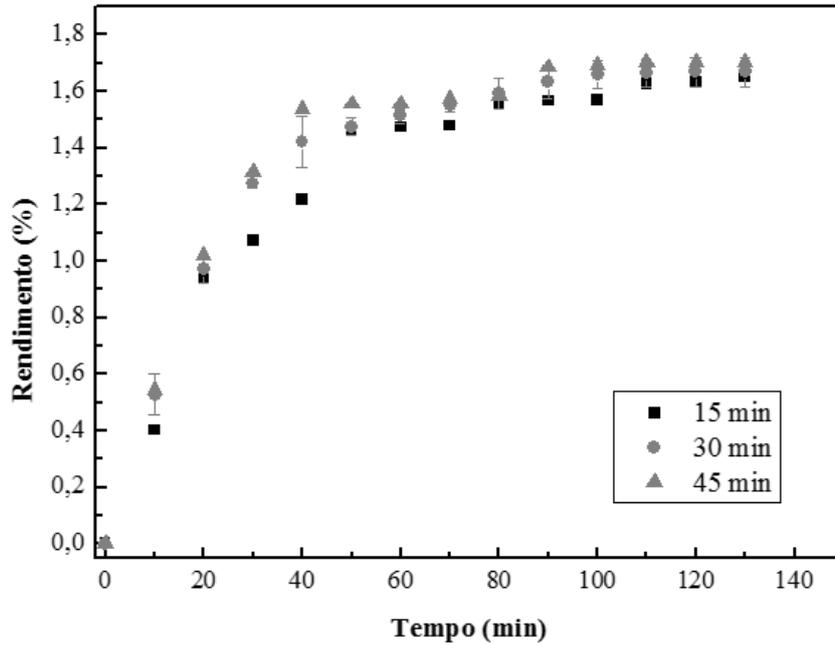
Como citado no item 3.4.3., o dióxido de carbono supercrítico não é efetivo para extração de compostos de maior polaridade, sendo assim, a fim de melhorar a eficiência da extração destes compostos, o etanol foi selecionado como cossolvente. Além de ser um modificador de grau alimentar, o etanol também apresentou nos bons resultados nos outros métodos de extração estudados neste trabalho. Os efeitos avaliados foram: tempo de extração estática, a pressão, a temperatura e massa de cossolvente utilizada na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico.

#### *Estudo do tempo de extração estática*

O tempo de extração estática (tempo de confinamento) é o tempo que os solventes são colocados em contato com a matriz sólida, neste período não há fluxo de CO<sub>2</sub> ou de cossolvente. Esses solventes entram nos poros internos da matriz, previamente abertas pela moagem, dissolvem os componentes extraíveis até entrarem em equilíbrio, para depois realizar a extração dinâmica com fluxo de CO<sub>2</sub>. Em outras palavras, o tempo de extração estática é o tempo antes de abrir a válvula de saída (Herzi *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2018).

Segundo Lang e Wai (2001), quando um modificador líquido é utilizado, geralmente é necessário um tempo de extração estática para permitir que o solvente modifique a matriz da amostra. Esse tempo de extração estática pode variar muito de um processo para outro, dependendo da composição da amostra e da concentração do soluto.

Na primeira parte deste estudo, foi avaliado o efeito do tempo de extração estática no rendimento da extração. Três durações de extração estática (15, 30 e 40 min), seguidas por extração dinâmica foram empregadas. A pressão e a temperatura foram fixadas em 200 bar e 50 °C e Rm=1:1. Os rendimentos experimentais são apresentados na Figura 25.



**Figura 25.** Curvas de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico com adição de etanol, comparando os tempos de extração estática de 15, 30 e 45 minutos (50 °C, 200 bar e relação mássica de cossolvente e folha de 1:1).

As curvas da Figura 25 mostram que os comportamentos das cinéticas de extração foram muito similares, principalmente as de 30 e 45 minutos de extração estática, ou seja, o tempo de extração estática não teve grande influência no processo nas condições estudadas (200 bar e 50 °C e relação mássica de cossolvente e folha de 1:1).

De acordo com Juchen (2019), o comportamento semelhante das extrações em diferentes tempos de extração estática deve-se, provavelmente, porque o soluto contido nas folhas estava facilmente disponível, ou seja, a matriz sólida não apresentou resistência para retirada do soluto. Desta forma, o etanol e CO<sub>2</sub> entraram no extrator e começaram a interagir imediatamente com o soluto disponível, não sendo necessários tempos maiores para que esses solventes entrassem nos poros da matriz e carregassem o soluto para parte externa.

Os resultados demonstraram que não é necessário um tempo de extração estática longo para solventes e extrato interagirem. Para dar continuidade nos experimentos foi utilizado um período de extração estática de 30 minutos para todas as extrações. Esse tempo foi escolhido com a finalidade de evitar uma possível influência do tempo de extração estática em outras condições de extração que pudessem ser mais lentas e influenciadas.

Outros pesquisadores realizaram extração estática antes da extração dinâmica. O tempo de 30 minutos de extração estática foi utilizado por Juchen (2019) na extração do óleo de farelo de arroz parboilizado com dióxido de carbono supercrítico e etanol como cossolvente e por Barzotto *et al.* (2019) na extração supercrítica das folhas de *Eugenia involucrata*. O tempo de 15 minutos de extração estática foi utilizado por Viganó, Zobot e Martínez (2017) na extração supercrítica de subprodutos de maracujá. Souza *et al.* (2018) e Cruz *et al.* (2019) utilizaram um tempo de 60 minutos de extração estática na extração supercrítica com adição de etanol das folhas de bardana (*Arctium Lappa*) e das folhas de yacon (*Smallanthus sonchifolius*), respectivamente.

*Efeito da temperatura, pressão e relação mássica de cossolvente e folha na extração supercrítica com cossolvente*

Um planejamento experimental  $2^3$  com repetição no ponto central com 11 experimentos foi empregado para investigar o efeito das variáveis temperatura, pressão e relação mássica de cossolvente:folha na extração supercrítica com cossolvente no rendimento (apresentado nesta seção), teor de compostos fenólicos, teor de flavonoides e atividade antioxidante (apresentados nas seções posteriores). A Tabela 18 apresenta os resultados experimentais para cada condição avaliada.

**Tabela 18. Variáveis independentes do planejamento  $2^3$  com repetição no ponto central utilizadas nas extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico com adição de etanol como cossolvente e rendimento**

Experimento	Temperatura (°C)	Condições de extração			Rm (g <sub>etanol</sub> :g <sub>folha</sub> )	Rendimento (%)
		Pressão (bar)	Densidade CO <sub>2</sub> (kg.m <sup>-3</sup> ) <sup>1</sup>			
1	40	180	819,51	0,5:1	0,88	
2	60	180	687,25	0,5:1	1,08	
3	40	220	857,20	0,5:1	1,02	
4	60	220	752,38	0,5:1	1,35	
5	40	180	819,51	1,5:1	2,82	
6	60	180	687,25	1,5:1	2,81	
7	40	220	857,20	1,5:1	5,10	
8	60	220	752,38	1,5:1	3,07	
9	50	200	784,29	1,0:1	1,73	
10	50	200	784,29	1,0:1	1,63	
11	50	200	784,29	1,0:1	1,64	

<sup>1</sup> NIST - National Institute of Standards and Technology

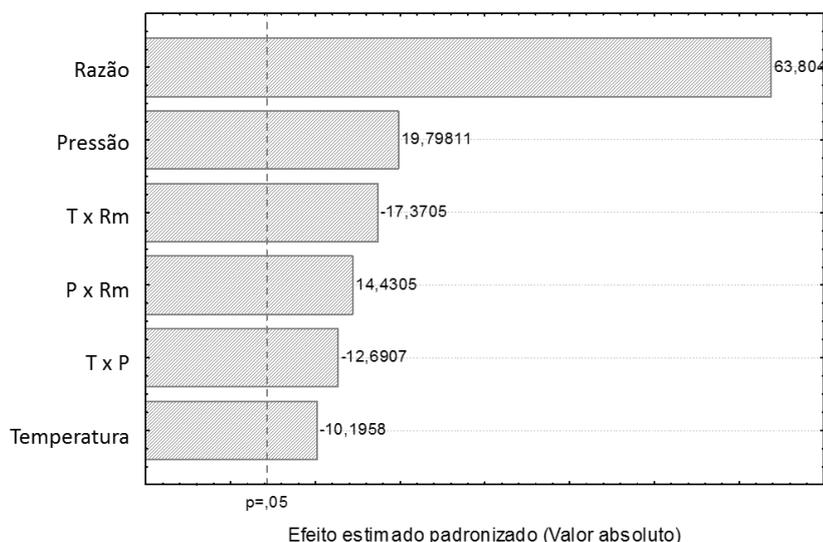
O maior rendimento obtido pelo método de extração supercrítica com adição de cossolvente (5,097%) foi alcançado aplicando a menor temperatura, maior pressão e maior razão solvente:folha do planejamento experimental (40 °C, 220 bar e 1,5:1), enquanto que o menor rendimento (0,883%) foi obtido na menor temperatura, na menor pressão e menor razão solvente:folha do planejamento experimental (40 °C, 180 bar e 0,5:1, respectivamente).

Para todas as condições investigadas no planejamento experimental, o rendimento da extração aumentou com o aumento da razão solvente:folha, tal tendência foi observada por vários outros autores ao utilizarem etanol como cossolvente (Kopcak e Mohamed, 2005; Maran, Priya e Manikandan, 2014; Santos *et al.*, 2017; Yang e Wei, 2015). De acordo com Maran *et al.*, (2014), a presença do etanol como cossolvente aumenta a polaridade do fluido de extração e facilita a extração de constituintes polares das plantas. Björklund *et al.* (1998) afirmam que a presença do cossolvente pode quebrar as interações entre soluto-matriz e formar ligações de Van der Waals e pontes de hidrogênio com o soluto e assim facilitar o deslocamento do soluto nos poros da matriz. De acordo com Yang e Wei (2015), a presença de etanol como cossolvente pode também causar um inchaço (aumento da área extrativa) na matriz sólida, melhorando ainda mais a difusão do composto alvo. Para Cruz *et al.* (2019), a adição de cossolventes, tais como o etanol, ao CO<sub>2</sub> reduz a seletividade do processo, mas também aumenta o rendimento da extração pelo aumento da solubilidade de compostos polares provenientes da matriz.

O aumento da pressão resultou no aumento do rendimento da extração em condições isotérmicas. Por exemplo, para a razão de 1,5:1, na temperatura de 40 °C, aumentando a pressão de 180 bar para 220 bar o rendimento aumentou de 2,823% para 5,097%, enquanto que para a temperatura de 60 °C, aumentando a pressão de 180 bar para 220 bar, o rendimento aumenta de 2,806 para 3,070%. Logo, a pressão auxiliou na retirada de soluto da matriz. O mesmo comportamento ocorreu para a razão 0,5:1, porém, de forma não tão pronunciada. Assim como na extração com fluido supercrítico sem adição de cossolvente, o aumento na pressão pode levar a rupturas na matriz vegetal, facilitando a liberação de compostos.

Análises estatísticas foram realizadas visando determinar os efeitos das variáveis (temperatura, pressão e razão solvente:folha) sobre o rendimento global da extração. O gráfico Pareto, mostrado na Figura 26, permite visualizar com clareza os efeitos das

variáveis do planejamento sobre o rendimento da extração supercrítica com adição de cossolvente.



**Figura 26. Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão, temperatura e razão solvente:folha no rendimento da SFE com adição de etanol como cossolvente**

Todos os efeitos são considerados significativos a 95% de confiança, inclusive os efeitos de interação. O modelo estatístico que prediz o rendimento da extração (Rend) em função das variáveis independentes codificadas temperatura (T), pressão (P) e razão mássica solvente e folha (Rm) é dado pela Equação (34).

$$Rend (\%) = 2,103 - 0,189 \cdot T + 0,367 \cdot P + 1,183 \cdot Rm - 0,235 \cdot P \cdot T - 0,322 \cdot T \cdot Rm + 0,268 \cdot P \cdot Rm \quad (34)$$

Neste caso foi considerado erro puro, uma vez que os desvios foram obtidos a partir das repetições do experimento. A validade do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA).

**Tabela 19. Análise de variância para predição do rendimento da SFE com adição de cossolvente a 95% de confiança**

Fonte de variação	Soma quadrática	GL <sup>a</sup>	Média Quadrática	F calc.	F tab.	p-valor
Regressão	14,399	6	2,400	7,070	6,163 <sup>b</sup>	0,039
Resíduo	1,358	4	0,339			
Total	15,757	10				

% de variação explicada: 91,38%

% máxima de variação explicável: 99,96%

<sup>a</sup> Número de graus de liberdade; <sup>b</sup> F<sub>tabelado</sub>(6;4;0,05).

O modelo estatístico é significativo, ou seja, se ajusta aos dados experimentais e explicou 91,38% das variações entre os valores experimentais e os previstos pelo mesmo, indicando uma boa concordância.

De acordo com a Figura 26 e a Equação (34) observa-se que o efeito da razão mássica foi a variável mais significativa no rendimento das extrações com fluido supercrítico com adição de cossolvente. Na Figura 27 são apresentados os efeitos a partir de superfícies de resposta, nas quais é possível verificar o sentido da região ótima, com maior rendimento de extração. Na Figura 27 (a) a temperatura foi fixada em 50 °C e observa-se que aumentando-se a pressão, aumenta-se também o rendimento da extração e ao aumentar a quantidade de cossolvente, aumenta-se também o rendimento da extração. Na Figura 27 (b), foi fixada a pressão em 200 bar e observa-se que quanto maior a quantidade de etanol utilizada como cossolvente, maior o rendimento da extração, enquanto que a temperatura teve efeitos que variaram com a quantidade de cossolvente adicionada, na razão mássica de 1,5:1 o aumento da temperatura diminuiu o rendimento enquanto que na razão mássica de 0,5:1, o aumento da temperatura favoreceu a extração.

Assim como na extração supercrítica utilizando apenas CO<sub>2</sub>, em condições isobáricas a temperatura pode afetar de duas formas: a pressão de vapor do soluto e a densidade do solvente. Dessa forma, um aumento na temperatura leva a um aumento na pressão de vapor do soluto, aumentando a solubilidade no solvente, enquanto que a densidade do solvente diminui quando a temperatura é aumentada, diminuindo seu poder de solvatação (Cruz *et al.*, 2019).

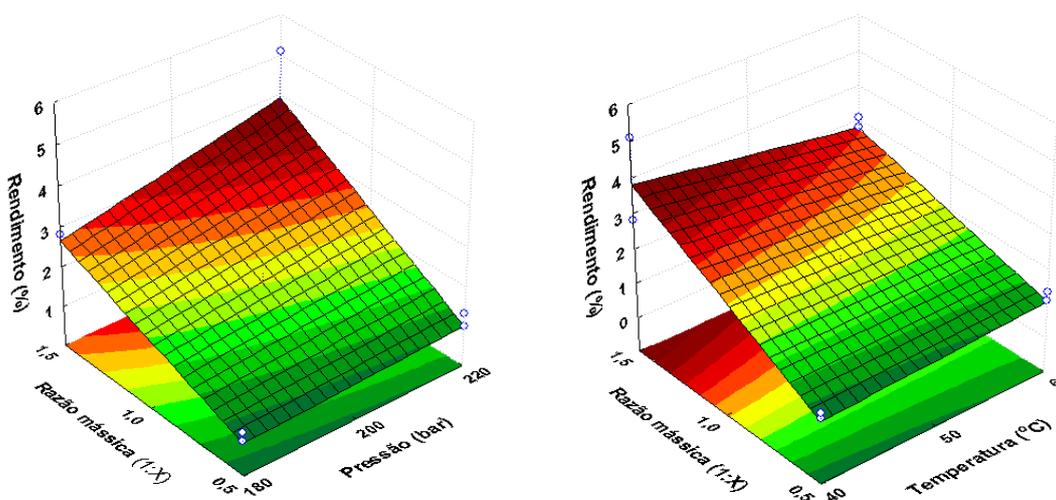
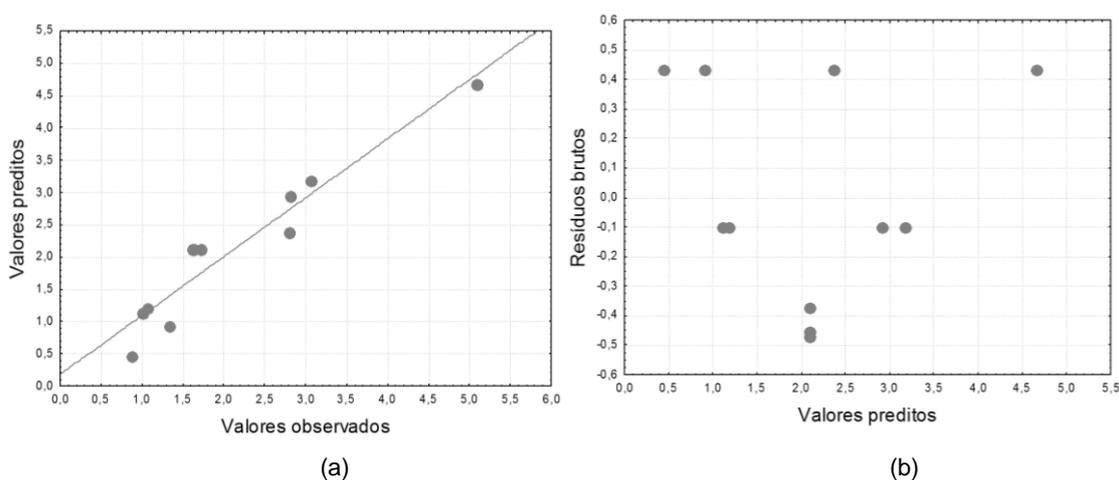


Figura 27. Superfície de resposta ilustrando os efeitos dos parâmetros de extração temperatura, razão mássica e pressão no rendimento da SFE com adição de cossolvente.

A Figura 28 apresenta os gráficos de resíduos, o gráfico de valores observados x valores preditos indica que o modelo prevê corretamente o comportamento observado experimentalmente. O gráfico de valores preditos x resíduos brutos indica que os resíduos estão dispersos aleatoriamente em torno de zero, com variância constante, concentrados entre -0,6 e 0,6.



**Figura 28. Gráficos de resíduos do modelo estatístico para rendimento da extração com fluido supercrítico com adição de cossolvente.**

As curvas cinéticas da extração utilizando  $\text{CO}_2$  supercrítico com adição de cossolvente das folhas de *B. forficata* são apresentadas nas Figuras 29 e 30. Em geral, é possível observar nas Figuras 29 e 30 as etapas das curvas globais de extração. Essas curvas foram compostas inicialmente pelo período de taxa de extração constante (CER), depois pelo período de taxa de extração decrescente (FER), onde a convecção e a difusão são mecanismos de transferência de massa importantes e no final, uma taxa de extração quase nula, indicando que a difusão é o mecanismo que controla a transferência de massa (Campos *et al.*, 2005).

As Figuras 29 e 30 deixam evidente que a pressão teve grande influência no processo, e a temperatura teve grande influencia na razão de 0,5:1 e menor influência na razão mássica de 1,5:1.

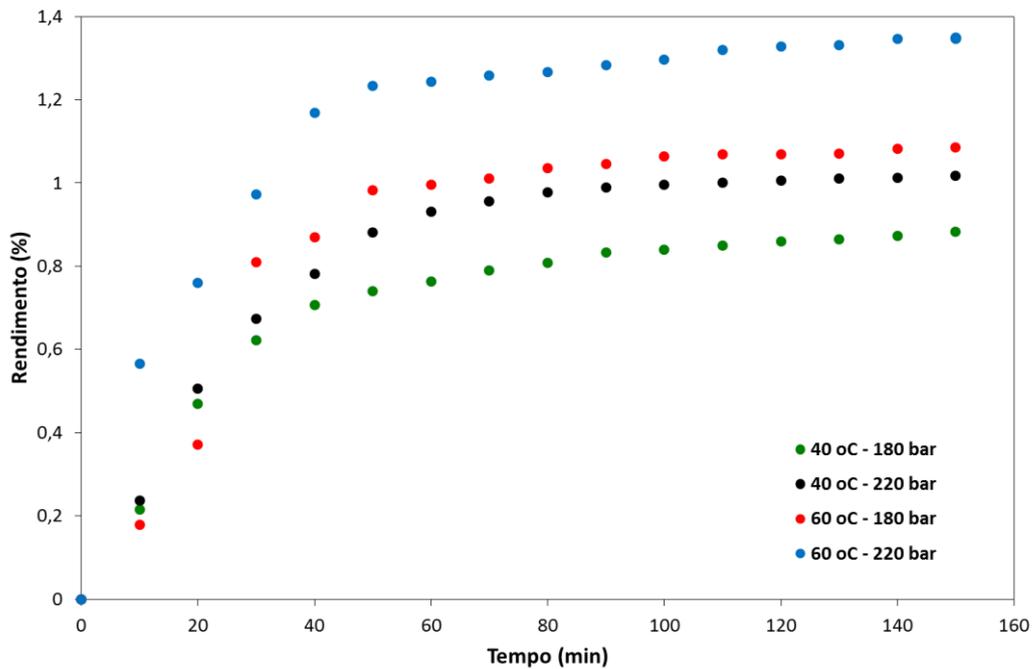


Figura 29. Curvas experimentais das cinéticas de extração das folhas de *B. forficata* com CO<sub>2</sub> supercrítico com adição de cossolvente na razão mássica de 0,5:1.

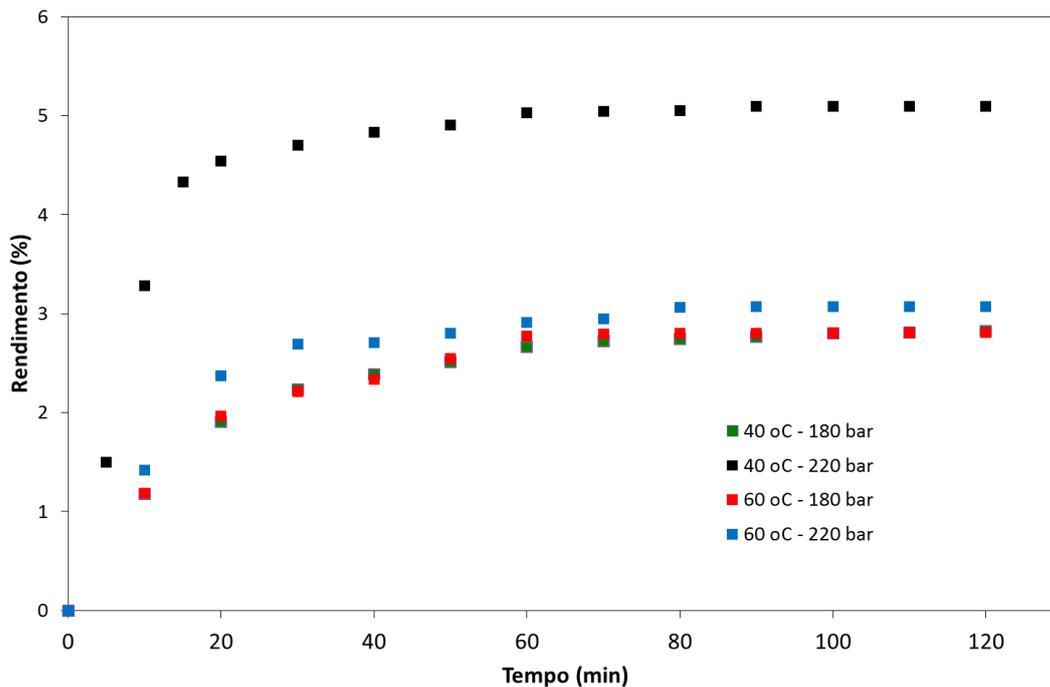


Figura 30. Curvas experimentais das cinéticas de extração das folhas de *B. forficata* com CO<sub>2</sub> supercrítico com adição de cossolvente na razão mássica de 1,5:1.

Como pode ser observado na Tabela 18, a densidade do solvente teve grande impacto nos rendimentos obtidos, sendo maior o rendimento quanto maior a densidade do CO<sub>2</sub>. Em condições isotérmicas, o aumento da pressão leva a um aumento na densidade do CO<sub>2</sub> e conseqüentemente no poder de solvatação deste fluido, aumentando

o rendimento. Em condições isobáricas, o aumento da temperatura aumenta a pressão de vapor dos solutos, porém diminui a densidade do CO<sub>2</sub> e do etanol e conseqüentemente seu poder de solvatação, sendo o efeito predominante nestas condições, assim como ocorreu na SFE sem adição de cossolvente.

A maior quantidade de cossolvente adicionada às folhas (Rm=1,5:1) auxiliou na obtenção de um rendimento maior em todas as condições de pressão e temperatura avaliadas.

Comparando as Figuras 29 e 30, observa-se que o etanol, utilizado como cossolvente, auxiliou a extração a se estabilizar mais rapidamente, ou seja, o rendimento máximo foi obtido mais rapidamente. Na maior proporção de cossolvente (Rm=1,5:1) foi necessário em torno de 20 minutos de extração dinâmica para entrar em equilíbrio. Na menor proporção de cossolvente (Rm=0,5:1), o tempo de extração dinâmica para entrar em equilíbrio foi em torno de 40 minutos, já para o CO<sub>2</sub> puro, este tempo foi de aproximadamente 200 minutos. Esses resultados comprovam que o uso de cossolvente é viável para agilizar o processo de extração. Juchen (2019) também concluiu que a utilização de etanol como cossolvente é efetiva, pois agilizou o processo de extração do óleo de arroz parboilizado comparada a extração que utilizou somente CO<sub>2</sub> supercrítico.

Em relação ao rendimento das extrações, o método de Soxhlet foi o que apresentou melhores resultados, seguido dos métodos de extração com líquido pressurizado, maceração e ultrassom. Em todos os métodos aplicados, o etanol foi o solvente que resultou em maiores rendimentos, seguido do acetato de etila, e com menores rendimentos com *n*-hexano e CO<sub>2</sub> supercrítico.

### **5.3. Determinação da composição química dos extratos das folhas de *B. forficata***

Os compostos voláteis dos extratos das folhas de *B. forficata*, obtidos utilizando diferentes solventes e métodos, determinados por cromatografia gasosa acoplado com espectro de massas (CG-MS), estão apresentados na Tabela 20, juntamente com suas áreas relativas (%).

Tabela 20. Composição química dos extratos das folhas de *B. forficata* obtidos por Soxhlet, maceração, UAE, PLE, SFE e SFE com cossolvente

Composto	Área relativa do composto (%)													
	Soxhlet			Maceração			UAE <sup>1</sup>			PLE <sup>2</sup>			SFE <sup>3</sup>	CS <sup>4</sup>
	Hex	AcEt	EtOH	Hex	AcEt	EtOH	Hex	AcEt	EtOH	Hex	AcEt	EtOH		
Ácido gadoleico	2,04	12,54	19,21	n.d.	n.d.	n.d.	3,34	16,32	15,23	n.d.	n.d.	3,05	2,49	n.d.
Palmitato de etila	1,36	n.d.	1,07	3,25	0,41	0,30	1,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,97	n.d.
Ácido palmítico	n.d.	1,17	3,19	n.d.	n.d.	0,96	n.d.	2,40	2,93	12,75	11,95	3,43	n.d.	3,53
Fitol	20,68	29,54	20,08	5,40	11,46	6,37	1,76	9,82	16,74	n.d.	n.d.	1,37	6,14	25,71
Ácido linolênico	n.d.	n.d.	1,99	n.d.	n.d.	7,55	n.d.	n.d.	n.d.	2,68	2,79	1,26	n.d.	n.d.
Ácido $\alpha$ -linolênico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,42	11,71	5,04	n.d.	7,73
Linolenato de etila	1,80	0,64	0,89	3,46	0,51	0,41	1,46	1,00	3,19	0,85	1,00	n.d.	0,94	0,78
Heneicosano	7,36	5,02	6,08	20,28	0,59	0,80	8,55	1,46	4,10	5,39	4,00	1,22	9,64	2,97
2-metil octacosano	0,57	1,16	1,52	4,05	3,75	4,43	0,77	n.d.	0,80	n.d.	n.d.	0,79	0,72	n.d.
Esqualeno	0,65	n.d.	n.d.	0,78	1,13	n.d.	0,83	0,80	0,74	1,39	2,04	n.d.	0,86	0,72
Octacosanol	15,46	9,80	7,32	n.d.	0,96	1,39	3,88	12,99	5,02	n.d.	1,89	n.d.	14,94	n.d.
$\gamma$ -Tocoferol	3,03	3,46	3,62	5,01	6,49	4,44	3,31	4,37	3,75	6,46	2,63	2,16	4,19	3,65
Tetratetracontano	9,15	n.d.	5,14	n.d.	n.d.	n.d.	2,98	0,65	2,71	0,95	4,16	3,52	8,25	1,37
$\alpha$ -Tocoferol	22,62	24,64	26,17	35,22	44,70	41,99	26,54	32,01	29,13	44,20	48,76	24,82	31,05	27,82
Octacosanal	10,42	4,45	1,21	1,54	n.d.	1,45	10,51	n.d.	n.d.	n.d.	3,91	1,13	6,02	n.d.
Pentacosano	n.d.	3,61	n.d.	1,35	n.d.	n.d.	8,06	14,10	n.d.	n.d.	n.d.	1,26	2,58	n.d.
$\beta$ -Sitosterol	1,85	2,61	2,51	6,34	2,46	7,13	2,29	2,68	2,66	11,93	3,85	10,92	2,41	21,57
Outros	3,01	1,36	0,00	13,32	27,54	22,78	24,6	1,40	13,00	3,98	1,31	40,03	8,8	4,15
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

n.d.: Não detectados; <sup>1</sup>50 °C, 50% da potência, 15 min e razão solvente/folha 15 mL.g<sup>-1</sup>; <sup>2</sup>100 bar 50 °C; <sup>3</sup>200 bar e 50 °C; <sup>4</sup>CS: Cossolvente: 200 bar, 50 °C e Rm: 1:1.

A análise dos extratos revelou que as folhas de *B. forficata* contém vários compostos fitoquímicos que podem contribuir para a bioatividade desta espécie, entre eles os tocoferóis, sitosteróis e o octacosanol. A maioria dos compostos se repete em todas as amostras, a maior diferença é a proporção de cada um deles, que depende do método e do solvente utilizado.

O principal composto identificado, em termos de área de pico relativa (%), foi o  $\alpha$ -tocoferol, com áreas relativas variando entre 22,62% e 48,76%. Os tocoferóis são compostos fenólicos extremamente valiosos devido aos seus benefícios à saúde e pelo papel importante desempenhado na prevenção de certos tipos de câncer e doenças cardiovasculares. Eles estão entre os antioxidantes lipossolúveis mais importantes encontrados em óleos vegetais (Shahidi e Camargo, 2016). O composto  $\gamma$ -tocoferol também foi encontrado em todos os extratos, mas em menores quantidades (2,16% a 6,46%).

Outro composto importante presente nos extratos é o fitol, principalmente nos extratos obtidos por Soxhlet utilizando acetato de etila (29,54%). Este composto possui propriedades antimicrobianas, anticancerígenas, diuréticas e anti-inflamatórias (Ogunlesi *et al.*, 2009; Saravanan *et al.*, 2018).

As ceras cuticulares também foram encontradas em grandes quantidades, entre elas o octacosanol (até 15,46% de área relativa) e o heneicosano (0,59% a 20,28%) enquanto que tetracosano, pentacosano, trietracontano e pentatriacontano foram encontrados em menores quantidades.

Octacosanol tem sido reportado como um composto que exhibe várias atividades biológicas importantes para humanos e roedores, incluindo propriedades antioxidantes e com efeito de baixar o colesterol (Markom *et al.*, 2007). O  $\beta$ -Sitosterol é um fitosterol presente em muitas espécies do gênero *Bauhinia* (Mazzutti *et al.*, 2017) e foi encontrado em pequenas quantidades em todos os extratos (de 1,85% a 21,57%). De acordo com a revisão feita por Meireles (2008), os fitosteróis possuem a capacidade de diminuir o colesterol, reduzir o câncer de cólon em ratos, mas não há evidências que possuam o mesmo efeito em humanos, além disso, possuem propriedades que causam liberação de insulina para diabéticos.

Outros compostos foram detectados pelo cromatógrafo gasoso, porém, eles não foram identificados com precisão ou apresentaram áreas muito baixas.

Como a composição química dos extratos é variada e todos apresentaram compostos com propriedades benéficas à saúde humana não foi possível indicar qual o

melhor extrato ou a melhor técnica de extração, uma vez que depende da aplicação do extrato. Além disso, os flavonoides, compostos conhecidos por suas propriedades farmacológicas são analisados por esta técnica por não serem voláteis.

#### 5.4. Quantificação de canferitrina nos extratos das folhas de *B. forficata*

Como descrito no tópico 3.1.2, os principais fitoconstituintes das espécies de *Bauhinia* são flavonoides glicosilados, a maioria derivados de caempferol e quercetina. A *B. forficata* é conhecida pela presença de canferitrina, um flavonoide considerado marcador químico das folhas desta espécie e relatado por seu efeito hipoglicemiante.

Foram realizadas análises cromatográficas por HPLC-ESI-MS/MS a fim de quantificar a canferitrina nos extratos. Foi utilizado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), uma técnica capaz analisar misturas complexas que estão sendo separadas pela cromatografia, sendo constantemente e quantitativamente monitoradas para detectar a presença de espécies específicas. Nos cromatogramas, o eixo x representa o tempo, em minutos, e no eixo y a contagem total de íons. A Figura 31 apresenta o cromatograma obtido da injeção do diluente (Etanol-Água (1:1)).

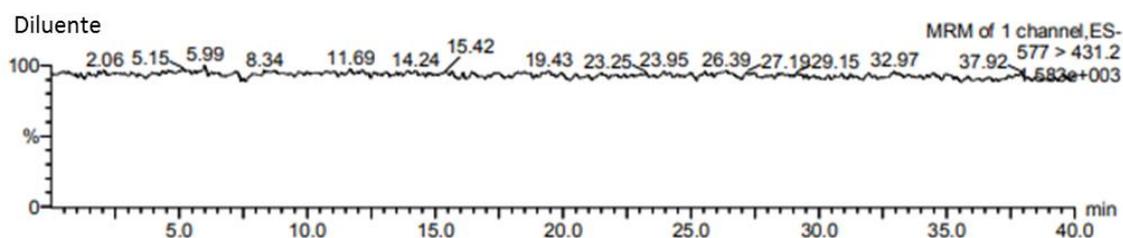


Figura 31. Cromatograma da solução diluente

A quantificação foi feita com base nas áreas dos picos referentes à canferitrina injetando-se soluções padrões de canferitrina com concentrações de 1 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $R^2=0,988$ ). A Figura 32 exhibe o cromatograma obtido da injeção da solução padrão de canferitrina na concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

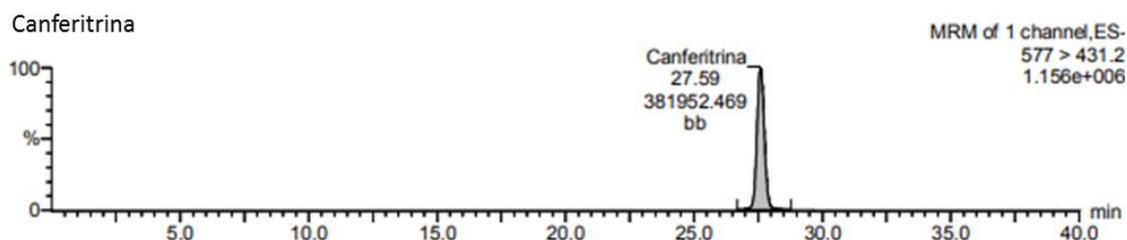


Figura 32. Cromatograma obtido da injeção da solução padrão de canferitrina na concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

A Figura 33 apresenta os espectros MS e MS/MS, respectivamente, da canferitrina nos quais é possível identificar o íon molecular da canferitrina  $[\text{M}+\text{H}]^+$  577 m/z e o íon produto 431 m/z.

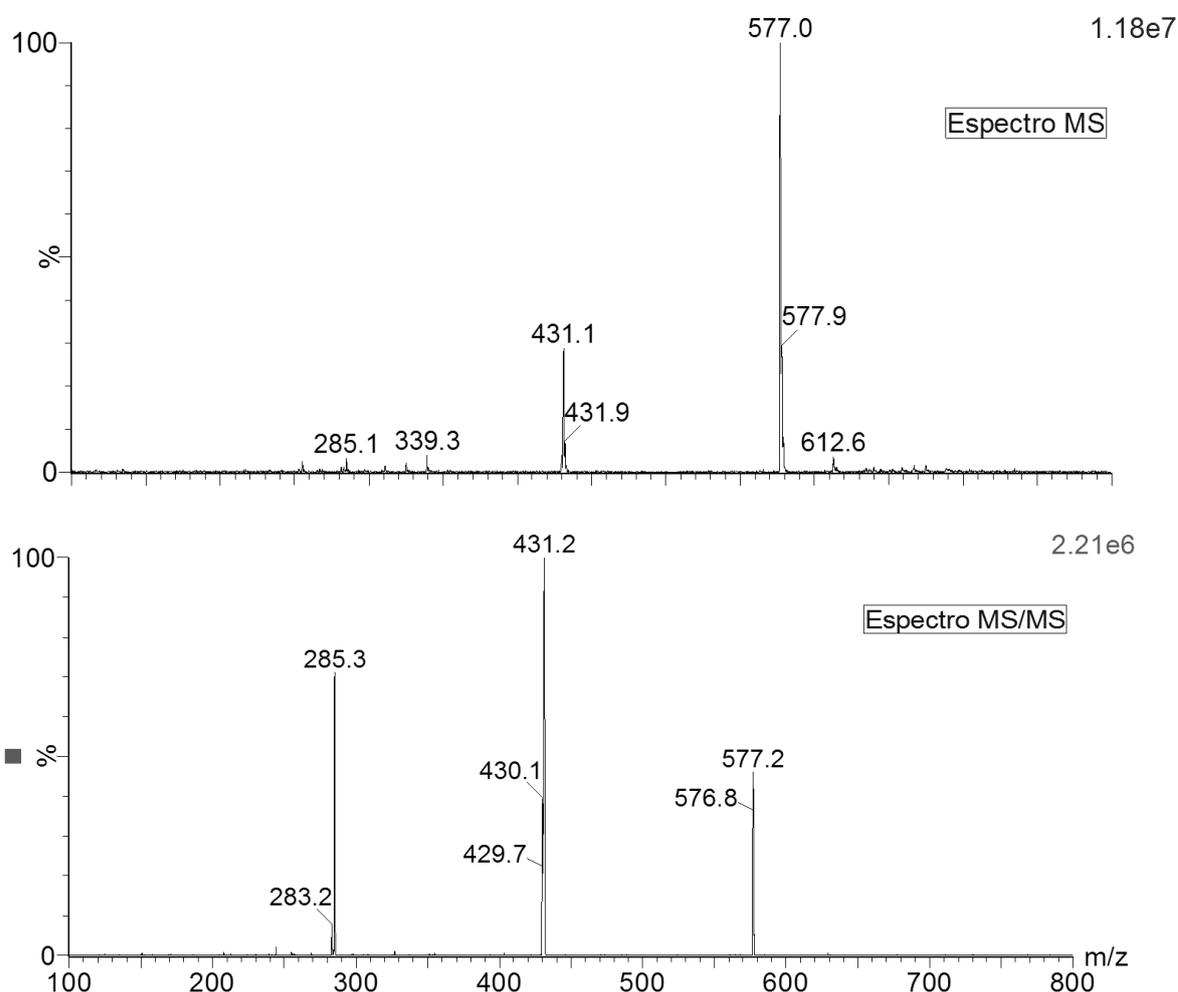


Figura 33. Espectro MS e MS/MS do padrão canferitrina

O perfil cromatográfico foi o mesmo para todas as amostras, a Figura 34 apresenta os cromatogramas obtidos da injeção das amostras preparadas com os extratos obtidos por líquido pressurizado com os solventes *n*-hexano e etanol, mostrando a diferença entre as áreas dos picos relacionados à canferitrina.

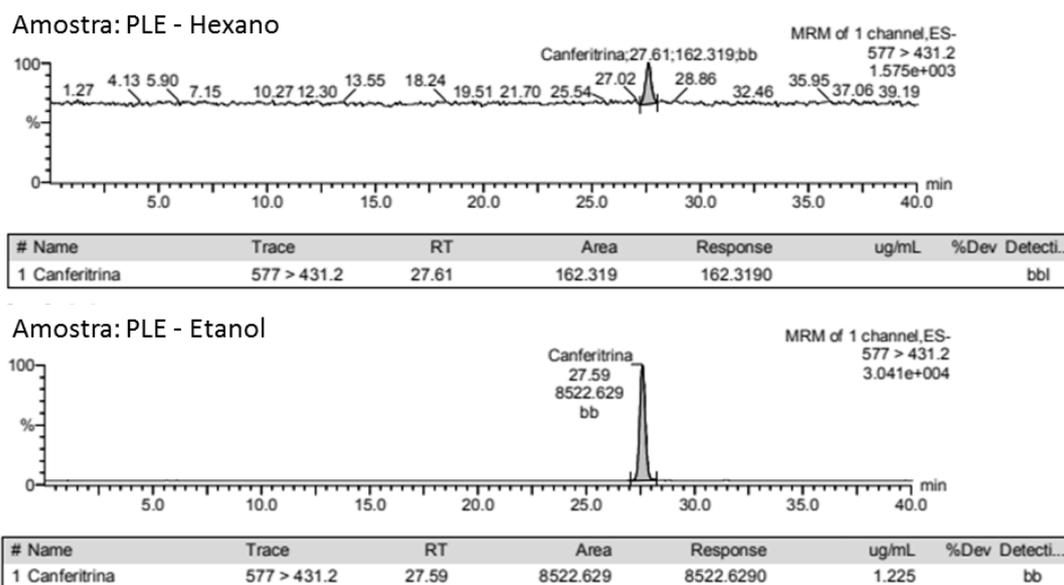


Figura 34. Cromatogramas obtidos da injeção das amostras preparadas com extratos de PLE – Hexano e PLE-Etanol a 50 °C

As análises cromatográficas por HPLC-ESI-MS/MS a detecção de um pico intenso com tempo de retenção de aproximadamente 27,6 min. O acoplamento do HPLC com analisador de massas mostrou alta seletividade, uma vez que apenas os íons derivados do analito de interesse foram monitorados pelo monitoramento de reação múltipla (MRM).

A Tabela 21 apresenta o teor de canferitrina dos extratos, dados em microgramas de canferitrina por grama de extrato, calculados com base na área dos picos das amostras em relação á área dos picos das soluções padrões.

Tabela 21. Teor de canferitrina dos extratos das folhas de *B. forficata* obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados

Método	Solvente	TC ( $\mu\text{g C}\cdot\text{g}_{\text{ext}}^{-1}$ )
PLE	EtOH	0,487
	AcEt	0,142
	Hex	0,010
UAE <sup>1</sup>	EtOH	0,450
	AcEt	0,256
	Hex	0,026
Sox	EtOH	0,360
	AcEt	0,883
	Hex	0,002
SFE <sup>2</sup>	CO <sub>2</sub>	0,000
CS <sup>2</sup>	CO <sub>2</sub> + EtOH	0,108

PLE: Extração com líquido pressurizado; UAE: Extração assistida por ultrassom; Sox: Soxhlet; SFE: Extração com fluido supercrítico; CS: extração com CO<sub>2</sub> supercrítico com cossolvente; TC: teor de canferitrina; <sup>1</sup>50 °C, 50% da potência, 15 min e razão solvente/folha 15 mL.g<sup>-1</sup>; <sup>2</sup>200 bar e 50 °C; <sup>3</sup>200 bar, 50 °C e Rm: 1:1.

Por falta de folhas de mesmo lote para realizar mais extração e pela pouca quantidade de extrato restante, não foram realizadas análises dos extratos obtidos por maceração, tampouco foram realizadas réplicas das análises.

O maior teor de canferitrina foi encontrado no extrato obtido pelo método de Soxhlet, utilizando acetato de etila como solvente ( $0,883 \mu\text{g EC}\cdot\text{g}_{\text{ext}}^{-1}$ ). Andrade *et al.* (2012), Mazzutti *et al.* (2012) e Guindani *et al.* (2016) obtiveram extratos de casca e grãos de café moídos, *Agaricus brasiliensis* e sementes de chia (*Salvia hispânica*), respectivamente, com elevados teores de compostos fenólicos ao utilizarem o acetato de etila como solvente (comparado a outros solventes). Esses resultados indicam que o acetato de etila é muito efetivo na extração de compostos fenólicos a partir de diversas matérias primas.

O Soxhlet foi o único método em que o acetato de etila obteve o teor mais elevado. Para os métodos PLE e UAE, o etanol foi o solvente que proporcionou maiores teores de canferitrina nos extratos. Segundo Guindani *et al.* (2016), diferentes métodos de extração promovem diferentes interações soluto-solvente dessa forma, em alguns métodos o etanol proporciona maiores teores de canferitrina, enquanto em outras o acetato de etila é o solvente mais interessante.

Como é possível observar na Tabela 21, os solventes apolares,  $\text{CO}_2$  e *n*-hexano, são pouco efetivos na extração da canferitrina, não sendo detectado no extrato obtido por extração supercrítica e tendo baixos teores nos outros métodos de extração com *n*-hexano. A adição de etanol como cossolvente na extração supercrítica tornou possível a extração da canferitrina por este método.

Marques *et al.* (2013) avaliaram o teor de canferitrina de extratos de *B. forficata* das cidades de Viçosa e de Telêmaco Borba, ambas no Paraná, obtidos por refluxo de solução etanol:água 40% (v/v), por 30 minutos, em banho-maria. Eles obtiveram uma concentração de  $0,01044 \text{ mg EC}\cdot\text{mL}^{-1}$  de solução extrativa ( $10 \text{ mg de extrato}\cdot\text{mL}^{-1}$  de solvente, resultado em um teor de  $1,044 \mu\text{g EC}\cdot\text{g}_{\text{ext}}^{-1}$ ) da planta coletada em Viçosa e não observaram este composto no extrato da planta coletada em Telêmaco Borba. Comparando os resultados obtidos neste trabalho com o obtido por Marques *et al.* (2013) da planta coletada em Viçosa, os teores apresentados no presente trabalho foram um pouco menores. Tal variação pode estar relacionada com o método de extração, solvente utilizado na extração e na variação das matérias-primas, que estão relacionadas com a localização geográfica, quantidade de chuvas, entre outras variações.

## 5.5. Determinação do Teor de Flavonoides Totais

Os extratos obtidos das folhas de *B. forficata* foram analisados quanto ao teor de flavonoides totais. Os resultados dos métodos supercrítico, Soxhlet, UAE e maceração são apresentados na Tabela 22.

**Tabela 22. Teor de flavonoides totais dos extratos das folhas de *B. forficata* obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados.**

Método	Solvente	TFC (mg EQ·g <sub>extrato</sub> <sup>-1</sup> )
Sox	EtOH	57,21±2,38 <sup>a</sup>
	AcEt	49,82±3,88 <sup>ab</sup>
	Hex	4,95±0,56 <sup>c</sup>
Mac	EtOH	48,54±4,68 <sup>ab</sup>
	AcEt	40,11±6,47 <sup>b</sup>
	Hex	4,99±1,49 <sup>c</sup>
UAE <sup>1</sup>	EtOH	58,51±3,72 <sup>a</sup>
	AcEt	46,04±5,31 <sup>b</sup>
	Hex	7,78±1,28 <sup>c</sup>
SFE <sup>2</sup>	CO <sub>2</sub>	4,54±1,00 <sup>c</sup>

Sox: Soxhlet; Mac: maceração; UAE: Extração assistida por ultrassom; SFE: Extração com fluido supercrítico; TFC: Teor de flavonoides totais expresso em EQ·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>; <sup>1</sup>50 °C, 50% da potência, 15 min e razão solvente/folha 15 mL.g<sup>-1</sup>; <sup>2</sup>200 bar e 50 °C. As mesmas letras na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de 5%.

Como podem ser observados na Tabela 22, os maiores valor de TFC foram obtidos usando etanol como solvente, seguido do acetato de etila, enquanto que os menores valores foram obtidos com os solventes *n*-hexano e CO<sub>2</sub>, considerados estatisticamente iguais de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Os valores obtidos para os métodos Soxhlet e UAE foram considerados estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a um nível de 5% de significância e apresentaram os melhores resultados.

A Tabela 23 apresenta os resultados da análise de flavonoides dos extratos obtidos nas extrações com líquido pressurizado com os três solventes e nas três temperaturas testadas.

**Tabela 23. Teor de flavonoides totais dos extratos das folhas de *B. forficata* obtidos nas extrações com líquido pressurizado**

Método	Solvente	Temperatura (°C)	TFC (mg EQ·g <sub>extrato</sub> <sup>-1</sup> )
PLE	EtOH	40	68,49±6,23 <sup>a</sup>
		50	51,05±5,61 <sup>b</sup>
		60	56,59±2,79 <sup>ab</sup>
	AcEt	40	43,39±6,07 <sup>b</sup>
		50	39,88±3,30 <sup>b</sup>
		60	42,44±3,08 <sup>b</sup>
	Hex	40	12,31±5,35 <sup>c</sup>
		50	9,54±2,66 <sup>c</sup>
		60	8,72±4,81 <sup>c</sup>

A mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de 5%.

Os resultados indicam claramente que a extração dos flavonoides foi afetada pela polaridade do solvente em todos os métodos testados. De acordo com Jovanovic *et al.* (2017), o etanol interage com os flavonoides por interações não covalentes, o que promove uma rápida difusão no meio de extração.

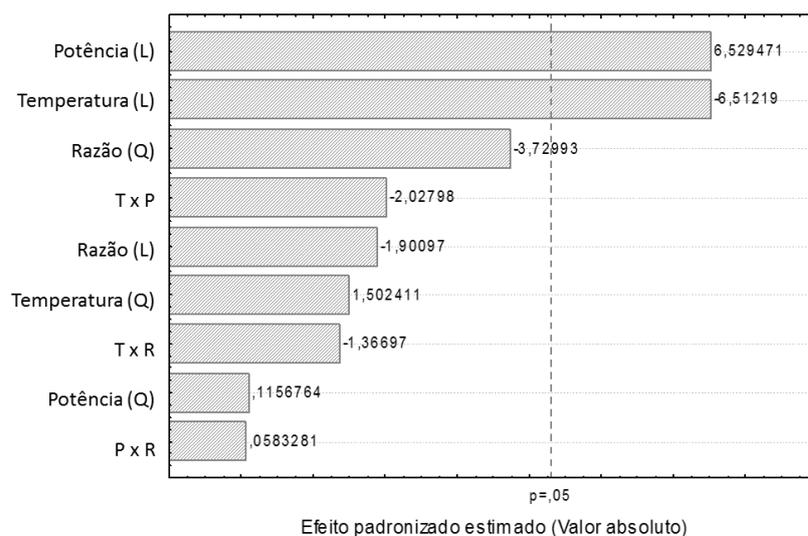
Dessa forma, o etanol foi o solvente escolhido para fazer a otimização do método de UAE assim como as extrações supercríticas com adição de cossolvente. O mesmo planejamento Box-Behnken com 15 experimentos foi empregado para investigar o efeito das variáveis temperatura, potência e razão solvente/folha no teor de flavonoides totais. A Tabela 24 apresenta os resultados experimentais para cada condição avaliada.

**Tabela 24. Variáveis independentes do planejamento Box-Behnken utilizadas nas extrações assistidas por ultrassom usando etanol como solvente e teor de flavonoides**

Exp.	Condições de extração			TFC (mg EQ·g <sub>extrato</sub> <sup>-1</sup> )
	Temperatura (°C)	Potência (%)	Razão solvente/folha (mL·g <sup>-1</sup> )	
1	40	50	20	64,46
2	60	50	20	54,59
3	40	50	10	66,04
4	60	50	10	61,13
5	40	20	15	56,67
6	60	20	15	51,02
7	40	80	15	68,51
8	60	80	15	55,48
9	50	20	20	58,09
10	50	20	10	59,02
11	50	80	20	66,82
12	50	80	10	67,54
13	50	50	15	59,34
14	50	50	15	61,32
15	50	50	15	57,69

O menor valor de TFC dos extratos das folhas de *B. forficata* obtidos por UAE foi de 51,02 mg EQ·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>, obtido sob as condições de extração: 20% da potência, 60 °C e razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup>, enquanto que o maior valor de TFC (68,51 mg EQ·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>) foi alcançado a 80% da potência, 40 °C e razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup>.

O gráfico de Pareto da Figura 35 permite visualizar os efeitos das variáveis potência, temperatura e razão solvente/folha no teor de flavonoides dos extratos.



**Figura 35. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis potência, razão e temperatura no teor de flavonoides dos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom**

O fator mais dominante no valor de TFC foi a potência em seu termo linear (Figura 35), seguido do efeito negativo da temperatura em seu termo linear. Na Figura 36 estão apresentadas as superfícies de resposta, em que a Figura 36 (a) ilustra os efeitos da potência e da temperatura no valor de TFC, considerando uma razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup>. Um aumento notável foi observado quando a potência máxima foi atingida. Como descrito anteriormente, uma potência ultrassônica relativamente alta no meio sonificado pode resultar na destruição das paredes celulares a uma taxa elevada e liberar os compostos que serão extraídos.

O valor de TFC diminuiu com o aumento da temperatura em todas as condições testadas, conforme Tabela 24 e Figura 36 (b). De acordo com Silva, Rogez e Larondelle (2007), alguns flavonoides são termosensíveis (principalmente antocianinas e derivados de flavan-3-óis), e considerando o alto teor de flavonoides nas folhas de *B. forficata*, a temperatura de extração deve ser mantida dentro de certo limite.

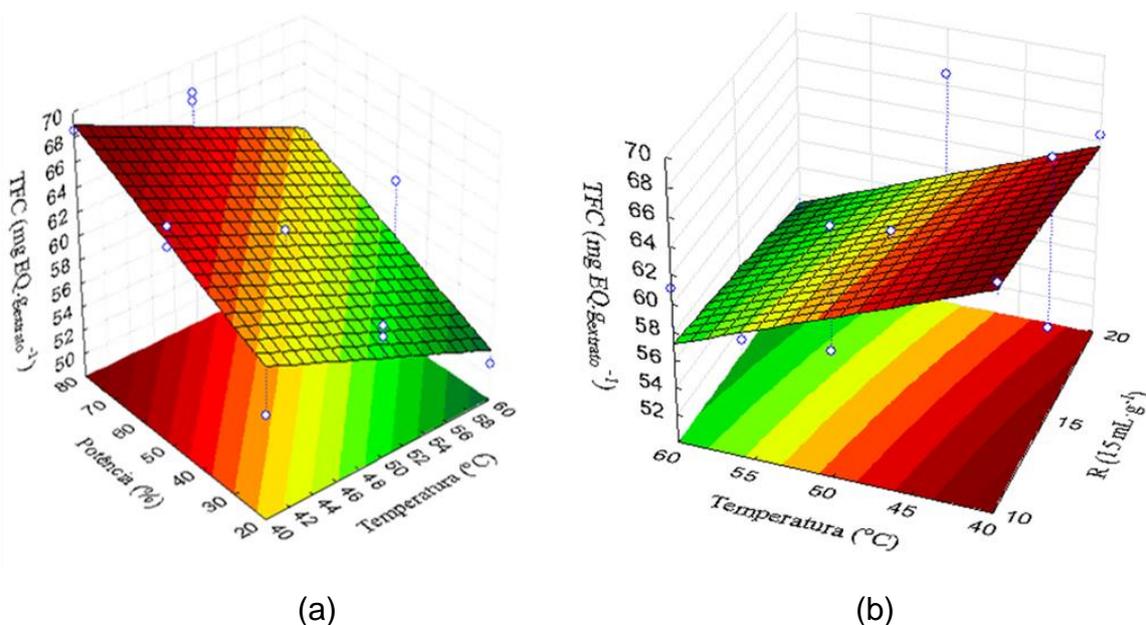


Figura 36. Superfícies de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração temperatura, razão solvente/folha e potência no TFC.

O modelo polinomial de segunda ordem que descreve o efeito dos fatores independentes codificados na resposta TFC é dado pela Equação (35), a seguir:

$$TFC = 61,00 - 4,18 \cdot X_1 + 4,19 \cdot X_2 - 1,82 \cdot X_3^2 \quad (35)$$

Em que  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  representam os fatores codificados temperatura, potência e razão solvente:folha, respectivamente.

Este modelo foi analisado utilizando a ANOVA (Tabela 25) e apresentou um coeficiente de correlação de 0,862.

Tabela 25. Análise de variância para predição do teor de flavonoides dos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom considerando 95% de confiança

Fonte de variação	Soma quadrática	GL <sup>a</sup>	Média Quadrática	F calc.	F tab.	p-valor
Regressão	330,10	3	110,03	22,84	3,59 <sup>b</sup>	0,036
Resíduo	52,99	11	4,82			
Falta de ajuste	46,39	9	5,15	1,56	5,71 <sup>c</sup>	0,451
Erro puro	6,60	2	3,30			
Total	383,09	14				

% de variação explicada: 86,2%  
% máxima de variação explicável: 98,3%

<sup>a</sup> Número de graus de liberdade; <sup>b</sup> F<sub>tabelado</sub>(3;11;0,05); <sup>c</sup> F<sub>tabelado</sub>(9;2;0,05);

O modelo estatístico foi significativo e o p-valor para o teste de falta de ajuste foi não-significativo, considerando erro puro.

Para investigar o efeito das variáveis temperatura, pressão e relação mássica de cossolvente:folha na extração supercrítica com cossolvente no teor de flavonoides o mesmo planejamento experimental 2<sup>3</sup> com repetição no ponto central com 11 experimentos foi empregado. A Tabela 26 apresenta os resultados experimentais para cada condição avaliada. Além do teor de flavonoides dado em miligrama equivalente de quercetina por grama de extrato, é apresentado o teor equivalente de quercetina por grama de folha, onde o rendimento da extração é levado em consideração.

**Tabela 26. Variáveis independentes do planejamento 2<sup>3</sup> com repetição no ponto central utilizadas na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico usando etanol como cossolvente e teor de flavonoides**

Exp.	Condições de extração				TFC (mg EQ·g <sub>extrato</sub> <sup>-1</sup> )	TFC (mg EQ·g <sub>folha</sub> <sup>-1</sup> )
	T (°C)	P (bar)	$\rho_f$ (kg·m <sup>-3</sup> ) <sup>1</sup>	Rm (g <sub>etanol</sub> :g <sub>folha</sub> )		
1	40	180	819,51	0,5:1	70,80	0,625
2	60	180	687,25	0,5:1	62,50	0,678
3	40	220	857,20	0,5:1	73,84	0,752
4	60	220	752,38	0,5:1	67,67	0,912
5	40	180	819,51	1,5:1	51,76	1,461
6	60	180	687,25	1,5:1	59,26	1,663
7	40	220	857,20	1,5:1	31,24	1,592
8	60	220	752,38	1,5:1	38,36	1,178
9	50	200	784,29	1,0:1	59,52	1,028
10	50	200	784,29	1,0:1	55,50	0,905
11	50	200	784,29	1,0:1	58,18	0,957

<sup>1</sup>NIST - National Institute of Standards and Technology; T: temperatura; P: pressão;  $\rho_f$ : Densidade do CO<sub>2</sub>;

O maior teor de flavonoides por grama de extrato obtido pelo método de extração supercrítica com adição de cossolvente (73,84 mg EQ·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>) foi alcançado aplicando a menor temperatura, maior pressão e a menor razão solvente:folha do planejamento experimental (40 °C, 220 bar e 0,5:1), e o menor teor de flavonoides por grama de extrato (31,24 mg EQ·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>) foi obtido na menor temperatura, na maior pressão e maior razão solvente:folha do planejamento experimental (40 °C, 220 bar e 1,5:1, respectivamente).

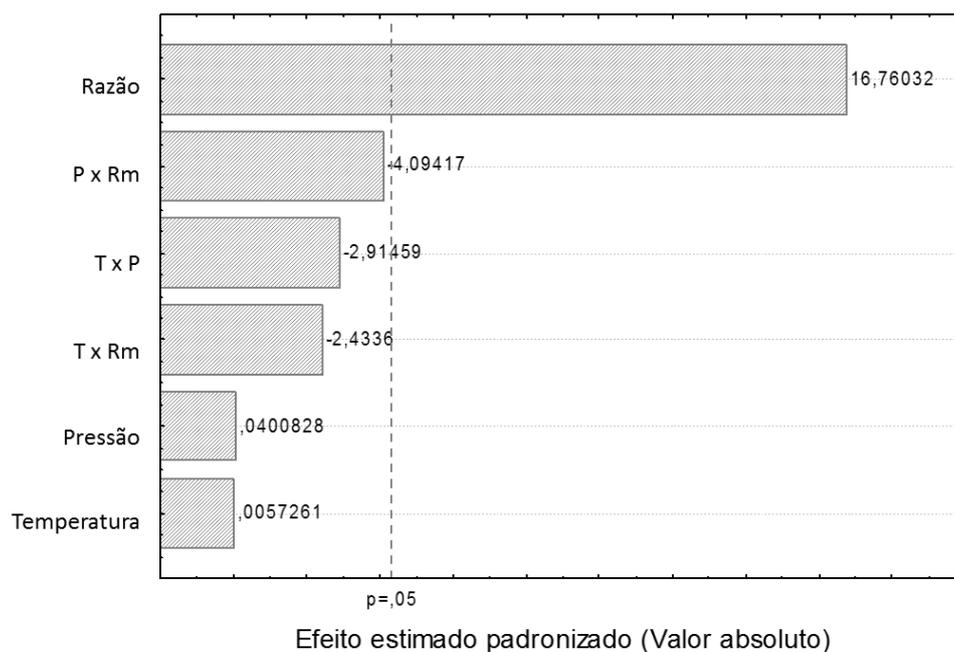
Observa-se que, em geral, ao aumentar a temperatura, a pressão de extração e a quantidade de cossolvente, há um aumento na quantidade de flavonoides extraídos por grama de folhas. Como descrito nos tópicos 3.4.4 e 5.2.4, o aumento na pressão pode levar a rupturas na matriz vegetal, facilitando a liberação de flavonoides, assim como de outros compostos. Nas condições em que a maior quantidade de cossolvente foi adicionada, observa-se que houve uma redução da quantidade de flavonoides por grama

de extrato com o aumento da pressão, provavelmente pelo esgotamento dos flavonoides presentes na matriz e a extração de outros compostos.

Segundo Garcia-Mendoza *et al.* (2017), temperaturas elevadas enfraquecem as interações soluto-matriz e facilitam a difusão das substâncias pela diminuição da viscosidade e da tensão superficial do solvente. Assim como houve um aumento da quantidade de flavonoides com o aumento da temperatura, outros compostos também foram extraídos, principalmente na condição de menor quantidade de cossolvente adicionado, uma vez que o teor de flavonoides por grama de extrato diminuiu nestas condições com o aumento da temperatura.

O efeito mais significativo na quantidade de flavonoides extraído por grama de folhas, como pode ser visto no Diagrama de Pareto da Figura 37, foi a razão mássica de cossolvente. A presença do etanol como cossolvente aumenta a polaridade do fluido de extração e facilita a extração de constituintes polares das plantas. Como o teor de flavonoides por grama de extrato diminuiu com o aumento da quantidade de cossolvente, infere-se que houve o aumento da extração também de outros compostos polares.

Análises estatísticas foram realizadas visando determinar os efeitos das variáveis (temperatura, pressão e razão solvente:folha) sobre a quantidade de flavonoides extraída por grama de folhas.



**Figura 37. Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão, temperatura e razão solvente:folha no teor de flavonoides dos extratos por grama de folha obtidos por SFE com adição de cossolvente**

O único efeito significativo a 95% de confiança foi a razão solvente:folha. Neste caso foi considerado erro puro, uma vez que os desvios foram obtidos a partir das repetições do experimento. O modelo estatístico que prediz o teor de flavonoides por grama de folha em função das variáveis independentes codificadas temperatura (T), pressão (P) e razão mássica solvente e folha (Rm) é dado pela Equação (36).

$$TFC \text{ (mg EQ} \cdot \text{g}_{\text{folha}}^{-1}\text{)} \\ = 1,068 + 0,001 \cdot P + 0,366 \cdot Rm - 0,064 \cdot P \cdot T - 0,053 \cdot T \cdot Rm \\ - 0,089 \cdot P \cdot Rm \text{ (36)}$$

A validade do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 27.

**Tabela 27. Análise de variância para predição do teor de flavonoides dos extratos obtidos na extração supercrítica com cossolvente considerando 95% de confiança**

Fonte de variação	Soma quadrática	GL <sup>a</sup>	Média Quadrática	F calc.	F tab.	p-valor
Regressão	1,189	6	0,198	6,60	6,163 <sup>b</sup>	0,044
Resíduo	0,119	4	0,030			
Falta de ajuste	0,111	2	0,055	13,87	19,00 <sup>c</sup>	0,064
Erro puro	0,008	2	0,004			
Total	1,308	10				

% de variação explicada: 90,95%

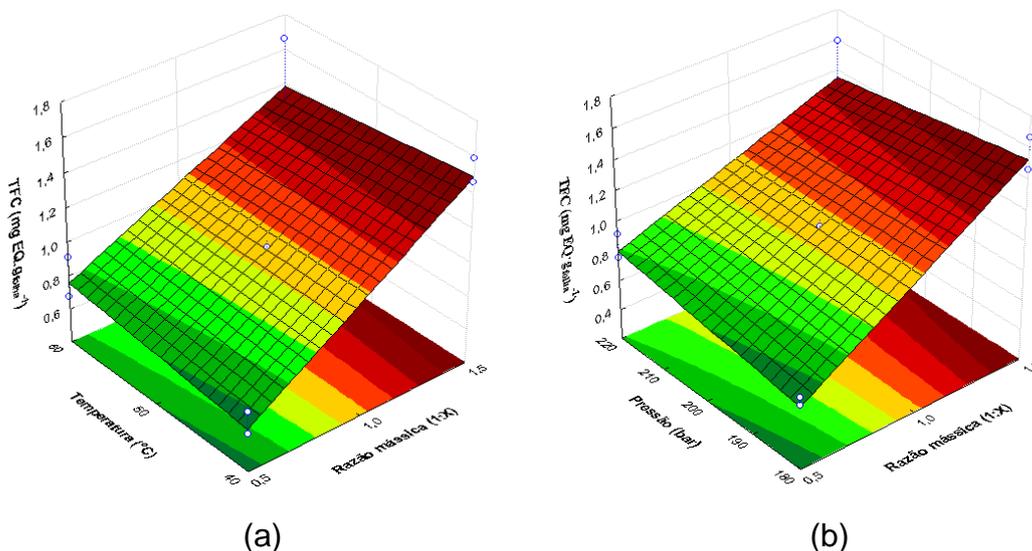
% máxima de variação explicável: 99,39%

<sup>a</sup> Número de graus de liberdade; <sup>b</sup> F<sub>tabelado</sub>(6;4;0,05); <sup>c</sup> F<sub>tabelado</sub>(2;2;0,05).

O modelo estatístico é significativo, ou seja, se ajusta aos dados experimentais e explicou 90,95% das variações entre os valores experimentais e os previstos pelo mesmo, indicando uma boa concordância.

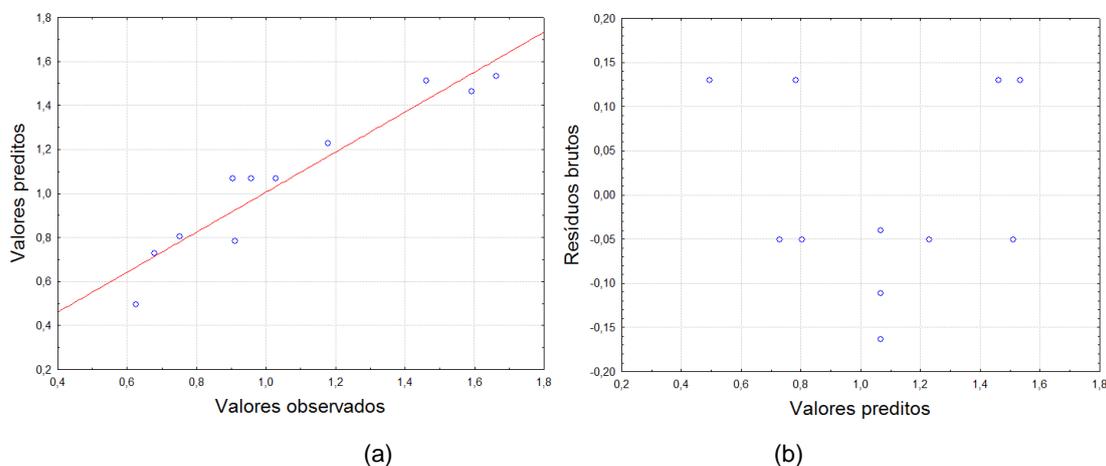
Na Figura 38 são apresentados os efeitos a partir de superfícies de resposta, nas quais é possível verificar o sentido da região ótima, com maior quantidade de flavonoides extraídos por massa de folha. Na Figura 38 (a), foi fixada a pressão em 200 bar e observa-se que quanto maior a quantidade de etanol utilizada como cossolvente, maior a quantidade de flavonoides extraída por massa de folha. A temperatura, por outro lado, teve pouco efeito e esse efeito variou com a quantidade de cossolvente adicionada, na razão mássica de 1,5:1 o aumento da temperatura diminuiu a quantidade de flavonoides extraída, já na razão mássica de 0,5:1, o aumento da temperatura

favoreceu a extração. Na Figura 38 (b) a temperatura foi fixada em 50 °C, observa-se que a pressão também não apresentou grande influencia no teor de flavonoides, na condição de 0,5 gramas de etanol por grama de folha, o aumento da pressão favoreceu a extração de flavonoides e na condição de 1,5 gramas de etanol por grama de folha, o efeito da pressão foi o inverso.



**Figura 38. Superfície de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração pressão, razão mássica e temperatura no teor de flavonoides por grama de folha dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente.**

A Figura 39 apresenta os gráficos de resíduos, o gráfico de valores observados x valores preditos, a Figura 39 (a) indica que o modelo prevê corretamente o comportamento observado experimentalmente. O gráfico de valores preditos x resíduos brutos, na Figura 39 (b) indica que os resíduos estão dispersos aleatoriamente em torno de zero, com variância constante, concentrados entre -0,20 e 0,20.



**Figura 39. Gráficos de resíduos do modelo estatístico para teor de flavonoides da extração com fluido supercrítico com adição de cossolvente.**

Outros pesquisadores também extraíram flavonoides da *B. forficata* (Marques *et al.*, 2013; Souza, Bott e Oliveira, 2007), no entanto, é difícil comparar os resultados devido às diferenças no solvente utilizado, no método de extração, nas condições aplicadas, na localização geográfica onde a planta foi cultivada, na época da colheita e no modo de expressar os resultados. Souza, Bott e Oliveira (2007) investigaram três métodos de extração: reator aquecido e agitado, maceração e sonicação, usando água/etanol (2:1) como solvente. Eles obtiveram resultados entre 0,07 e 0,09%  $\text{g}_{\text{flav}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$  (0,7 e 0,9 mg EQ  $\cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ) em um banho de ultrassom durante 0,5, 1,0, 1,5 e 2 horas e 0,08 a 0,10%  $\text{g}_{\text{flav}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$  (0,8 a 1,0 mg EQ  $\cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ) por maceração com agitação esporádica durante 24 a 168 horas. Esses resultados são muito menores do que os obtidos no presente trabalho, que pode ser justificado pela localização geográfica da coleta ser diferente, o solvente utilizado e as condições aplicadas. Além disso, não é possível saber se a subespécie utilizada é a *pruinosa* ou se é a *Bauhinia forficata* subsp. *forficata*.

Em geral, o método de extração com cossolvente foi o que resultou em maiores teores de flavonoides por grama de extrato. Os métodos de extração com líquido pressurizado e ultrassom resultaram em teores de flavonoides estatisticamente iguais a 95% de confiança.

## 5.6. Determinação do Teor de Fenólicos Totais

De acordo com Mezzomo *et al.* (2010), o teor de fenólicos totais (TPC), determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, fornece uma boa estimativa do potencial antioxidante, uma vez que os compostos fenólicos são os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante de extratos de produtos naturais.

Os valores de TPC determinados para os extratos obtidos das folhas de *B. forficata* com CO<sub>2</sub> supercrítico, bem como os obtidos pelos métodos de Soxhlet, UAE e maceração são apresentados na Tabela 28.

Da Tabela 28, pode ser observado que a escolha do método não teve grande influência no valor de TPC, por outro lado, as diferenças foram mais significativas considerando-se o solvente utilizado na extração. De acordo com Boeing *et al.*, (2014), a recuperação de compostos fenólicos por meio de extrações depende do solvente utilizado e de sua polaridade, assim como observado no caso dos flavonoides. Os maiores valores de TPC foram obtidos quando o etanol foi utilizado como solvente de

extração. Os altos valores de TPC obtidos com etanol podem ser atribuídos a melhor solvatação dos compostos fenólicos nesse solvente devido às interações (ligações de hidrogênio) entre as regiões polares das moléculas fenólicas e o solvente (Ho *et al.*, 2018). Quando solventes apolares, tais como *n*-hexano e CO<sub>2</sub>, são usados, extratos lipídicos com baixos valores de TPC são obtidos (Mazzutti *et al.*, 2017).

**Tabela 28. Teor de fenólicos totais dos extratos das folhas de *B. forficata* obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados.**

Método	Solvente	TPC (mg EAG·g <sub>extrato</sub> <sup>-1</sup> )
Sox	Hex	4,94±0,97 <sup>d</sup>
	AcEt	33,25±2,93 <sup>c</sup>
	EtOH	58,58±3,57 <sup>a</sup>
Mac	Hex	2,00±0,20 <sup>d</sup>
	AcEt	33,95±2,94 <sup>c</sup>
	EtOH	45,09±1,60 <sup>b</sup>
UAE <sup>1</sup>	Hex	5,55±0,64 <sup>d</sup>
	AcEt	36,21±2,37 <sup>c</sup>
	EtOH	45,69±3,10 <sup>b</sup>
SFE <sup>2</sup>	CO <sub>2</sub>	5,81±1,05 <sup>d</sup>

Sox: Soxhlet; Mac: maceração; UAE: Extração assistida por ultrassom; SFE: Extração com fluido supercrítico; TPC: Teor de fenólicos totais expresso em EAG·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>; <sup>1</sup>50 °C, 50% da potência, 15 min e razão solvente/folha 15 mL.g<sup>-1</sup>; <sup>2</sup>200 bar e 50 °C. As mesmas letras na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de 5%.

O acetato de etila, que possui polaridade intermediária, apresentou valores de TPC que estavam entre os obtidos com etanol e com *n*-hexano. Além disso, o acetato de etila possui menor eficiência de solvatação quando comparado ao etanol, pois as moléculas de acetato de etila são apenas aceitadoras de prótons enquanto que o etanol é um doador de próton (Boeing *et al.*, 2014; Nicácio *et al.*, 2017).

Esses dados estão consistentes com os encontrados por Andrade *et al.* (2012), que obtiveram os melhores resultados em relação ao teor de fenólicos utilizando etanol e acetato de etila como solvente na extração das cascas de café usando o método de Soxhlet. Guindani *et al.* (2016) também obtiveram extratos com maiores valores de TPC utilizando acetato de etila e etanol como solvente. Tais resultados indicam que o etanol e o acetato de etila são efetivos na extração e compostos fenólicos, proporcionando valores de TPC relativamente altos para extratos de diferentes materiais.

Embora a maioria dos compostos fenólicos seja polar, algumas dessas substâncias apresentam uma ampla faixa de polaridade e podem ser solubilizadas por

CO<sub>2</sub> supercrítico e *n*-hexano (Rodriguez *et al.*, 2018). Os valores de TPC obtidos com *n*-hexano e com CO<sub>2</sub> supercrítico foram estatisticamente iguais de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância, e menores que os valores obtidos com solventes polares.

De acordo com os resultados para o coeficiente de correlação de Pearson (*r*), há uma correlação positiva estatisticamente significativa entre TPC e TFC de 0,957 (*p*<0,05), indicando que os flavonoides são o grupo de fenólicos predominante na *B. forficata*.

A Tabela 29 apresenta os valores de TPC dos extratos obtidos na extração com líquido pressurizado.

**Tabela 29. Condições aplicadas na extração com líquido pressurizado e teor de compostos fenólicos**

Solvente	Índice de Polaridade <sup>1</sup>	Pressão (bar)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	TPC (mg EAG·g <sub>extrato</sub> <sup>-1</sup> )
EtOH	5,2	100	40	40	56,56±11,04 <sup>a</sup>
				50	47,33±3,69 <sup>ab</sup>
				60	37,58±3,59 <sup>b</sup>
AcEt	4,4	100	40	40	43,27±0,52 <sup>b</sup>
				50	42,03±3,50 <sup>b</sup>
				60	44,99±3,27 <sup>ab</sup>
Hex	0,0	100	40	40	3,59±1,46 <sup>c</sup>
				50	4,80±0,91 <sup>c</sup>
				60	4,00±0,72 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Phenomenex (2010); As mesmas letras na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de 5%.

Assim como para os métodos tradicionais de extração, na extração com líquido pressurizado o solvente é um dos parâmetros mais importantes na extração de compostos fenólicos. Aplicando-se a análise ANOVA para avaliar o efeito da temperatura e do solvente na extração de compostos fenólicos por líquido pressurizado tem-se que o solvente é um fator significativo com *p*-valor <0,000. O etanol foi o melhor solvente, e neste método, foi estatisticamente igual aos resultados obtidos pelo acetato de etila, enquanto que o *n*-hexano foi o que resultou em menores teores de fenólicos. A temperatura, embora teve pouca influencia no teor de compostos fenólicos pelo método de extração por líquido pressurizado, é considerada significativa, com *p*-valor igual a 0,046.

Aplicando-se o mesmo planejamento Box-Behnken de 15 experimentos para otimização da UAE, foi avaliado o efeito das variáveis temperatura, potência e razão

solvente/folha no teor de fenólicos totais. A Tabela 30 apresenta os resultados experimentais para cada condição avaliada.

**Tabela 30. Variáveis independentes do planejamento Box-Behnken nas extrações assistidas por ultrassom usando etanol como solvente e teor de fenólicos**

Exp.	Condições de extração			TPC (mg EAG·g <sub>extrato</sub> <sup>-1</sup> )
	Temperatura (°C)	Potência (%)	Razão solvente/folha (mL·g <sup>-1</sup> )	
1	40	50	20	54,05
2	60	50	20	52,14
3	40	50	10	55,43
4	60	50	10	53,73
5	40	20	15	52,10
6	60	20	15	45,99
7	40	80	15	57,74
8	60	80	15	53,03
9	50	20	20	50,68
10	50	20	10	51,11
11	50	80	20	55,60
12	50	80	10	56,14
13	50	50	15	49,12
14	50	50	15	48,31
15	50	50	15	49,32

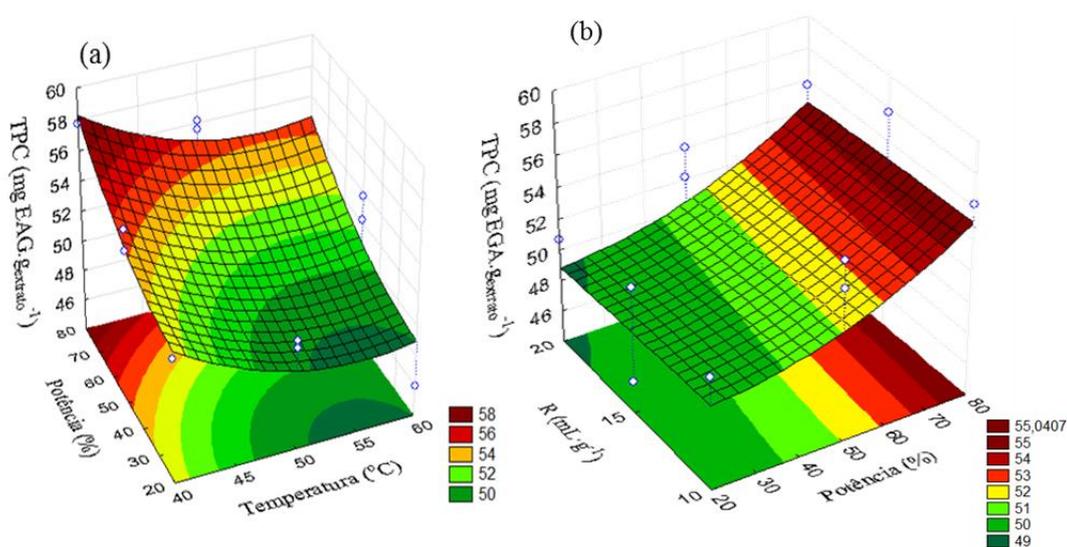
Os valores mínimo e máximo obtidos por UAE foram 45,99 mg EAG·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> (20% de potência, 60 °C, razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup>) e 57,74 mg EAG·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> (80% de potência, 40 °C, razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup>), respectivamente (Tabela 25).

De acordo com a Tabela 30 e a Figura 40, é possível observar que com o aumento da potência, maior o valor de TPC. Esse aumento pode ser devido ao aumento da cavitação e seus efeitos mecânicos (Dias *et al.*, 2017; Hani *et al.*, 2017). Dessa forma, as paredes celulares do material vegetal sofrem desintegração, liberando os compostos fenólicos ligados (Hani *et al.*, 2017).

A Tabela 30 e a Figura 40 (a) também mostram que o aumento da temperatura leva a uma diminuição no teor de fenólicos, a uma razão solvente/folha constante. Por isso, a temperatura deve ser selecionada de acordo com o composto de interesse (Chemat *et al.*, 2017). A otimização da temperatura deve ser realizada para obter o maior rendimento do composto alvo sem que ocorra sua degradação térmica (Chemat *et al.*, 2017). Carrera *et al.* (2012) extraíram compostos fenólicos de uvas vermelhas, segundo eles, um aumento na temperatura geralmente leva a um aumento na

recuperação de fenólicos ao se trabalhar com extrações sólido-líquido, porém altas temperaturas facilitam as reações de degradação por oxidação desses compostos.

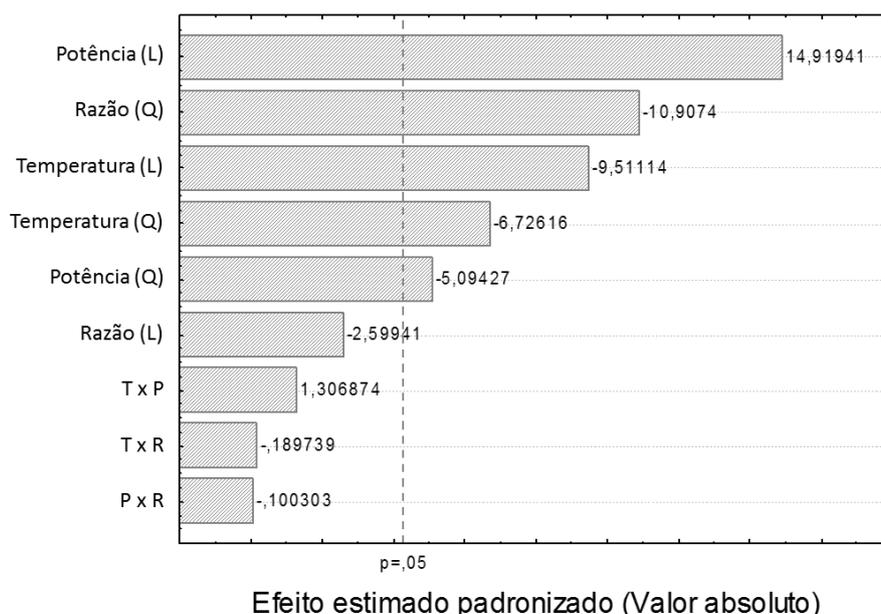
Na Figura 40 são apresentados os efeitos a partir de superfícies de resposta, nas quais é possível verificar o sentido da região ótima, com maiores teores de fenólicos. Na Figura 40 (a), foi fixada a razão solvente/folha em  $15 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  e na Figura 40 (b), a temperatura foi fixada em  $50^\circ\text{C}$ .



**Figura 40. Superfícies de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração potência razão solvente/folha e potência no TPC.**

Os valores de TPC, embora não fossem tão sensíveis à variação da razão solvente/folha, tiveram pequenos aumentos com a diminuição dessa razão solvente/folha, ou seja, com o aumento da massa de folhas no mesmo volume de solvente, como pode ser observado na Figura 40 (b). Embora quantidades excessivas de material vegetal resultem no aumento da viscosidade, e assim dificulta a difusão dos polifenóis através do meio de extração, os polifenóis são altamente solúveis em soluções aquosas (Jovanovic *et al.*, 2017). O aumento na razão solvente/folha não foi o suficiente para saturar o meio de extração, e assim, foi possível aumentar o rendimento da extração de compostos fenólicos.

A significância das variáveis independentes, potência, temperatura e razão solvente/folha, em relação à variável resposta teor de fenólicos dos extratos podem ser observadas de acordo com o gráfico de Pareto, apresentado na Figura 41.



**Figura 41.** Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis potência, razão e temperatura no teor de fenólicos dos extratos obtidos por extração assistidas por ultrassom

O fator mais dominante no valor de TPC foi a potência em seu termo linear (Figura 41 e Equação (37)), seguido do efeito da razão solvente/folha em seu termo quadrático e da temperatura, com seus efeitos linear e quadrático, respectivamente. O modelo polinomial de segunda ordem que descreve o efeito dos fatores independentes codificados na resposta TPC é dado pela Equação (37), a seguir:

$$TPC = 53,14 - 1,80 \cdot X_1 + 2,83 \cdot X_2 - 0,94 \cdot X_1^2 - 0,71 \cdot X_2^2 - 1,52 \cdot X_3^2 \quad (37)$$

Em que  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  representam os fatores codificados temperatura, potência e razão solvente:folha, respectivamente. Este modelo foi analisado utilizando o teste ANOVA (Tabela 31) e apresentou um coeficiente de determinação de 0,927. O modelo estatístico foi significativo, o p-valor para o teste de falta de ajuste foi não-significativo, considerando erro puro.

**Tabela 31.** Análise de variância (ANOVA) para o teor de fenólicos dos extratos obtidos por ultrassom considerando 95% de confiança

Fonte de variação	Soma quadrática	GL <sup>a</sup>	Média Quadrática	F calc.	F tab.	p-valor
Regressão	138,57	5	27,71	22,71	3,48 <sup>b</sup>	0,000
Resíduo	10,99	9	1,22			
Falta de ajuste	10,41	7	1,49	5,14	0,44 <sup>d</sup>	0,172
Erro puro	0,58	2	0,29			
Total	149,56	14				

% de variação explicada: 92,65%

% máxima de variação explicável: 99,61%

<sup>a</sup> Número de graus de liberdade; <sup>b</sup> Ftabelado(5;9;0,05); <sup>c</sup> Ftabelado(7;2;0,05).

O planejamento experimental 2<sup>3</sup> com repetição no ponto central com 11 experimentos também foi empregado para investigar o efeito das variáveis temperatura, pressão e relação mássica de cossolvente:folha na extração supercrítica com cossolvente no teor de fenólicos. A Tabela 32 apresenta os resultados experimentais para cada condição avaliada.

**Tabela 32. Variáveis independentes do planejamento 2<sup>3</sup> com repetição no ponto central nas extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico usando etanol como cossolvente e teor de fenólicos por grama de extrato e por grama de folha**

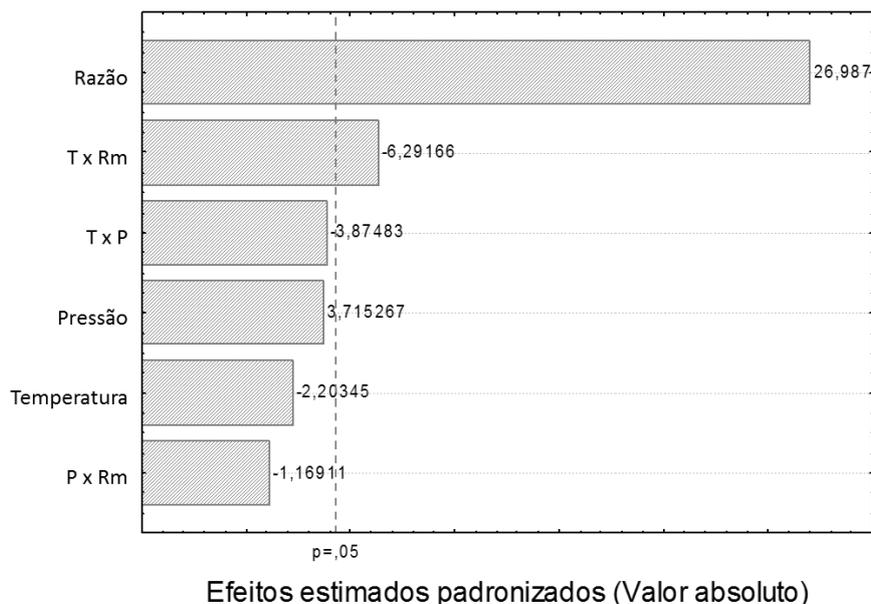
Exp.	Condições de extração				TPC (mg EAG·g <sub>extrato</sub> <sup>-1</sup> )	TPC (mg EAG·g <sub>folha</sub> <sup>-1</sup> )
	T (°C)	P (bar)	$\rho_f$ (kg·m <sup>-3</sup> ) <sup>1</sup>	Rm (g <sub>etanol</sub> :g <sub>folha</sub> )		
1	40	180	819,51	0,5:1	45,65	0,40
2	60	180	687,25	0,5:1	43,83	0,48
3	40	220	857,20	0,5:1	49,07	0,50
4	60	220	752,38	0,5:1	49,92	0,67
5	40	180	819,51	1,5:1	45,05	1,27
6	60	180	687,25	1,5:1	46,32	1,30
7	40	220	857,20	1,5:1	32,01	1,63
8	60	220	752,38	1,5:1	35,60	1,09
9	50	200	784,29	1,0:1	49,08	0,85
10	50	200	784,29	1,0:1	49,75	0,81
11	50	200	784,29	1,0:1	54,48	0,90

<sup>1</sup>NIST - National Institute of Standards and Technology; T: temperatura; P: pressão;  $\rho_f$ : Densidade do CO<sub>2</sub>

O maior teor de compostos fenólicos por grama de extrato obtido pelo método de extração supercrítica com adição de cossolvente (54,48g EAG·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>) foi alcançado em uma das repetições do ponto central do planejamento experimental (50 °C, 200 bar e 1:1), e o menor teor de fenólicos por grama de extrato (32,01 mg EAG·g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>) foi obtido na menor temperatura, na maior pressão e maior razão solvente:folha do planejamento experimental (40 °C, 220 bar e 1,5:1, respectivamente).

Observa-se que, em geral, ao aumentar a temperatura, a pressão de extração e a quantidade de cossolvente, há um aumento na quantidade de fenólicos extraídos por grama de folhas, assim como foi observado para o teor de flavonoides.

Com o objetivo de analisar os efeitos das variáveis na extração de compostos fenólicos, os dados da Tabela 32 foram utilizados para calcular o efeito das variáveis. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 42, na forma de gráfico de Pareto, ao nível de confiança de 95%.



**Figura 42. Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão, temperatura e razão solvente:folha no teor de fenólicos dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente**

Assim como para flavonoides, o efeito mais significativo na quantidade de compostos fenólicos extraídos por grama de folhas foi a razão mássica de cossolvente. Esses resultados confirmam a afirmação feita por Murga *et al.* (2000), que o etanol é capaz de formar ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo com os fenóis, podendo atuar como um bom cossolvente nas extrações com dióxido de carbono. Misturas de CO<sub>2</sub> supercrítico com uma baixa percentagem de cossolvente podem extrair fenóis de baixa massa molar e, um aumento progressivo na pressão e na percentagem de cossolvente pode favorecer a extração de fenóis com massas molares maiores (Murga *et al.*, 2000).

Nas condições em que a maior quantidade de cossolvente foi adicionada, observa-se que houve uma redução da quantidade de fenólicos por grama de extrato com o aumento da pressão, provavelmente pelo esgotamento dos fenóis presentes na matriz e a extração de outros compostos.

Segundo Maran *et al.* (2014), a adição de etanol ao solvente supercrítico proporciona um aumento na extração de pigmentos e também de compostos fenólicos, como consequência do aumento da polaridade da mistura de solventes. Mazzutti *et al.* (2017) e Mezzomo *et al.* (2010) também tiveram o valor TPC aumentado ao adicionar etanol na extração supercrítica de tanchagem (espécies *Plantago major* e *Plantago lanceolata*) e da amêndoa do pêssego (*Prunus pérsica*).

Assim como ocorreu para o teor de flavonoides, o aumento da quantidade de cossolvente aumentou a quantidade de fenólicos extraídos por grama de folha, mas diminuiu a quantidade de fenólicos por grama de extrato, podendo ser resultado da extração de outros compostos polares.

Análises estatísticas foram realizadas visando determinar os efeitos das variáveis (temperatura, pressão e razão solvente:folha) sobre a quantidade de fenólicos extraídos por grama de folhas.

Os únicos efeitos significativos a 95% de confiança foi a razão solvente:folha e o efeito de interação Temperatura x Razão solvente:folha. O modelo estatístico que prediz o teor de fenólicos em função das variáveis independentes codificadas temperatura (T), pressão (P) e razão mássica solvente e folha (Rm) é dado pela Equação (38).

$$\begin{aligned}
 TPC \text{ (mg EAG} \cdot g_{ext}^{-1}\text{)} \\
 &= 0,900 - 0,033 \cdot T + 0,056 \cdot P + 0,406 \cdot Rm - 0,058 \cdot T \cdot P - 0,095 \\
 &\cdot T \cdot Rm - 0,018 \cdot P \cdot Rm \text{ (38)}
 \end{aligned}$$

A validade do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 33.

**Tabela 33. Análise de variância (ANOVA) para os teores de fenólicos dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente considerando 95% de confiança**

Fonte de variação	Soma quadrática	GL <sup>a</sup>	Média Quadrática	F calc.	F tab.	p-valor
Regressão	1,451	6	0,242	14,24	6,163 <sup>b</sup>	0,011
Resíduo	0,069	4	0,017			
Falta de ajuste	0,065	2	0,032	16,00	19,00 <sup>c</sup>	0,052
Erro puro	0,004	2	0,002			
Total	1,520	10				

% de variação explicada: 95,46%

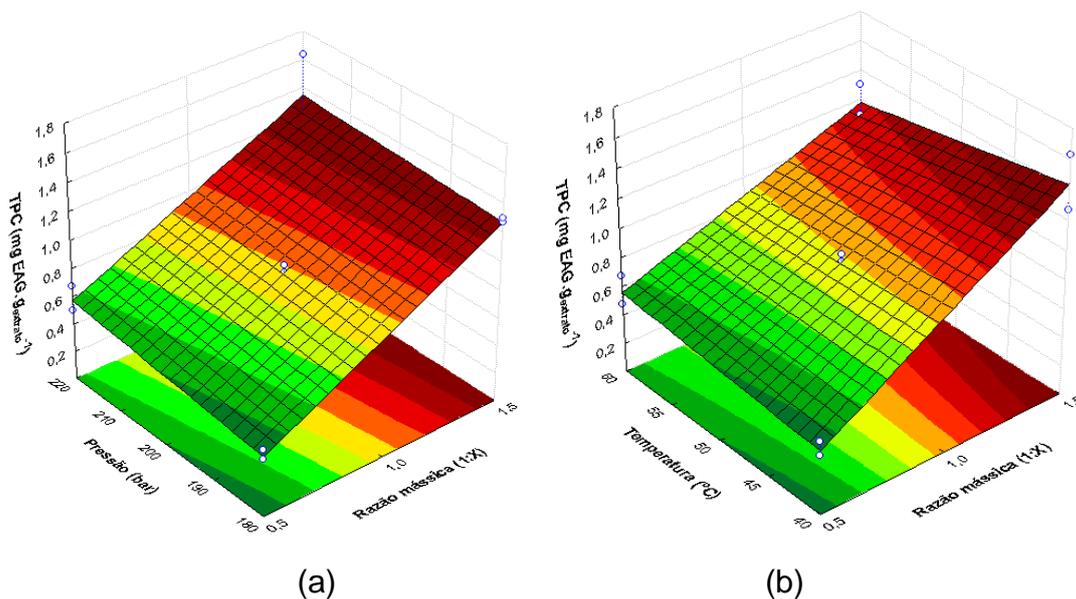
% máxima de variação explicável: 99,74%

<sup>a</sup> Número de graus de liberdade; <sup>b</sup> F<sub>tabelado</sub>(6;4;0,05); <sup>c</sup> F<sub>tabelado</sub>(2;2;0,05).

O modelo estatístico é significativo, ou seja, se ajusta aos dados experimentais e explicou 95,46% das variações entre os valores experimentais e os previstos pelo mesmo, indicando uma boa concordância.

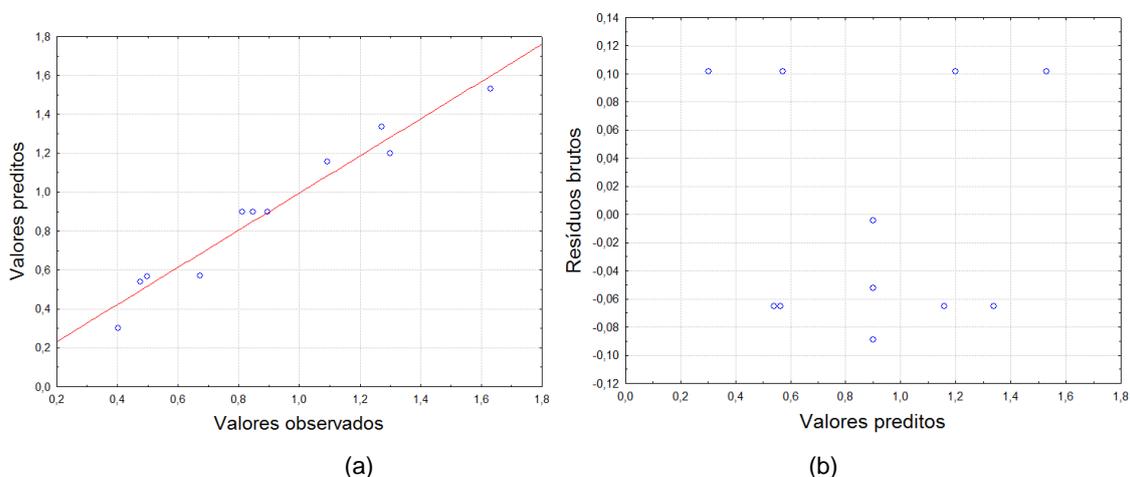
A Figura 43 apresenta os efeitos a partir de superfícies de resposta. Na Figura 43 (a) a temperatura foi fixada em 50 °C e observa-se que ao aumentar a pressão tem-se um leve aumento da quantidade de compostos fenólicos extraídos por massa de folha e, ao aumentar a quantidade de cossolvente, aumenta-se mais significativamente a quantidade de compostos fenólicos extraídos. Na Figura 43 (b), a pressão foi fixada em 200 bar e

observa-se que quanto maior a quantidade de etanol utilizada como cossolvente, maior a quantidade de compostos fenólicos extraídos, e que a temperatura teve efeitos que variaram com a quantidade de cossolvente adicionada.



**Figura 43.** Superfície de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração pressão, temperatura e razão mássica no teor de fenólicos dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente.

A Figura 44 apresenta os gráficos de resíduos, o gráfico de valores observados x valores preditos indica que o modelo prevê corretamente o comportamento observado experimentalmente. O gráfico de valores preditos x resíduos brutos indica que os resíduos estão dispersos aleatoriamente em torno de zero, com variância constante, concentrados entre -0,10 e 0,12.



**Figura 44.** Gráficos de resíduos do modelo estatístico teor de fenólicos para extração com fluido supercrítico com adição de cossolvente.

O teor de compostos fenólicos dos extratos obtidos através da extração supercrítica com adição de etanol como cossolvente neste trabalho foram maiores dos que os obtidos por Souza *et al.* (2018) ao realizar extração das folhas de bardana (*Arctium lappa*), com valores que variaram entre 35,51 e 44,89 mg EAG.gextrato<sup>-1</sup>, que os obtidos por Cruz *et al.* (2019) nas extrações de folhas de yacon, obtendo valores de TPC que variaram entre 16,60 a 39,59 mg EAG.gextrato<sup>-1</sup> e do que os obtidos por Cruz *et al.* (2017) na extração das sementes de butiá (*Butia catarinensis*) com valores entre de 15,6 a 22,6 mg EAG.gextrato<sup>-1</sup>, todos utilizando etanol como cossolvente nas extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico.

O método que resultou maiores valores de fenólicos por grama de extrato foi o de Soxhlet, seguido dos métodos de extração com ultrassom e líquido pressurizado. O método de extração supercrítica foi o que resultou no menor teor de compostos fenólicos provavelmente devido à baixa polaridade do solvente de extração.

### 5.7. Determinação da atividade antioxidante pelo Método DPPH e Método FRAP

A atividade antioxidante dos extratos das folhas de *B. forficata* foi determinada pelos métodos de DPPH e FRAP e os resultados estão apresentados na Tabela 34.

**Tabela 34. Atividade antioxidante dos extratos das folhas de *B. forficata* obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados.**

Método	Solvente	DPPH	FRAP
Sox	Hex	18,54±6,42 <sup>g</sup>	80,60±18,13 <sup>d</sup>
	AcEt	41,90±3,90 <sup>ef</sup>	460,45±38,54 <sup>b</sup>
	EtOH	98,40±4,10 <sup>b</sup>	625,62±18,78 <sup>a</sup>
Mac	Hex	33,63±3,71 <sup>fg</sup>	187,48±39,23 <sup>cd</sup>
	AcEt	59,70±3,90 <sup>d</sup>	504,31±12,78 <sup>b</sup>
	EtOH	77,50±4,87 <sup>c</sup>	539,82±58,02 <sup>ab</sup>
UAE <sup>1</sup>	Hex	51,62±6,55 <sup>de</sup>	267,53±38,47 <sup>c</sup>
	AcEt	43,99±2,31 <sup>def</sup>	486,72±65,74 <sup>b</sup>
	EtOH	114,93±9,22 <sup>a</sup>	617,47±24,07 <sup>a</sup>
SFE <sup>2</sup>	CO <sub>2</sub>	39,50±5,99 <sup>ef</sup>	176,29±28,30 <sup>cd</sup>

Sox: Soxhlet; Mac: maceração; UAE: Extração assistida por ultrassom; SFE: Extração com fluido supercrítico; DPPH: Atividade antioxidante pelo método DPPH expressa em  $\mu\text{mol ETrolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ; FRAP: Atividade antioxidante pelo método FRAP expressa em  $\mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ; <sup>1</sup>50 °C, 50% da potência, 15 min e razão solvente/folha 15 mL.g<sup>-1</sup>; <sup>2</sup>200 bar e 50 °C. A mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de 5%.

Aplicando-se a ANOVA aos dados experimentais, conclui-se que o solvente teve efeito significativo nos valores de DPPH e FRAP, sendo o etanol o solvente que resultou em maiores valores em ambos os métodos. Os solventes acetato de etila e CO<sub>2</sub> não foram significativamente diferentes para os valores de DPPH, assim como os solventes CO<sub>2</sub> e *n*-hexano não foram estatisticamente diferentes nem para DPPH nem para FRAP. Esse efeito do solvente na atividade antioxidante dos extratos é devido aos potenciais antioxidantes diferentes de compostos com polaridades diferentes (Boeing *et al.*, 2014). As maiores atividades antioxidantes determinadas por FRAP e DPPH foram detectadas nos extratos obtidos com etanol em todos os métodos de extração avaliados. Isso se deve, provavelmente, ao elevado poder de solvatação de compostos antioxidantes presentes nas folhas, devido às interações (ligações de hidrogênio) entre os sítios polares das moléculas antioxidantes e o solvente (Boeing *et al.*, 2014).

Considerando-se o mecanismo de redução da molécula de DPPH, que está relacionado com a presença de grupos hidroxila na molécula antioxidante, pode-se inferir que a atividade apresentada pelo extrato mais polar é provavelmente devida a presença de substâncias com hidroxilas livres (fenólicas ou não). Essa exigência estrutural pode estar vinculada à presença de flavonoides, que ocorrem, entre outras, na espécie *Bauhinia* (Arigony, 2005).

Tendências similares foram observadas por Andrade *et al.* (2012) ao extraírem compostos antioxidantes de casca de café (*Coffea arabica*) e por Dias *et al.* (2017) ao extraírem compostos bioativos da pimenta dedo de moça (*Capsicum baccatum* L.). A capacidade antioxidante relativamente baixa obtidas com *n*-hexano e CO<sub>2</sub> pode estar relacionada à pequena quantidade de compostos fenólicos nesses extratos (Dias *et al.*, 2017; Mazzutti *et al.*, 2017). Segundo Boeing *et al.* (2014) e Ho *et al.* (2018), os polifenóis são os principais responsáveis pelas propriedades antioxidantes das plantas. Esses compostos agem como antioxidantes pela doação de um átomo de hidrogênio, e pela quelatação de metais e extinção do oxigênio singlete (Choe e Min, 2009).

Os compostos que exibem capacidade antioxidante pelo método de FRAP são geralmente doadores de prótons (Ho *et al.*, 2018). Assim como citado no tópico 5.5. para obtenção de compostos fenólicos, o acetato de etila proporciona uma recuperação mais baixa de compostos antioxidantes que o etanol devido a sua baixa eficiência de solvatação, uma vez que as moléculas de acetato de etila são apenas aceitadoras de prótons enquanto que as de etanol são moléculas doadoras de prótons.

Realizando a ANOVA e analisando a diferença entre os métodos de extração, o método que resultou em maiores atividades antioxidantes pelo método DPPH utilizando o mesmo solvente foi o UAE, em seguida, os métodos de Soxhlet e de Maceração apresentaram resultados estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) e com menor atividade antioxidante, o método supercrítico, devido à baixa polaridade do  $\text{CO}_2$ . Pelo método FRAP, os melhores resultados foram obtidos também por UAE, sendo considerando estatisticamente igual ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey, aos resultados obtidos por Maceração, que foi considerado igual estatisticamente ( $p < 0,05$ ) aos resultados obtidos por Soxhlet, e com menor atividade antioxidante os resultados obtidos pelo método supercrítico.

Com o intuito de verificar a existência de correlação entre as metodologias utilizadas no presente trabalho, aplicou-se o teste de Pearson (Tabela 35).

**Tabela 35. Coeficiente de correlação linear de Pearson (r) entre as respostas obtidas pelos diferentes métodos**

Métodos	Coeficiente de correlação (r)		
	TPC	DPPH	FRAP
TFC	0,957	0,727	0,942
FRAP	0,950	0,805	
DPPH	0,784		

\*As células destacadas indicam que o coeficiente é significativo.

De acordo com o coeficiente de Pearson, classificam-se como fortemente correlacionadas as respostas obtidas pelos métodos nos quais  $|0,8 \leq r < 1|$ ; moderadamente para  $|0,5 \leq r < 0,8|$  e, fracamente correlacionadas para  $|0,1 \leq r < 0,5|$ . Dessa forma, observa-se que para maioria dos casos obteve-se correlação forte, as menores correlações estão relacionadas ao DPPH, mas ainda são consideradas moderadas. Essa correlação forte, significativa e positiva com a atividade antioxidante, indica que flavonoides e fenólicos contribuem para a capacidade antioxidante dos extratos obtidos das folhas de *B. forficata*. Viganó *et al.* (2016) também obtiveram correlações fortes entre TPC e atividade antioxidante determinadas pelos métodos DPPH, FRAP, e ORAC.

De acordo com Hasmda *et al.* (2014), a atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com a presença dos grupos hidroxilas (-OH) e a dupla ligação entre os átomos de carbono (C=C), pois eles podem aumentar a captura de radicais dos compostos. Estudos prévios reportados por Ferreres *et al.* (2012) mostraram que extratos hidroalcoólicos de *B. forficata* possuem atividade antioxidante significativa *in vitro*, que pode ser explicada pelo elevado teor de quercetina e seus derivativos. De acordo com Viganó *et al.* (2016), os flavonoides são antioxidantes muito importantes

devido ao seu alto poder redox, que os tornam agentes redutores, doadores de hidrogênio, e inibidores de oxigênio singlete, com potencial para quelar metais.

A Tabela 36 apresenta os valores de DPPH e FRAP dos extratos obtidos na extração com líquido pressurizado.

**Tabela 36. Condições aplicadas na extração com líquido pressurizado e atividades antioxidantes obtidas pelos métodos DPPH e FRAP**

Solvente	Pressão (bar)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	DPPH	FRAP
EtOH			40	112,88±15,74 <sup>ab</sup>	712,87±13,97 <sup>a</sup>
			50	120,08±4,08 <sup>a</sup>	713,13±54,13 <sup>a</sup>
			60	85,15±5,68 <sup>b</sup>	606,85±52,50 <sup>ab</sup>
AcEt	100	40	40	46,28±13,53 <sup>c</sup>	646,06±39,86 <sup>a</sup>
			50	49,88±11,74 <sup>c</sup>	669,55±18,68 <sup>a</sup>
			60	40,41±13,94 <sup>c</sup>	744,63±51,39 <sup>a</sup>
Hex			40	27,15±5,43 <sup>c</sup>	460,33±17,78 <sup>bc</sup>
			50	32,30±6,25 <sup>c</sup>	335,98±47,70 <sup>c</sup>
			60	23,30±11,93 <sup>c</sup>	386,53±57,20 <sup>c</sup>

DPPH: Atividade antioxidante pelo método DPPH expressa em  $\mu\text{mol ETrolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ; FRAP: Atividade antioxidante pelo método FRAP expressa em  $\mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ; A mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de 5%.

Aplicando-se a análise ANOVA para avaliar o efeito da temperatura e do solvente na atividade antioxidante dos extratos obtidos por líquido pressurizado tem-se que o solvente é um fator significativo com p-valor <0,001 tanto para o método de DPPH quanto para o FRAP. O etanol proporcionou maiores valores de DPPH e o acetato de etila o solvente que proporcionou maiores valores para FRAP. O *n*-hexano foi o solvente que resultou em extratos com menor atividade antioxidante nos dois métodos. A temperatura não teve efeito significativo nos valores obtidos pelo método FRAP, com p-valor igual a 0,389, mas teve certa influencia na atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH, com p-valor igual a 0,007. A temperatura de extração de 50 °C foi a que resultou extratos com maior atividade antioxidante pelo método DPPH. Pinelo *et al.*, (2006) afirma que, embora a eficiência do processo de extração seja melhorada com o aumento da temperatura, a estabilidade térmica dos compostos extraídos não permite um aumento indefinido dessa variável, sendo a temperatura de 50 °C considerada a ótima para a extração e compostos antioxidantes de diferentes fontes naturais.

Aplicando-se o planejamento Box-Behnken nas UAE, foi avaliado o efeito das variáveis temperatura, potência e razão solvente/folha na atividade antioxidante para os

métodos DPPH e FRAP. A Tabela 37 apresenta os resultados experimentais para cada condição avaliada.

**Tabela 37. Variáveis independentes do planejamento Box-Behnken utilizadas nas extrações assistidas por ultrassom usando etanol como solvente e atividades antioxidantes determinadas por DPPH e FRAP**

Exp.	Condições de extração			DPPH	FRAP
	Temperatura (°C)	Potência (%)	Razão solvente/folha (mL·g <sup>-1</sup> )		
1	40	50	20	119,10	665,3
2	60	50	20	125,51	678,6
3	40	50	10	123,84	697,3
4	60	50	10	145,76	745,6
5	40	20	15	107,13	675,7
6	60	20	15	95,30	618,3
7	40	80	15	117,99	741,0
8	60	80	15	106,95	684,3
9	50	20	20	113,08	645,7
10	50	20	10	123,38	682,6
11	50	80	20	123,77	695,5
12	50	80	10	131,44	719,1
13	50	50	15	113,62	610,2
14	50	50	15	119,23	600,3
15	50	50	15	117,89	621,1

DPPH: Atividade antioxidante pelo método DPPH expressa em  $\mu\text{mol ETrolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ;  
FRAP: Atividade antioxidante pelo método FRAP expressa em  $\mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ .

Os valores de FRAP variaram entre 600,3 a 745,6  $\mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ , com o maior valor observado sob a condição de 50% de potência, 60°C, e razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup> e o mínimo, sob a condição de 50% de potência, 50°C, e razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup>. O valor máximo obtido por DPPH (145,76  $\mu\text{mol ETrolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ) foi obtido na mesma condição de máximo valor de FRAP, e o mínimo (95,30  $\mu\text{mol ETrolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ) foi obtido na condição de 20% de potência, 60°C, e razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup> (Tabela 37).

Os modelos polinomiais de segunda ordem que descrevem os efeitos dos fatores independentes codificados nas respostas DPPH e FRAP são dados pelas Equações (39) e (40), respectivamente:

$$DPPH = 119,78 + 5,16 \cdot X_2 - 5,37 \cdot X_3 + 3,84 \cdot X_2^2 - 7,01 \cdot X_3^2 \quad (39)$$

$$FRAP = 687,43 + 27,20 \cdot X_2 - 19,94 \cdot X_3 - 20,08 \cdot X_1^2 - 14,57 \cdot X_2^2 - 23,03 \cdot X_3^2 \quad (40)$$

Em que  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  representam os fatores codificados temperatura, potência e razão solvente:folha, respectivamente.

Ambos os modelos estatísticos foram significativos e o p-valor para o teste de falta de ajuste foi não-significativo, considerando erro puro. Os modelos estatísticos para DPPH e FRAP foram analisados utilizando o teste ANOVA (Tabela 38).

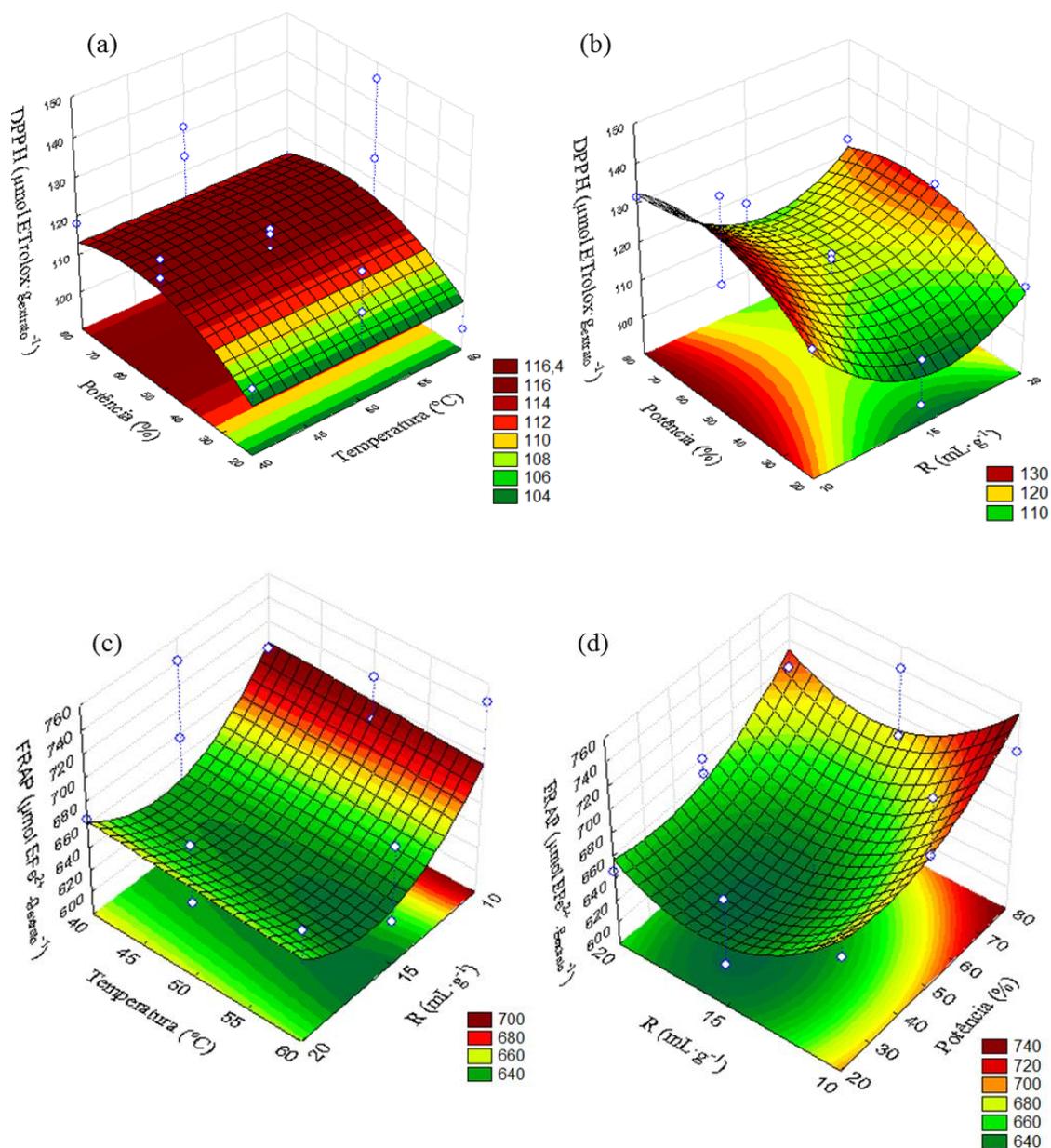
Análise de variância (ANOVA) para os rendimentos das extrações assistidas por ultrassom

**Tabela 38. Análise de variância (ANOVA) para os modelos de DPPH e FRAP para os extratos obtidos por UAE considerando 95% de confiança**

<b>DPPH</b>						
<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>GL<sup>a</sup></b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calc.</b>	<b>F tab.</b>	<b>p-valor</b>
Regressão	1456	4	364	8,33	0,17 <sup>b</sup>	0,003
Resíduo	436	10	44			
Falta de ajuste	419	8	52	6,16	19,4 <sup>c</sup>	0,148
Erro puro	17	2	8			
Total	1892	14				
% de variação explicada: 76,93%						
% máxima de variação explicável: 99,10%						
<b>FRAP</b>						
<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>GL<sup>a</sup></b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calc.</b>	<b>F tab.</b>	<b>p-valor</b>
Regressão	23879	5	4776	8,23	3,48 <sup>d</sup>	0,004
Resíduo	5220	9	580			
Falta de ajuste	5003	7	715	6,62	19,3 <sup>e</sup>	0,138
Erro puro	216	2	108			
Total	29099	14				
% de variação explicada: 82,06%						
% máxima de variação explicável: 99,26%						

<sup>a</sup>Número de graus de liberdade; <sup>b</sup>Ftabelado(4;10;0,05); <sup>c</sup>Ftabelado(8;2;0,05); <sup>d</sup>Ftabelado(5;9;0,05); <sup>e</sup>Ftabelado(7;2;0,05).

Na Figura 45 são apresentadas as superfícies de resposta dos dois métodos de análise de antioxidante, DPPH e FRAP, respectivamente, nas quais é possível verificar o sentido de maior atividade antioxidante. Nas Figuras 45 (a), a razão solvente/folha de 15 mL·g<sup>-1</sup> foi fixada, nas Figuras 45 (b) e (d), a temperatura foi fixada em 50 °C e na Figura 45 (c), a potência foi fixada em 50%.



**Figura 45. Superfícies de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração temperatura, razão solvente/folha e potência na atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e FRAP.**

De acordo com a Equação (39) e a Figura 45(a), observa-se que a atividade antioxidante dos extratos, determinadas por DPPH, não foi influenciada significativamente pela temperatura da extração, já pelo método FRAP, a temperatura apresentou pequena influência, conforme seu termo quadrado negativo na Equação (40) e pela leve curvatura apresentada na Figura 45 (c).

Embora o aumento da temperatura possa aumentar a solubilidade dos compostos desejados, a difusão do solvente, a transferência de massa e, conseqüentemente, o rendimento da extração (apresentado no tópico 5.2.3), esse aumento também pode

resultar na solubilização de outros compostos não desejáveis, além da degradação de compostos termosensíveis (Ghafoor *et al.*, 2009; González-Centeno *et al.*, 2015; Hani *et al.*, 2017; Tomšik *et al.*, 2016).

A variável mais significativa pelo método FRAP foi a potência, assim como observado para as respostas de TPC e TFC. Na Equação (40), a potência apresentou o maior coeficiente, que foi positivo e linear, além do termo negativo e quadrático, representado na Figura 45 (d) na forma de concavidade voltada para cima. A potência também teve influencia significativa na atividade antioxidante avaliada por DPPH, porém não teve seu valor máximo na maior potência avaliada, conforme Figuras 45 (a) e (b). O fator mais significativo na atividade antioxidante por DPPH foi a razão solvente/folha, com elevados coeficientes quadrático e linear, conforme Equação (39), representados pela Figura 45 (b), em que os máximos valores obtidos estariam nas extremidades, nas razões de 10 e 20 mL.g<sup>-1</sup>. O método FRAP também apresentou superfície côncava para cima em relação a razão solvente/folha, porém teve seu máximo na razão de 10 mL. g<sup>-1</sup>, que está de acordo com os resultados obtidos por TFC e TPC.

Foram calculados os índices de correlação de Pearson entre as metodologias aplicadas no Planejamento Box-Behnken, e os resultados são apresentados na Tabela 39.

**Tabela 39. Coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre as respostas obtidas dos diferentes métodos de análise dos extratos obtidos por UAE seguindo o planejamento Box-Behnken**

Métodos	Coeficiente de correlação (r)		
	TPC	DPPH	FRAP
TFC	0,790 (p=0,000)	0,544 (p=0,036)	0,536 (p=0,039)
FRAP	0,871 (p=0,000)	0,596 (p=0,019)	
DPPH	0,522 (p=0,046)		

\*As células destacadas indicam que o coeficiente é significativo.

De acordo com o coeficiente de Pearson, a maior correlação está entre o método de TPC e FRAP (0,871), considerada fortemente correlacionada, enquanto que as outras correlações são consideradas moderadas e estatisticamente significativas (p < 0.05).

Assim como descrito anteriormente, neste mesmo tópico, essa correlação, significativa e positiva, indica que flavonoides e compostos fenólicos contribuem significativamente na capacidade antioxidante.

Análises estatísticas foram realizadas a fim de se determinar a influencia das variáveis temperatura, pressão e relação mássica de cossolvente:folha na atividade

antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica com adição de etanol como cossolvente. A Tabela 40 apresenta os resultados experimentais de DPPH e FRAP para cada condição avaliada.

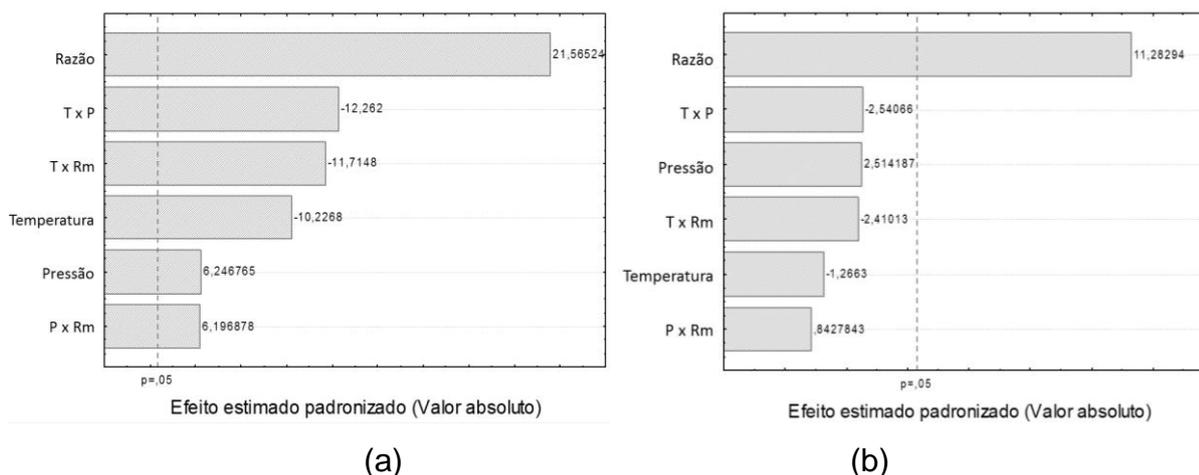
**Tabela 40. Variáveis independentes do planejamento 2<sup>3</sup> com repetição no ponto central utilizadas nas extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico usando etanol como cossolvente e atividades antioxidantes determinadas pelos métodos FRAP e DPPH**

Condições de extração			DPPH <sup>1</sup>	DPPH <sup>2</sup>	FRAP <sup>3</sup>	FRAP <sup>4</sup>
T (°C)	P (bar)	Rm (g <sub>etanol</sub> :g <sub>folha</sub> )				
40	180	0,5:1	50,17	0,443	668,17	5,90
60	180	0,5:1	39,66	0,430	675,63	7,33
40	220	0,5:1	36,36	0,370	787,90	8,02
60	220	0,5:1	37,63	0,507	710,94	9,58
40	180	1,5:1	34,98	0,987	684,50	19,32
60	180	1,5:1	41,70	1,170	756,51	21,23
40	220	1,5:1	51,15	2,607	597,03	30,43
60	220	1,5:1	19,24	0,591	615,81	18,91
50	200	1,0:1	55,86	0,965	866,77	14,98
50	200	1,0:1	52,42	0,855	829,62	13,53
50	200	1,0:1	53,10	0,874	687,20	11,30

T: temperatura; P: pressão; Rm: razão mássica <sup>1</sup>DPPH: Atividade antioxidante pelo método DPPH expressa em  $\mu\text{mol E Trolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ; <sup>2</sup>DPPH: Atividade antioxidante pelo método DPPH expressa em  $\mu\text{mol E Trolox} \cdot \text{g}_{\text{folha}}^{-1}$ ; <sup>3</sup>FRAP: Atividade antioxidante pelo método FRAP expressa em  $\mu\text{mol E Fe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ; <sup>4</sup>FRAP: Atividade antioxidante pelo método FRAP expressa em  $\mu\text{mol E Fe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{folha}}^{-1}$ ;

A maior atividade antioxidante por grama de extrato obtido pelo método de extração supercrítica com adição de cossolvente determinada pelos métodos DPPH e FRAP (55,86  $\text{E Trolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$  e 866,77  $\mu\text{mol E Fe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ , respectivamente) foi alcançada em uma das repetições do ponto central do planejamento experimental (50 °C, 200 bar e 1:1). A menor atividade antioxidante por grama de extrato (19,24  $\text{mg EAG} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$  e 597,03  $\mu\text{mol E Fe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ , respectivamente) foram obtidos na maior pressão e na maior razão solvente:folha do planejamento experimental (220 bar e 1,5:1), nas temperaturas de 60 e 40 °C, respectivamente.

Os efeitos das variáveis na atividade antioxidante são apresentados na figura 46, na forma de gráfico de Pareto, ao nível de confiança de 95%.



**Figura 46. Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão, temperatura e razão solvente:folha na atividade antioxidante pelos métodos (a) DPPH e (b) FRAP dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente**

Assim como para flavonoides e compostos fenólicos, o efeito mais significativo na atividade antioxidante por grama de folhas foi a razão mássica de cossolvente. Quanto mais cossolvente adicionado, maior a quantidade de compostos antioxidantes extraídos.

Pode-se observar que a pressão e a temperatura tiveram pouca influência na atividade antioxidante, uma vez que o efeito variou conforme condição aplicada. De acordo com Mazzutti (2012), este comportamento aleatório pode estar associado aos diferentes compostos extraídos em cada uma das condições experimentais, refletindo em variações no potencial antioxidante. A temperatura teve efeito negativo na extração de compostos antioxidantes determinadas pelo método DPPH e pelo método FRAP, porém só foi significativa na determinação por DPPH. A pressão teve efeito positivo na extração de compostos antioxidantes, embora esse efeito significativo apenas pelo método DPPH. Os efeitos de interação foram significativos na atividade antioxidante dos extratos determinados pelo método DPPH e não foram significativos pelo método FRAP.

Os modelos estatísticos da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP em função das variáveis independentes codificadas temperatura (T), pressão (P) e razão mássica solvente e folha (Rm) são dados pelas Equações (41) e (42), respectivamente.

$$\begin{aligned}
 DPPH \left( \mu\text{mol ETrolox} \cdot g_{\text{folha}}^{-1} \right) \\
 = 0,891 - 0,214 \cdot T + 0,131 \cdot P + 0,451 \cdot Rm - 0,256 \cdot T \cdot P - 0,245 \cdot T \\
 \cdot Rm + 0,129 \cdot P \cdot Rm \quad (41)
 \end{aligned}$$

$$FRAP \left( \mu\text{mol } EFe^{2+} \cdot g_{\text{folha}}^{-1} \right) \\ = 14,59 - 0,83 \cdot T + 1,64 \cdot P + 7,38 \cdot Rm - 1,66 \cdot T \cdot P - 1,58 \cdot T \cdot Rm \\ + 0,55 \cdot P \cdot Rm \quad (42)$$

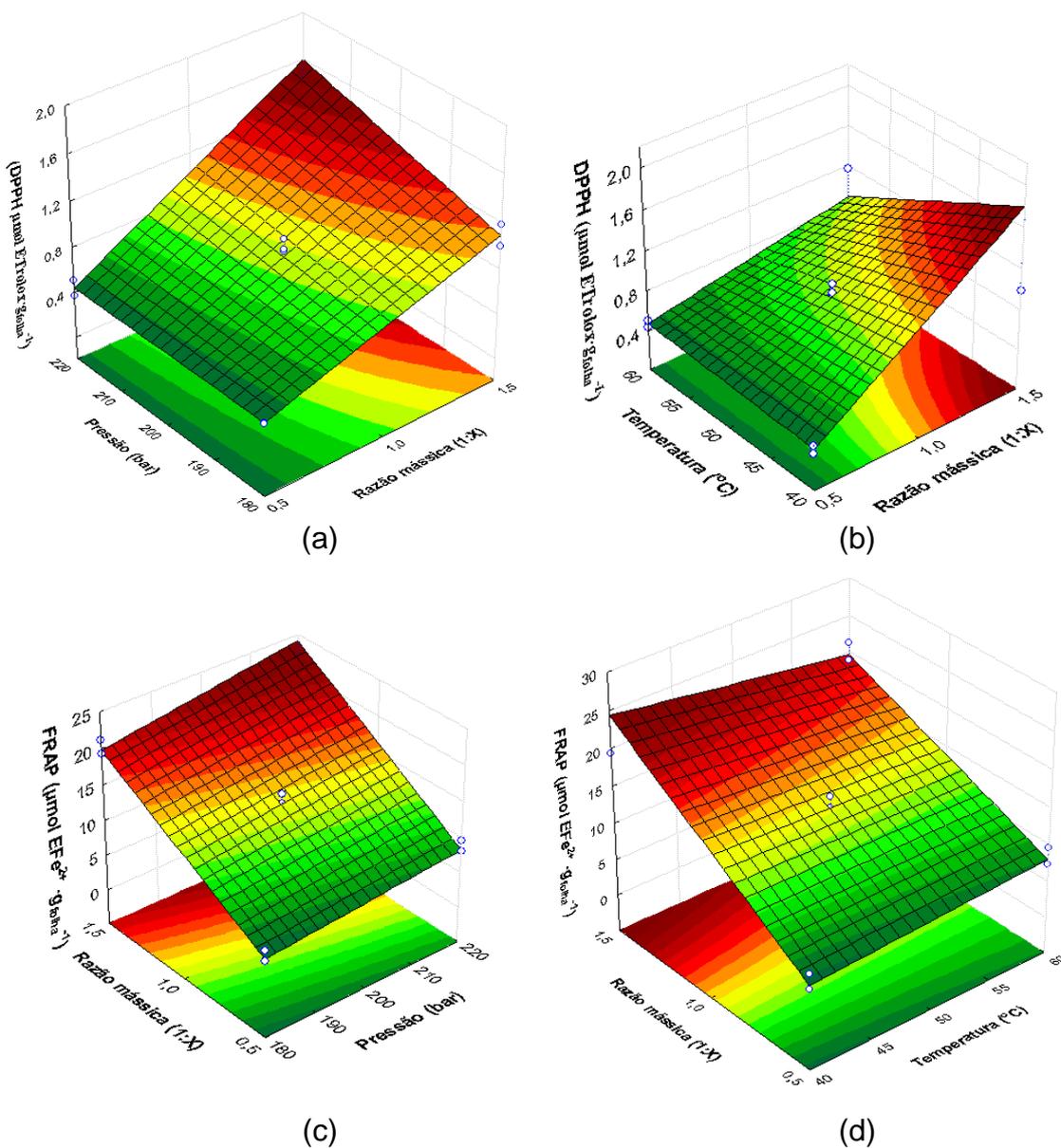
A validade dos modelos foi verificada pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 41.

**Tabela 41. Análise de variância (ANOVA) para os modelos estatísticos DPPH e FRAP a 95% de confiança para os extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente**

<b>DPPH</b>						
<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>GL<sup>a</sup></b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calc.</b>	<b>F tab.</b>	<b>p-valor</b>
Regressão	3,282	6	0,547	3,72	6,163 <sup>b</sup>	0,888
Resíduo	0,679	4	0,147			
Total	3,961	10				
% de variação explicada: 82,40%						
% máxima de variação explicável: 99,82%						
<b>FRAP</b>						
<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>GL<sup>a</sup></b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calc.</b>	<b>F tab.</b>	<b>p-valor</b>
Regressão	507,45	6	84,58	9,13	6,163 <sup>b</sup>	0,025
Resíduo	37,06	4	9,26			
Falta de ajuste	30,21	2	15,10	4,41	19,00 <sup>c</sup>	0,184
Erro puro	6,85	2	3,42			
Total	544,51	10				
% de variação explicada: 93,19%						
% máxima de variação explicável: 98,74%						

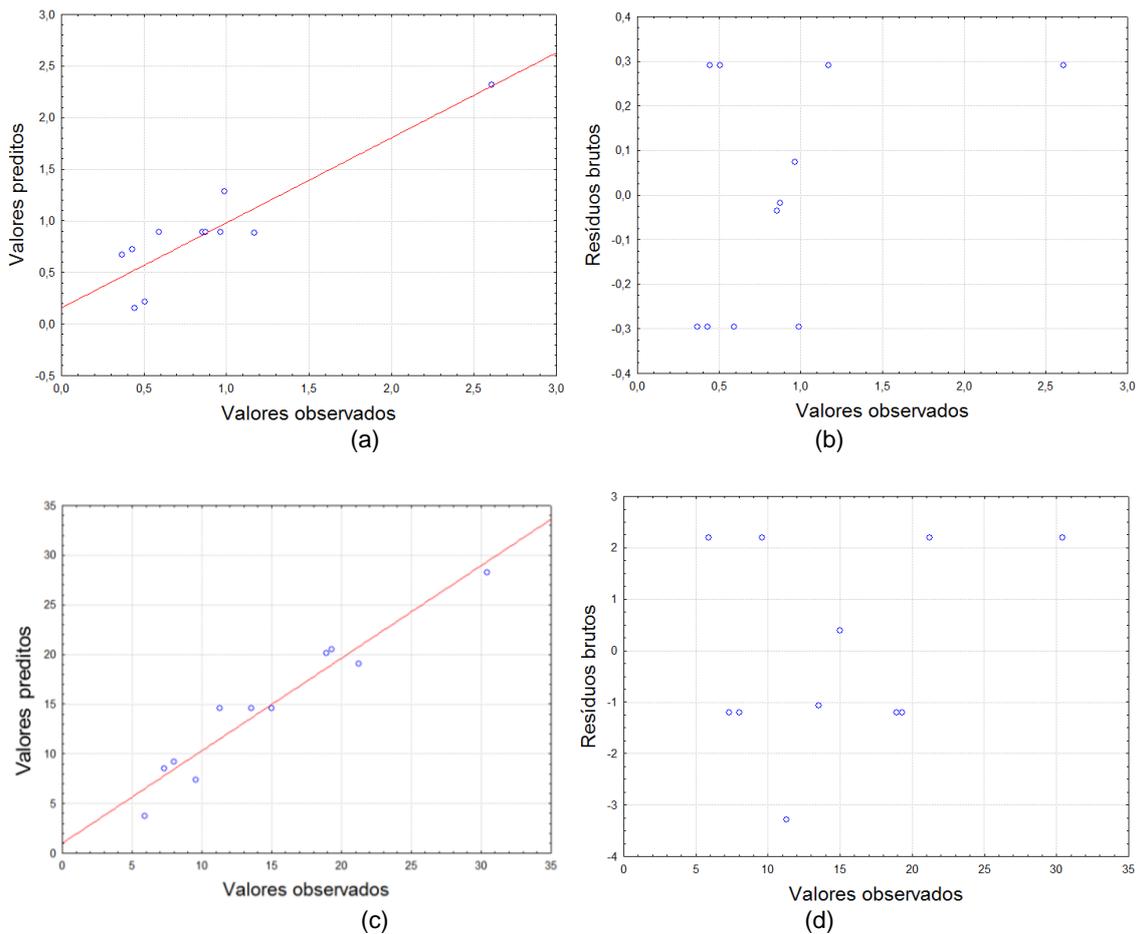
<sup>a</sup> Número de graus de liberdade; <sup>b</sup> F<sub>tabela</sub>(6;4;0,05); <sup>c</sup> F<sub>tabela</sub>(2;2;0,05).

O modelo estatístico DPPH não é significativo. A Figura 47 apresenta os efeitos a partir de superfícies de resposta. Na Figura 47 (a) e (c) a temperatura foi fixada em 50 °C e observa-se que ao aumentar a pressão tem-se um leve aumento da atividade antioxidante, principalmente na maior razão mássica e, ao aumentar a quantidade de cossolvente, aumenta-se mais significativamente a atividade antioxidante. Na Figura 47 (b) e (d), a pressão foi fixada em 200 bar e observa-se que quanto maior a quantidade de etanol utilizada como cossolvente, maior a quantidade de compostos antioxidantes extraídos, e que a temperatura teve efeitos que variaram com a quantidade de cossolvente adicionada.



**Figura 47.** Superfície de resposta ilustrando os efeitos dos diferentes parâmetros de extração razão mássica, pressão e temperatura na atividade antioxidante dos extratos obtidos por SFE com adição de cossolvente avaliados pelos métodos (a)(b) DPPH e (c)(d) FRAP.

A Figura 48 apresenta os gráficos de resíduos, os gráficos de valores observados x valores preditos, (a) e (c), indicam que os modelos preveem corretamente o comportamento observado experimentalmente. Os gráficos de valores preditos x resíduos brutos, (b) e (d), indicam que os resíduos estão dispersos aleatoriamente em torno de zero, com variância constante, concentrados entre -0,4 e 0,4 para DPPH e entre -4 e 3 para FRAP.



**Figura 48. Gráficos de resíduos do modelo estatístico (a)(b) DPPH e (c)(d) FRAP para extração com fluido supercrítico com adição de cossolvente.**

Verifica-se assim que, a adição de etanol favoreceu a extração de compostos com atividade antioxidante e se detectou que a pressão e a temperatura não tiveram grande influência nos resultados, uma vez que apresentaram efeitos aleatórios.

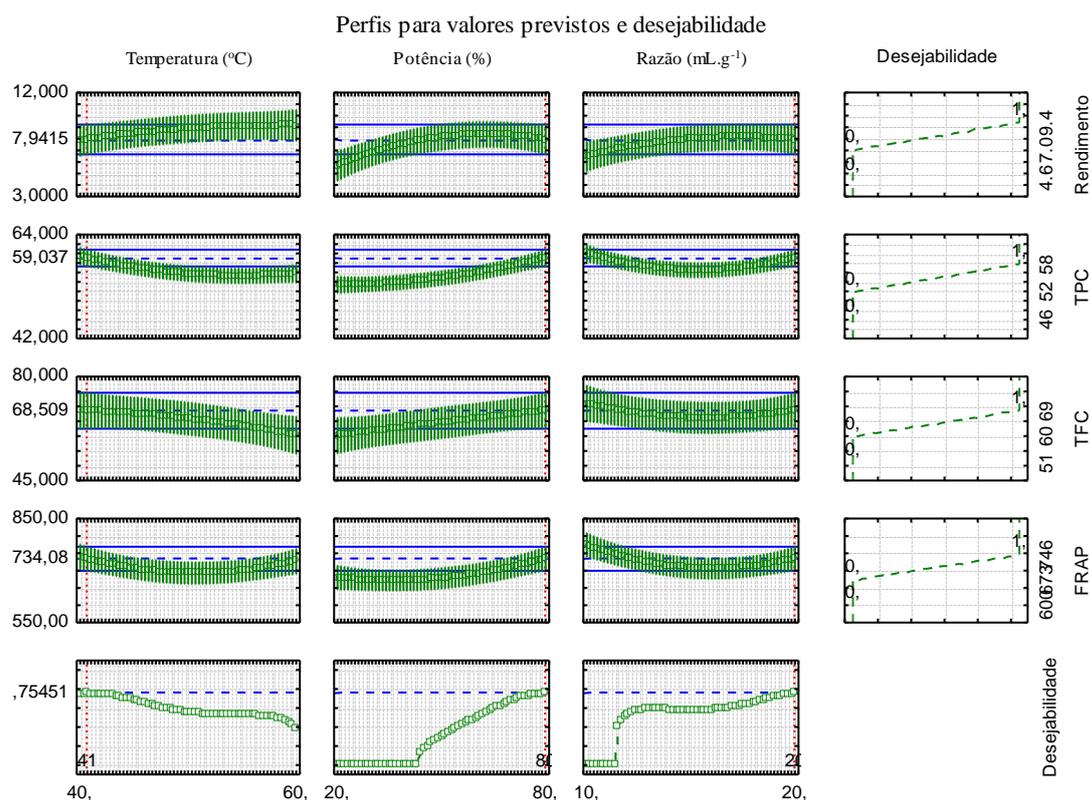
## 5.8. Otimização do processo UAE

Um dos objetivos deste estudo é maximizar as quatro respostas simultaneamente (rendimento da extração, TPC, TFC e FRAP) usando UAE dentro da faixa já avaliada. A determinação das condições ótimas para a extração foi realizada através da otimização multiobjetivo com restrições usando funções de desejabilidade global proposta por Derringer e Suich (1980). Nessa abordagem, cada função resposta é transformada em uma função individual de desejabilidade,  $d(y_i)$ , compreendida no intervalo 0 e 1. Essa transformação depende de um julgamento (subjetivo) da importância do valor correspondente da resposta. Se a resposta for totalmente desejável,  $d(y_i) = 1$ , e se a resposta estiver fora da região aceitável,  $d(y_i) = 0$  (Calado e

Montgomery, 2003). Assim, as variáveis independentes são escolhidas combinando a desejabilidade de cada variável-resposta através da média geométrica, o que dá a função desejabilidade global D.

O software *Statistica 7* (STATSOFT), apresenta uma ferramenta chamada “Response desirability profiling” em que é possível obter os perfis de desejabilidade globais em função de cada variável independente, além de indicar o valor ótimo de cada variável independente que maximiza a desejabilidade global do processo. Os gráficos da resposta prevista pelo modelo e os perfis de desejabilidade global permitem observar como as mudanças nos níveis de cada variável independente influenciam em cada variável-resposta e na desejabilidade global, respectivamente.

Na Figura 49 é apresentado o comportamento do rendimento da extração, TPC, TFC e FRAP em função das variáveis temperatura, potência e razão solvente/folha. Além disso, pode ser visualizado o perfil desejabilidade global da função de cada uma das variáveis.

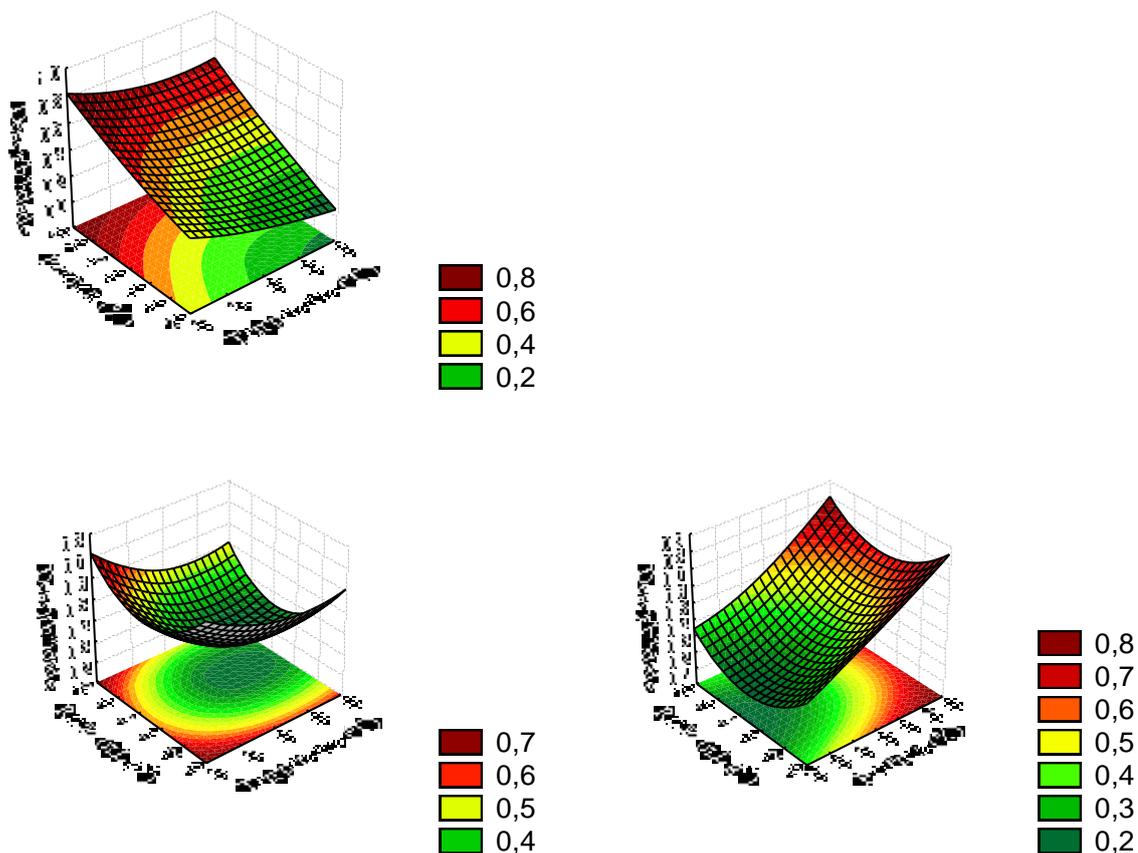


**Figura 49.** Respostas previstas pelo modelo (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> linhas) e perfis de desejabilidade global (5<sup>a</sup> linha), em função das variáveis independentes (cada uma das colunas) para o processo de UAE.

A Figura 49 mostra os valores dos pontos ótimos para as quatro variáveis-resposta e as condições operacionais que levam ao ótimo das respostas: 41,0 °C, 80% de

potência e razão solvente/folha de 20 mL.g<sup>-1</sup>. Observa-se que a função desejabilidade foi maximizada em uma desejabilidade global de 0,755.

A Figura 50 mostra as superfícies de resposta da função desejabilidade em função das variáveis potência, temperatura e razão solvente/folha.



**Figura 50. Superfícies de resposta da função desejabilidade em função das variáveis de extração na otimização da UAE**

As superfícies de resposta indicam que para maximizar o rendimento, os valores de TFC, TPC e FRAP simultaneamente deve-se operar na maior potência, em temperaturas mais baixas e com razão solvente/folha ou máxima ou mínima, tendo o valor máximo definido com base na Figura 49.

A fim de verificar a adequabilidade do modelo, foram realizados experimentos em triplicata na condição ótima. Os valores preditos e experimentais para cada parâmetro estão apresentados na Tabela 42.

**Tabela 42. Valores preditos pela função desejabilidade e observado experimentalmente**

Resposta	Média predita	IP 95% menor	Valor observado	IP 95% maior
Rendimento	8,11	6,03	8,33±0,32	10,19
TPC	57,48	54,64	59,47±0,71	60,32
TFC	67,48	58,11	62,30±3,38	76,85
FRAP	715,6	660,1	726,7±15,7	771,0

TPC: Teor de fenólicos totais expresso em  $\text{EAG} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ; TFC: teor de flavonoides totais expresso em  $\text{mg EQ} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ; FRAP: capacidade antioxidante expressa em  $\mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ; IP: Intervalo predito.

Os valores obtidos experimentalmente estão próximos aos valores preditos, confirmando a previsibilidade dos modelos de extração das folhas de *B. forficata* na condição de extração ótima.

O rendimento da extração assistida por ultrassom na condição ótima foi estatisticamente igual ao rendimento obtido por maceração usando etanol como solvente, a vantagem é que a extração por ultrassom é muito mais rápida (480 vezes). Este rendimento foi menor do que o obtido por Soxhlet utilizando etanol como solvente, mas também apresenta a vantagem de ser 24 vezes mais rápido, ser operado em uma temperatura menor e com uma relação menor de solvente/folha quando comparado ao Soxhlet ( $25 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ). O rendimento da extração utilizando líquido pressurizado com etanol apresentou rendimento ligeiramente maior do que o obtido por ultrassom, com um tempo de 2,7 vezes maior de extração e com uma razão solvente/folha de  $32 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ . Embora o rendimento seja um pouco menor do que o obtido pelos casos relatados, foi maior do que todas as outras condições testadas, além disso, deve-se levar em consideração o teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos.

O teor de flavonoides do extrato obtido por ultrassom na condição ótima foi maior do que em todos os extratos obtidos por Soxhlet, maceração e extração supercrítica. Os teores de flavonoides nesta condição são estatisticamente iguais aos dos extratos obtidos por líquido pressurizado e na extração com cossolvente, ambos utilizando etanol. Em relação ao teor de compostos fenólicos, a condição ótima de extração por ultrassom proporcionou extratos com teores estatisticamente iguais aos obtidos por Soxhlet, por líquido pressurizado e por cossolvente utilizando etanol, maior que em todas as outras condições avaliadas.

A atividade antioxidante dos extratos obtidos na condição ótima da extração assistida por ultrassom foi estatisticamente igual às atividades antioxidantes dos extratos obtidos por líquido pressurizado utilizando acetato de etila e etanol como solventes e maior que todas as outras formas de extração avaliadas.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que as folhas de *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* podem ser consideradas uma boa fonte de compostos fenólicos e flavonoides com atividade antioxidante. Entre os métodos avaliados, o método de Soxhlet resultou em maiores rendimentos, seguido dos métodos de extração com líquido pressurizado, maceração e ultrassom. Considerando o tempo de extração e o volume de solvente utilizado, os métodos não convencionais líquido pressurizado e ultrassom se apresentam mais vantajosos.

O etanol, devido à sua polaridade, foi o solvente que resultou em maiores rendimentos, e também devido à sua capacidade de doar prótons, resultou em extratos com maiores teores de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em todos os métodos de extração avaliados. Além disso, o etanol é mais adequado para indústrias alimentícias e farmacêuticas do que o *n*-hexano e o acetato de etila. Desta forma, este solvente foi escolhido como cossolvente na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico e na otimização da extração assistida por ultrassom.

As condições ótimas obtidas para a extração assistida por ultrassom utilizando etanol como solvente foi de 41 °C, 80% da potência e razão solvente/massa de 20 mL.g<sup>-1</sup>, além disso é processo com menor tempo de extração. Entre os fatores avaliados na extração assistida por ultrassom, a potência apresentou o efeito mais significativo devido ao aumento na cavitação e seus efeitos mecânicos. A temperatura teve efeito positivo no rendimento, e negativo nos valores de TFC, TPC, FRAP e DPPH, indicando que o aumento na temperatura leva a extração de outros compostos que não são de interesse. Os modelos polinomiais quadráticos de segunda-ordem se ajustaram adequadamente aos dados experimentais e foram úteis para prever e otimizar o processo de extração em termos de rendimento, TPC, TFC e FRAP, dentro dos limites experimentais.

Nas extrações com dióxido de carbono supercrítico, a temperatura e a pressão tiveram efeitos positivos no rendimento. O modelo empírico de Sovová representou adequadamente as curvas cinéticas experimentais em todas as condições avaliadas, sendo a modelagem matemática importante em estudos de otimização, para avaliações econômicas e como ferramenta para projetos em escala industrial.

O método de extração supercrítica foi o que resultou em extratos com menor teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. Resultados baixos

também foram obtidos ao usar o *n*-hexano como solvente, isso devido à baixa polaridade desses solventes e, conseqüentemente, ao baixo poder de solvatação de compostos com atividade antioxidante.

A adição de cossolvente na extração supercrítica resultou no aumento do rendimento e extratos com elevados teores de compostos fenólicos e flavonoides. Na extração supercrítica com a adição de cossolvente, o aumento da pressão resultou em maiores rendimentos em condições isotérmicas, enquanto que o aumento da temperatura resultou na diminuição do rendimento da extração em condições isobáricas, indicando que o rendimento está relacionado com a densidade do CO<sub>2</sub> e do cossolvente, que predominou sobre o efeito da pressão de vapor.

Compostos bioativos, tais como  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol, fitol e  $\beta$ -sitosterol, foram encontrados em quase todos os extratos obtidos com teores variados. Esses compostos são de grande interesse dado aos benefícios que causam à saúde humana. Devido à grande variabilidade na composição, não foi possível indicar qual o melhor extrato ou a melhor técnica de extração, uma vez que depende da aplicação do extrato. A canferitrina, conhecida pelo seu efeito hipoglicemiante, foi obtida com maior teor no extrato obtido pelo método de Soxhlet, utilizando acetato de etila como solvente, já para os métodos PLE e UAE, o etanol foi o solvente que proporcionou maiores teores de canferitrina nos extratos, o que indica que métodos de extrações diferentes promovem diferentes interações soluto-solvente.

Considerando a aplicabilidade dos extratos e o pequeno número de estudos envolvendo a forma de extração da canferitrina, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os extratos das folhas de pata de vaca apresentam potenciais antioxidantes e podem ser utilizados para a geração de outros produtos com valor agregado.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar o efeito da adição de cossolvente em fluxo contínuo na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico;
- Efetuar a modelagem matemática das cinéticas de extração supercrítica com adição de cossolvente;
- Efetuar a modelagem matemática das cinéticas de extração com líquido pressurizado;
- Incluir na modelagem matemática outros modelos de literatura recente;
- Avaliar o uso de diferentes concentrações de mistura etanol-água nos diferentes métodos de extração;
- Avaliar os efeitos da potência, temperatura e razão massa:solvente no teor de canferitrina de extratos obtidos por ultrassom;
- Quantificar, por meio de cromatografia líquida, o teor de  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol, fitol e  $\beta$ -sitosterol;
- Avaliar a atividade hipoglicemiante *in vivo* dos extratos em ratos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURAS, N. M.; STEVANOVIC, N. R.; MILCIC, M. K.; Đ. LOLIC, A.; NATIC, M. M.; TESIC, Z. L.; BAOSIC, R. M. **Influence of the Structure on the Antioxidant Activity of Tetradentate Schiff Bases and their Copper(II) Complexes: Possible Mechanisms.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 24, n. 8, p. 1322–1328, 2013.
- ALBUQUERQUE, B. R.; PRIETO, M. A.; BARREIRO, M. F.; RODRIGUES, A.; CURRAN, T. P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. **Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques.** Industrial Crops and Products, v. 95, p. 404–415, 2017.
- ALMEIDA, P. P. **Extração de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.) com misturas de solventes a alta pressão.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos.** Quimica Nova, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. **Antioxidant Activity of Essential Oils.** Journal of agricultural and food ..., v. 61, n. 46, p. 10835–10847, 2013.
- ANDRADE, K. S.; GONÇALVES, R. T.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. **Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition.** Talanta, v. 88, p. 544–552, jan. 2012.
- ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes Naturais: Técnicas De Extração.** Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 24, n. 2, p. 319–336, 2006.
- ARIGONY, A. L. V. **Determinação química e biológica de *Bauhinia forficata* Link subespécie *pruinosa* (Pata-de-vaca - Leguminosae).** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. **The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark.** Industrial Crops and Products, v. 34, n. 1, p. 838–844, jul. 2011.
- AYOUB, Z.; MEHTA, A. **Medicinal plants as potential source of antioxidant agents: A review.** Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, v. 11, n. 6, p. 50–56, 2018.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. **Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review.** Journal of Food Engineering, v. 117, n. 4, p. 426–436, ago. 2013.
- AZWANIDA, N. **A Review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation.** Medicinal & Aromatic Plants, v. 04, n. 03, p. 3–8, 2015.
- BALACHANDRAN, S.; KENTISH, S. E.; MAWSON, R. **The effects of both preparation method and season on the supercritical extraction of ginger.** Separation and Purification Technology, v. 48, n. 2, p. 94–105, 2006.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** Food Chemistry, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; FERREIRA, I. C. F. R. **Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays.** v. 45, p. 1731–1737, 2007.

BARZOTTO, I. L. M.; SANTOS, K. A.; SILVA, E. A. DA; SENE, A. C.; SILVA, N. S. DA; VIEIRA, L. **Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and  $\alpha$ -tocopherol content.** Journal of Supercritical Fluids, v. 143, p. 55–63, 2019.

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

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

BJÖRKLUND, E.; JÄREMO, M.; MATHIASSEN, L.; ÅKE JÖNSSON, J.; KARLSSON, L. **Illustration of important mechanisms controlling mass transfer in supercritical fluid extraction.** Analytica Chimica Acta, v. 368, n. 1–2, p. 117–128, 1998.

BLASCO, M.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; BON, J.; CARRERES, J. E.; MULET, A. **Effect of blanching and air flow rate on turmeric drying.** Food Science and Technology International, v. 12, n. 4, p. 315–323, 2006.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, É. O.; COSTA E SILVA, B.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. DE C.; VISENTAINER, J. V. **Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis.** Chemistry Central Journal, v. 8, n. 48, p. 1–9, 2014.

BOX, J. D. **Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters.** Water Research, v. 17, n. 5, p. 511–525, 1983.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.** LWT - Food Science and Technology, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRASKEM. **Boletim Técnico 06 PVC**Tabela de Peneiras Padrão. [s.l: s.n.]. Disponível em: [https://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/html/boletm\\_tecnico/Tabela\\_de\\_peneiras\\_padrao.pdf](https://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/html/boletm_tecnico/Tabela_de_peneiras_padrao.pdf)>. Acessado em: fevereiro de 2017.

BRUM, L. F. W. **Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus dives*) como potenciais antioxidantes em alimentos.** p. 135, 2010.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process.** [s.l: s.n.]. v. 4

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica.** e-papers, Rio de Janeiro, 2003.

- CAMPOS, L. M. A. S.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. **Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 34, n. 2, p. 163–170, 2005.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. **A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.** Food and Chemical Toxicology, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.
- CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. **Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives.** Trends in Food Science and Technology, v. 71, p. 107–120, 2018.
- CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. **Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes.** Analytica Chimica Acta, v. 732, p. 100–104, 2012.
- CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. **Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: Determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos.** Revista de Nutrição, v. 24, n. 1, p. 173–187, 2011.
- CASTRO, M. D. L. DE; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. **The role of ultrasound in analytical derivatizations.** Journal of Chromatography B, v. 879, n. 17–18, p. 1189–1195, 2011.
- CAVALHEIRO, C. V. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea*.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, 2013.
- CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. **Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods.** Journal of Food and Drug Analysis, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.
- CHEAH, E. L. C.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. **Optimization of supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of active principles from *Magnolia officinalis* using the Taguchi design.** Separation and Purification Technology, v. 71, n. 3, p. 293–301, 2010.
- CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G. **Enhancing Extraction Processes in the Food Industry.** [s.l: s.n.].
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. **Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 34, p. 540–560, 2017.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. **Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 18, p. 813–835, 2011.
- CHOE, E.; MIN, D. B. **Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 8, n. 4, p. 345–358, 2009.
- CRUZ, P. N.; FETZER, D. L.; AMARAL, W.; ANDRADE, E. F. DE; CORAZZA, M. L.; MASSON, M. L. **Antioxidant activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> + ethanol solvent.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 146, n. November 2018, p. 55–64, 2019.

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

CUNHA, A. M. DA; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. **Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link.** Phytomedicine, v. 17, p. 37–41, 2010.

CURCIO, S. A. F.; STEFAN, L. F. B.; RANDI, B. A.; DIAS, M. A.; SILVA, R. E. DA; CALDEIRA, E. J. **Hypoglycemic effects of an aqueous extract of *Bauhinia forficata* on the salivary glands of diabetic mice.** Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 25, n. 3, p. 493–499, 2012.

DAGNON, S.; BOJILOV, D.; DOCHEVA, M.; EDREVA, A. **The Relationship between Main Polyphenol Components and Free Radical Scavenging Activity of Selected Medicinal Plants.** International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, v. 10, n. 03, p. 131–138, 2018.

DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. DE M. P.; AGUILAR, R.; RUDGE, M. V. C. **Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions.** Phytomedicine, v. 11, p. 196–201, 2004.

DANIELSKI, L. **Solubilidade das oleoresinas de calêndula (*Calendula officinalis* L.) e cavalinha (*Equisetum arvense*) em CO<sub>2</sub> supercrítico.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2020.

DERRINGER, G.; SUICH, R. **Simultaneous Optimization of Several Response Variables.** Journal of Quality Technology, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DIAS, A. L. B.; SERGIO, C. S. A.; SANTOS, P.; BARBERO, G. F.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. **Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling.** Journal of Food Engineering, v. 198, p. 36–44, abr. 2017.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 7, p. 2441–2469, 2006.

DIEHL, L. C. P. **Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de própolis usando o dióxido de carbono supercrítico.** Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2008.

DOMINGOS, A. H.; JÚNIOR, L. C. **Plantas medicinais: patas-de-vaca.** Série Produtor Rural, v. 60, p. 32, 2016.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. **Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae).** Biochemical Systematics and Ecology, v. 32, n. 8, p. 747–753, 2004.

EKART, M. P.; BENNETT, K. L.; EKART, S. M.; GURDIAL, G. S.; LIOTTA, C. L.; ECKERT, C. A. **Cosolvent interactions in supercritical fluid solutions.** AIChE Journal, v. 39, n. 2, p. 235–248, 1993.

FARIAS, L. DA S.; MENDEZ, A. S. L. **LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. *pruinosa*.** Química Nova, v. 37, n. 3, p. 483–486, 2014.

- FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. **Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil.** Journal of Food Engineering, v. 54, n. 0260, p. 263–269, 2002.
- FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. **Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 14, n. 3, p. 235–245, 1999.
- FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. ***Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties.** Food Chemistry, v. 134, n. 2, p. 894–904, 2012.
- FILIPPIS, F. M. **Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de óleos essenciais de Hon-sho e Ho-sho – Experimentos e Modelagem.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2001.
- FORTUNATO, R. H. **Revision del género *Bauhinia* (Cercideae, Caesalpinioidea, Fabaceae) para la Argentina.** Darwiniana, v. 4, n. 1, p. 527–557, 1986.
- FREITAS, L. D. S.; DARIVA, C.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B. **Effect of experimental parameters in the pressurized liquid extraction of brazilian grape seed oil.** Separation and Purification Technology, v. 116, p. 313–318, 2013.
- FROHLICH, P. C.; SANTOS, K. A.; PALÚ, F.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, C. DA; SILVA, E. A. DA. **Evaluation of the effects of temperature and pressure on the extraction of eugenol from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves using supercritical CO<sub>2</sub>.** The Journal of Supercritical Fluids, 2018.
- GARCIA-MENDOZA, M. DEL P.; ESPINOSA-PARDO, F. A.; BASEGGIO, A. M.; BARBERO, G. F.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; ROSTAGNO, M. A.; MARTINEZ, J. **Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids.** Journal of Supercritical Fluids, v. 119, p. 9–16, 2017.
- GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H.; JEON, J. Y.; JO, I. H. **Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds , Antioxidants , and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p. 4988–4994, 2009.
- GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares.** In: Operações Unitárias, v. 1. São Paulo: 294 p., 1983.
- GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; COMAS-SERRA, F.; FEMENIA, A.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S. **Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 22, p. 506–514, 2015.
- GUINDANI, C.; PODESTÁ, R.; BLOCK, J. M.; ROSSI, M. J.; MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. **Valorization of chia (*Salvia hispanica*) seed cake by means of supercritical fluid extraction.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 112, p. 67–75, jun. 2016.
- HANI, N. M.; TORKAMANI, A. E.; ZAINUL ABIDIN, S.; MAHMOOD, W. A. K.; JULIANO, P. **The effects of ultrasound assisted extraction on antioxidative activity of polyphenolics obtained from *Momordica charantia* fruit using response surface approach.** Food Bioscience, v. 17, n. November 2016, p. 7–16, 2017.

HASMIDA, M. N.; NUR SYUKRIAH, A. R.; LIZA, M. S.; MOHD AZIZI, C. Y. **Effect of different extraction techniques on total phenolic content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* galls.** International Food Research Journal, v. 21, n. 3, p. 1039–1043, 2014.

HELENO, S. A.; DIZ, P.; PRIETO, M. A.; BARROS, L.; RODRIGUES, A.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R. **Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction.** Food Chemistry, v. 197, p. 1054–1063, abr. 2016.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. **Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review.** Food Chemistry, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006.

HERZI, N.; CAMY, S.; BOUAJILA, J.; DESTAC, P.; ROMDHANE, M.; CONDORET, J. S. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling.** Journal of Supercritical Fluids, v. 82, p. 72–82, 2013.

HIDALGO, G.-I.; ALMAJANO, M. **Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review.** Antioxidants, v. 6, n. 1, p. 7, 2017.

HO, L.-H.; RAMLI, N. F.; TAN, T.-C.; MUHAMAD, N.; HARON, M. N. **Effect of extraction solvents and drying conditions on total phenolic content and antioxidant properties of watermelon rind powder.** Sains Malaysiana, v. 47, n. 1, p. 99–107, 2018.

HOLLENDER, J.; SHNEINE, J.; DOTT, W.; HEINZEL, M.; HAGEMANN, H. W.; GÖTZ, G. K. E. **Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases.** Journal of Chromatography A, v. 776, n. 2, p. 233–243, 1997.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. **The chemistry behind antioxidant capacity assays.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

INFANTE, J.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M. DE. **Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits.** PLOS ONE, v. 11, n. 4, p. e0152974, 6 abr. 2016.

JERMAN, T.; TREBŠE, P.; MOZETIČ VODOPIVEC, B. **Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds.** Food Chemistry, v. 123, n. 1, p. 175–182, 2010.

JOVANOVIĆ, A. A.; DORDEVIC, V. B.; ZDUNIC, G. M.; PLJEVLJAKUSIC, D. S.; SAVIKIN, K. P.; GODEVAC, D. M.; BUGARSKI, B. M. **Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques.** Separation and Purification Technology, v. 179, p. 369–380, 2017.

JUCHEN, P. T. **Extração do óleo de farelo de arroz parboilizado utilizando dióxido de carbono supercrítico e etanol.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2019.

JULIANE, C. **Ação hipoglicemiante da unha-de-vaca.** Review of Medicine,

Pharmacy, Chemistry and Physics, v.2, p.165-169, 1929.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. **Review of methods to determine antioxidant capacities.** Food Analytical Methods, v. 2, n. 1, p. 41–60, 2009.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. **Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *cissus sicyoides*.** Biological Research, v. 41, n. 2, p. 165–171, 2008.

KLEIN, E. J. **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 de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo - PR, 2016.

KLEIN, E. J.; SANTOS, K. A.; PALÚ, F.; VIEIRA, M. G. A.; SILVA, E. A. DA. **Use of supercritical CO<sub>2</sub> and ultrasound-assisted extractions to obtain  $\alpha/\beta$ -amyrin-rich extracts from uvaia leaves (*Eugenia pyriformis* Cambess.).** The Journal of Supercritical Fluids, v. 137, p. 1–8, jul. 2018.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. **Fitoterápicos : um mercado promissor.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 30, n. 3, p. 241–248, 2009.

KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. **Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures.** Journal of Supercritical Fluids, v. 34, n. 2 SPEC. ISS., p. 209–214, 2005.

KUPSKI, S. C. **Modelagem matemática do processo de extração supercrítica de *Humulus lupulus* L. com CO<sub>2</sub>.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo - PR, 2015.

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.

LEYVA-JIMÉNEZ, F. J.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; BORRÁS-LINARES, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. **Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction for recovering bioactive compounds from *Lippia citriodora* leaves.** Food Research International, v. 109, p. 213–222, 2018.

LINO, C. DE S.; DIÓGENES, J. P. L.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A. P. G.; ANDRADE NETO, M.; ALVES, R. S.; QUEIROZ, M. G. R. DE; SOUSA, F. C. F. DE; VIANA, G. S. B. **Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 27, n. 1, p. 125–127, 2004.

LORENSI, J. P.; MOREIRA, M. F. P. **Análise do encolhimento e da cinética de secagem da manga de convecção natural.** 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. . **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512p, 2002.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. **Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future.** Analytica Chimica, v. 369, p. 1–10, 1998.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. **Soxhlet extraction : Past and present panacea.** Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

MARAN, J. P.; PRIYA, B.; MANIKANDAN, S. **Modeling and optimization of**

**supercritical fluid extraction of anthocyanin and phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruit pulp.** Journal of Food Science and Technology, v. 51, n. 9, p. 1938–1946, 2014.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. M. **Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods.** Separation and Purification Technology, v. 52, n. 3, p. 487–496, jan. 2007.

MARQUES, G. S.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; ROLIM, L. A.; XAVIER, H. S.; NETO, P. J. R.; SOARES, L. A. L. **Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 23, n. 1, p. 51–57, jan. 2013.

MARQUES, G. S.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L.; ROLIM-NETO, P. J. **Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras.** Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada, v. 33, n. 1, p. 57–62, 2012.

MARQUES, GRAZIELLA SILVESTRE; ROLIM, L.; ALVES, L.; SILVA, C.; SOARES, L.; ROLIM-NETO, P. **Estado da arte de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) como alternativa terapêutica para o tratamento do Diabetes mellitus.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 34, n. 3, p. 313–320, 2013.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. **Extração por fluido supercrítico.** Revista Brasileira de Farmacognosia, p. 185-200, 1996.

MAZZUTTI, S. **Obtenção de Extrato de Cogumelo do Sol (*Agaricus Brasiliensis*): Atividade Antioxidante, Antibacteriana e Antifúngica.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2012.

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

MAZZUTTI, S.; RIEHL, C. A. S.; IBAÑEZ, E.; FERREIRA, S. R. S. **Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 119, p. 211–220, jan. 2017.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: MARTÍNEZ, J. L. (Ed.). . Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p. 243–274.

MELGAR-LALANNE, G.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A. J.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, M.; AZUARA, E. **Oleoresins from *Capsicum* spp.: Extraction Methods and Bioactivity.** Food and Bioprocess Technology, v. 10, n. 1, p. 51–76, 2017.

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.** Journal of Supercritical Fluids, v. 92, p. 115–176, 2014.

MENDES, R. L.; NOBRE, B. P.; CARDOSO, M. T.; PEREIRA, A. P.; PALAVRA, A. F. **Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae.** Inorganica Chimica Acta, v. 356, p. 328–334, 2003.

- MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. **Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review.** Journal of Chemistry, v. 2016, p. 1–16, 2016.
- MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. **Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up.** Journal of Supercritical Fluids, v. 51, n. 1, p. 10–16, 2009.
- MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. **Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition.** Bioresource Technology, v. 101, n. 14, p. 5622–5632, jul. 2010.
- MICELI, N. *et al.* **Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill . berries from Turkey.** Food and Chemical Toxicology, v. 49, n. 10, p. 2600–2608, 2011.
- MICELI, N.; BUONGIORNO, L. P.; CELI, M. G.; CACCIOLA, F.; DUGO, P.; DONATO, P.; MONDELLO, L.; BONACCORSI, I.; TAVIANO, M. F. **Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link . (Fabaceae) leaves extract.** Natural Product Research, v. 30, n. 11, p. 1229–1239, 2015.
- MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. **Bioresource Technology Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods.** Bioresource Technology, v. 100, n. 24, p. 6615–6623, 2009.
- MIYAKE, E.; AKISUE, G.; AKISUE, M. **Caracterização farmacognóstica da pata-de-vaca.** Revista Brasileira de Farmacognosia, P. 58-69, 1986.
- MOREAU, R. A.; POWELL, M. J.; SINGH, V. **Pressurized Liquid Extraction of Polar and Nonpolar Lipids in Corn and Oats with Hexane, Methylene Chloride, Isopropanol, and Ethanol.** JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 80, n. 11, p. 1063–1067, 2003.
- MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRAN, S.; CABEZAS, J. L. **Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 8, p. 3408–3412, 2000.
- MUSTAFA, A.; TREVINO, L. M.; TURNER, C. **Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-products.** Molecules, v. 17, n. 2, p. 1809–1818, 2012.
- MUSTAFA, A.; TURNER, C. **Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review.** Analytica Chimica Acta, v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011.
- NASCIMENTO, C. M. **Estudo de modelos matemáticos aplicados à cinética de extração de óleos em condições supercríticas.** [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2017.
- NICÁCIO, A. E.; ROTTA, E. M.; BOEING, J. S.; BARIZÃO, É. O.; KIMURA, E.; VISENTAINER, J. V.; MALDANER, L. **Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds from *Eugenia involucrata* DC. Fruits by UHPLC-MS/MS.** Food Analytical Methods, v. 10, n. 8, p. 2718–2728, 11 ago. 2017.
- NOGUEIRA, A. C. O.; SABINO, C. V. S. **Revisão do gênero *Bauhinia* abordando**

**aspectos científicos das espécies *Bauhinia forficata* Link e *Bauhinia variegata* L. de interesse para a Indústria farmacêutica.** Revista Fitos, v. 7, n. 2, p. 77–84, 2012.

OGUNLESI, M.; OKIEI, W.; OFOR, E.; OSIBOTE, A. E. **Analysis of the essential oil from the dried leaves of *Euphorbia hirta* Linn (Euphorbiaceae), a potential medication for asthma.** African Journal of Biotechnology, v. 8, n. 24, p. 7042–7050, 2009.

OKIYAMA, D. C. G.; SOARES, I. D.; CUEVAS, M. S.; CREVELIN, E. J.; MORAES, L. A. B.; MELO, M. P.; OLIVEIRA, A. L.; RODRIGUES, C. E. C. **Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent.** Food Research International, v. 114, n. May, p. 20–29, 2018.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** Quimica Nova, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. **Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms.** Journal of Ethnopharmacology, v. 98, n. 1–2, p. 213–216, 2005.

OLIVEIRA, F. DE; SAITO, M. L. **Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 4, p. 170–190, 1987.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. **Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis.** Food Research International, v. 74, p. 10–36, 2015.

OSORIO-TOBÓN, J. F.; MEIRELES, A. A. **Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids.** Food and Public Health, v. 3, n. 6, p. 289–303, 2013.

PAULA, A. C. C. F. F.; ALVARENGA, A. A.; BLATT, C. T. T.; YOUNG, M. C. M.; LADEIRA, A. M. **Phenolic constituents of young plants of *Bauhinia forficata* link.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2002.

PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. **BMC Complementary and Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats.** v. 7, p. 1–7, 2004.

PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. **Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats.** Journal of Ethnopharmacology, v. 81, p. 191–197, 2002.

PEREIRA, A. C. S.; RIBEIRO, G. E.; SOUZA, L. C. R.; RUFINO, L. R. A.; CABRAL, I. S. R.; BORIOLLO, M. F. G.; NOGUEIRA, D. A.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. **Atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* Link sobre *Herpetomonas samuelessoai* (Galvão.) Roitman.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 16, n. 3, p. 585–592, 2014.

PHENOMENEX. **HPLC Column Protection Guide Version 0610.** Disponível em: <<http://phx.phenomenex.com/lib/gu54810610.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2019.

PIANTINO, C. R.; AQUINO, F. W. B.; FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; CABRAL, F. A. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phenolic compounds from *Baccharis***

- dracunculifolia*. Journal of Supercritical Fluids, v. 47, n. 2, p. 209–214, 2008.
- PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. **Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts**. Journal of Food Engineering, v. 77, n. 1, p. 57–63, 2006.
- PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; CHEMAT, F. **Ultrasound-assisted extraction**. In: ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. Natural product extraction: Principles and applications. RSC Publishing. v. 1, p. 89–112, 2013.
- PINHEIRO, T. S. D. B.; JOHANSSON, L. A. P.; PIZZOLATTI, M. G.; BIAVATTI, M. W. **Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* Link**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, n. 2, p. 431–436, 2006.
- PIZZOLATTI, M. G.; JR., C. A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. DE; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. **Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae)**. Química Nova, v. 26, n. 4, p. 466–469, 2003.
- PONTES, M. A. N.; LIMA, D. S. DE; OLIVEIRA, M. B. F. DE; OLIVEIRA FILHO, A. A. DE. ***Bauhinia forficata* L. e sua ação hipoglicemiante**. Arch Health Invest, v. 6, n. 11, p. 509–512, 2017.
- POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. **Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis**. Journal of Chromatography A, v. 1163, p. 2–24, 2007.
- PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. **Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation**. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 23, n. 9, p. 644–653, 2004.
- PUROHIT, A. J.; GOGATE, P. R. **Ultrasound-assisted extraction of  $\beta$  -carotene from waste carrot residue: effect of operating parameters and type of ultrasonic irradiation**. Separation Science and Technology, v. 50, n. 10, p. 1507–1517, 2015.
- QUEIROZ, A.; CAJAIBA, J. **A sustainable process for (-)- $\alpha$ -bisabolol extraction from *Eremanthus erythropappus* using supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as co-solvent**. Journal of Supercritical Fluids, v. 110, p. 39–46, 2016.
- RABELO, R. S.; MACHADO, M. T. C.; MARTÍNEZ, J.; HUBINGER, M. D. **Ultrasound assisted extraction and nanofiltration of phenolic compounds from artichoke solid wastes**. Journal of Food Engineering, v. 178, p. 170–180, 2016.
- RADOJKOVIĆ, M.; ZEKOVIĆ, Z.; MAŠKOVIĆ, P.; VIDOVIĆ, S.; MANDIĆ, A.; MIŠAN, A.; ĐUROVIĆ, S. **Biological activities and chemical composition of Morus leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction**. Journal of Supercritical fluids, v. 117, p. 50-58, 2016.
- RAMIĆ, M.; VIDOVIĆ, S.; ZEKOVIĆ, Z.; VLADIĆ, J.; CVEJIN, A.; PAVLIĆ, B. **Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 23, p. 360–368, 2015.
- REIS, P. **Extração e avaliação do potencial antioxidante dos extratos obtidos da semente do tamarindo doce (*Tamarindus indica*)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2013.
- REIS, P. M. C. L.; DARIVA, C.; VIEIRA, G. Â. B.; HENSE, H. **Extraction and**

**evaluation of antioxidant potential of the extracts obtained from tamarind seeds (*Tamarindus indica*), sweet variety.** Journal of Food Engineering, v. 173, p. 116–123, mar. 2016.

REVERCHON, E.; MARCO, I. DE. **Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.** Journal of Supercritical Fluids, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.

RIERA, E.; GOLÁS, Y.; BLANCO, A.; GALLEGO, J. A.; BLASCO, M.; MULET, A. **Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 11, n. 3–4, p. 241–244, 2004.

RODRIGUEZ, J. M. F.; SOUZA, A. R. C. DE; KRÜGER, R. L.; BOMBARDELLI, M. C. M.; MACHADO, C. S.; CORAZZA, M. L. **Kinetics, composition and antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa*) root extracts obtained with supercritical CO<sub>2</sub> and co-solvent.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 135, p. 25–33, maio 2018.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. **Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones.** Journal of Chromatography A, v. 1012, p. 119–128, 2003.

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

SALGUEIRO, A. C. F.; FOLMER, V.; SILVA, M. P. DA; MENDEZ, A. S. L.; ZEMOLIN, A. P. P.; POSSER, T.; FRANCO, J. L.; PUNTEL, R. L.; PUNTEL, G. O. **Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2016, p. 1–9, 2016.

SALGUEIRO, A. C. F.; LEAL, C. Q.; BIANCHINI, M. C.; PRADO, I. O.; MENDEZ, A. S. L.; PUNTEL, R. L.; FOLMER, V.; SOARES, F. A.; ÁVILA, D. S.; PUNTEL, G. O. **The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations.** Journal of Ethnopharmacology, v. 148, n. 1, p. 81–87, 2013.

SAMPAIO, C. F.; LUCCHETTA, N. R.; PUNHAGUI, A. P. F.; BANEDETTI, P. R.; ARAKAWA, N. S.; SEIVA, F. R. F.; FERNANDES, G. S. A. **Alcohol extract of *Bauhinia forficata* link reduces lipid peroxidation in the testis and epididymis of adult Wistar rats.** Microscopy Research and Technique, v. 82, p. 345–351, 2019.

SANTOS, D. N. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.).** Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, 2012.

SANTOS, K. A.; FROHLICH, P. C.; HOSCHEID, J.; TIUMAN, T. S.; GONÇALVES, J. E.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, E. A. **Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO<sub>2</sub> with ethanol and ethyl acetate cosolvents.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 128, p. 323–330, 2017.

SANTOS, K. A.; GONÇALVES, J. E.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, E. A. DA. **Pressurized liquid and ultrasound-assisted extraction of  $\alpha$ -bisabolol from candeia (*Eremanthus erythropappus*) wood.** Industrial Crops and Products, v. 130, n. January, p. 428–435, 2019.

SANTOS, K. A.; KLEIN, E. J.; GAZIM, Z. C.; GONÇALVES, J. E.; CARDOZO-FILHO, L.; CORAZZA, M. L.; SILVA, E. A. DA. **Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythropappus*): Supercritical CO<sub>2</sub> oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 114, p. 1–8, ago. 2016.

- SANTOS, M.; FORTUNATO, R. H.; SPOTORNO, V. G. **Analysis of flavonoid glycosides with potential medicinal properties on *Bauhinia uruguayensis* and *Bauhinia forficata* subspecies *pruinosa***. Natural Product Research, v. 6419, p. 1–5, 2018.
- SARAVANAN, M.; SENTHILKUMAR, P.; KALIMUTHU, K.; CHINNADURAI, V.; VASANTHARAJ, S.; PUGAZHENDHI, A. **Phytochemical and pharmacological profiling of *Turnera subulata* Sm., a vital medicinal herb**. Industrial Crops & Products, v. 124, n. August, p. 822–833, 2018.
- SARTORILLI, P.; CORREA, D. S. **Constituents of essential oil from *Bauhinia forficata* Link**. Journal of Essential Oil Research, v. 19, n. 5, p. 468–469, 2007.
- SAYAGO, C. T. M.; CAMARGO, V. B. DE; BARBOSA, F.; GULARTE, C.; PEREIRA, G.; MIOTTO, S.; CECHINEL-FILHO, V.; PUNTEL, R. L.; FOLMER, V.; MENDEZ, A. **Chemical composition and in vitro antioxidant activity of hydro-ethanolic extracts from *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* and *B. variegata***. Acta Biologica Hungarica, v. 64, n. 1, p. 21–33, 2013.
- SHAHIDI, F.; CAMARGO, A. C. DE. **Tocopherols and Tocotrienols in Common and Emerging Dietary Sources : Occurrence , Applications , and Health Benefits**. International Journal of Molecular Sciences, v. 17, p. 1–29, 2016.
- 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.
- SIDANIUS, J. **Functional food ingredients and nutraceuticals: processing technologies**. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, 2007.
- SIKORA, E.; CIÉSLIK, E.; LESZCZYŃSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIEWICZ, A.; PISULEWSKI, P. M. **The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing**. Food Che, v. 107, p. 55–59, 2008.
- SILVA-LÓPEZ, R. E.; SANTOS, B. C. ***Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)**. Revista Fitos, v. 9, n. 3, p. 217–232, 2015.
- SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. **Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology**. Separation and Purification Technology, v. 55, p. 381–387, 2007.
- SILVA, K. L. DA; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; FILHO, V. C. **Phytochemical and Pharmacognostic Investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae)**. Zeitschrift Naturforschung, v. 55, n. c, p. 478–480, 2000.
- SILVA, K. L. DA; FILHO, V. C. **Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico**. Química Nova, v. 25, n. 3, p. 449–454, 2002.
- SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V. DE; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R. DE; SOUSA, F. C. F. **Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 22, n. 1, p. 193–207, 2012.
- SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais**. Semina: Ciências Agrárias, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SIMÕES, R. C.; ALMEIDA, S. S. M. DA S. **Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae)**. Biota Amazônia open journal system, v. 5, n. 1, p. 27–31, 2015.

SINGH, J. **Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal aromatic plants**. In: HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. ICS UNIDO, p. 67–82, 2008.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents**. American Journal of Enology and Viticulture, v. 16, p. 144–158, 1965.

SODEIFIAN, G.; SAJADIAN, S. A.; ARDESTANI, N. S. **Supercritical fluid extraction of omega-3 from *Dracocephalum kotschy* seed oil: Process optimization and oil properties**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 119, p. 139–149, jan. 2017.

SOLANA, M.; RIZZA, C. S.; BERTUCCO, A. **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, ago. 2014.

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

SOUSA, E. DE; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; BARRETO SILVA, F. R. M. **Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves**. Journal of Natural Products, v. 67, n. 5, p. 829–832, 2004.

SOUZA, A. R. C.; GUEDES, A. R.; RODRIGUEZ, J. M. F.; BOMBARDELLI, M. C. M.; CORAZZA, M. L. **Extraction of *Arctium Lappa* leaves using supercritical CO<sub>2</sub> + ethanol: Kinetics, chemical composition, and bioactivity assessments**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 140, n. June, p. 137–146, 2018.

SOUZA, B. V. C. DE; MOREIRA ARAÚJO, R. S. DOS R.; SILVA, O. A.; FAUSTINO, L. C.; GONÇALVES, M. F. B.; SANTOS, M. L. DOS; SOUZA, G. R.; ROCHA, L. M.; CARDOSO, M. L. S.; NUNES, L. C. C. ***Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review**. Expert Opinion on Therapeutic Patents Taylor & Francis, , 2018.

SOUZA, C. R. F.; BOTT, R. F.; OLIVEIRA, W. P. **Optimization of the Extraction of Flavonoids Compounds from Herbal Material using Experimental Design and Multi-response Analysis**. Latin American Journal of Pharmacy, v. 26, n. 5, p. 682–690, 2007.

SOUZA, C. R. F. DE. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2003.

SOUZA, F. B.; SOUZA, M. M. F. DE; DAMASCENO, P. V. D.; BARROS, M. C. G. DE; LOIOLA, C. O. L.; MONTEIRO, A. DE S.; CORRÊA, G. F. F. **Avaliação in vitro das atividades antimicrobianas de extratos etanólicos de *Arnica montana* L., *Bauhinia forficata* e *Plantago major* sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis***. Journal of Applied Pharmaceutical Sciences, n. 2, p. 18–28, 2014.

SOVOVÁ, H. **Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> - I. Modelling of extraction curves**. Chemical Engineering Science, v. 49, n. 3, p. 409–

414, 1994.

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. 7–16, 2009.

SUKMASARI, S.; MOHD, F. N.; DOOLAANEA, A. A.; QADER, O. A. J. A.; RAHMAN, M. N. A. **Total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant capacity of *Syzygium cumini* (L.) skeels leaves grown in wonosobo, java, Indonesia and comparison against current findings of *Syzygium cumini* leaves and *Syzygium polyanthum* (wight) walp leaves.** Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 10, n. 1, p. 31–35, 2018.

TEIXEIRA, G. L.; GHAZANI, S. M.; CORAZZA, M. L.; MARANGONI, A. G.; RIBANI, R. H. **Assessment of subcritical propane, supercritical CO<sub>2</sub> and Soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts.** Journal of Supercritical Fluids, v. 133, n. September 2017, p. 122–132, 2018.

TIVERON, A. P.; MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; ALENCAR, S. M. **Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition.** International Journal of Molecular Sciences, v. 13, n. 7, p. 8943–8957, 2012.

TIWARI, H. C.; SINGH, P.; MISHRA, P. K.; SRIVASTAVA, P. **Evaluation of various techniques for extraction of natural colorants from pomegranate rind-Ultrasound and enzyme assisted extraction.** Indian Journal of Fibre and Textile Research, v. 35, n. 3, p. 272–276, 2010.

TOMŠIK, A.; PAVLIC, B.; VLADIC, J.; RAMIC, M.; BRINDZA, J.; VIDOVIC, S. **Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.).** Ultrasonics Sonochemistry, v. 29, p. 502–511, 2016.

TRENTINI, C. P.; SILVA, S. B. DA; RODRIGUES, G. M.; GARCIA, V. A. DOS S.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, C. DA. **Pressurized Liquid Extraction of Macauba Pulp Oil †.** The Canadian Journal of Chemical Engineering, v. 95, n. 8, p. 1579–1584, 2017.

VAZ, A. M. S. F. **Bauhinia.** In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22811>), 2013.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. **Sinopse de Bauhinia sect . Pauletia ( Cav .) DC . ( Leguminosae : Caesalpinioideae : Cercideae ) no Brasil 1.** Revista Brasileira de Botânica, v. 28, n. 3, p. 477–491, 2005.

VAZQUEZ-ROIG, P.; PICÓ, Y. **Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples.** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 71, p. 55–64, 2015.

VICENTE, O.; BOSCAIU, M. **Flavonoids: Antioxidant compounds for plant defence... and for a healthy human diet.** Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, v. 46, n. 1, p. 14–21, 2018.

VIGANÓ, J.; BRUMER, I. Z.; BRAGA, P. A. DE C.; SILVA, J. K. DA; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; REYES REYES, F. G.; MARTÍNEZ, J. **Pressurized liquids extraction as an alternative process to readily obtain bioactive compounds from passion fruit rinds.** Food and Bioproducts Processing, v. 100, p. 382–390, 2016.

VIGANÓ, J.; ZABOT, G. L.; MARTÍNEZ, J. **Supercritical fluid and pressurized liquid extractions of phytonutrients from passion fruit by-products: Economic evaluation of sequential multi-stage and single-stage processes.** Journal of Supercritical Fluids, v. 122, n. December, p. 88–98, 2017.

WANG, L.; WELLER, C. L. **Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants.** Trends in Food Science and Technology, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

YANG, Y. C.; WEI, M. C. **Ethanol solution-modified supercritical carbon dioxide extraction of triterpenic acids from *Hedyotis corymbosa* with ultrasound assistance and determination of their solubilities.** Separation and Purification Technology, v. 150, p. 204–214, 2015.

ZHANG, Y.; LI, S. FEN; WU, X. WEN. **Pressurized liquid extraction of flavonoids from *Houttuynia cordata* Thunb.** Separation and Purification Technology, v. 58, n. 3, p. 305–310, 2008.

ZHAO, S.; BAIK, O.-D.; CHOI, Y. J.; KIM, S.-M. **Pretreatments for the Efficient Extraction of Bioactive Compounds from Plant-Based Biomaterials.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 54, n. 10, p. 1283–1297, 2014.

## 9. ANEXO - Artigos Publicados em Periódicos

PALSIKOWSKI, P. A.; BESEN, L.M.; SANTOS, K.A.; SILVA, C.; SILVA, E.A. **Supercritical CO<sub>2</sub> oil extraction from *Bauhinia forficata* link subsp. *pruinosa* leaves: Composition, antioxidant activity and mathematical modeling.** The Journal of Supercritical Fluids, v.153,104588, 2019.

PALSIKOWSKI, P. A.; BESEN, L.M.; KLEIN, E.J.; SILVA, C.; SILVA, E.A. **Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *B. forficata* subsp. *pruinosa*.** The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2020.