

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

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FOLHAS DE ESPINHEIRA  
SANTA (*Monteverdia aquifolia*) VIA TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA  
UTILIZANDO COSSOLVENTES E EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

TALES PRADO ALVES

**TOLEDO – PR  
Setembro de 2021**

**TALES PRADO ALVES**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FOLHAS DE ESPINHEIRA  
SANTA (*Monteverdia aquifolia*) VIA TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA  
UTILIZANDO COSSOLVENTES E EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

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

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia R. Fagundes Klen

**Co-orientador:** Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

**TOLEDO – PR  
Setembro de 2021**

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

Alves, Tales Prado

Extração de compostos bioativos das folhas de espinheira santa (Monteverdia aquifolia) via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom / Tales Prado Alves; orientadora Márcia Regina Fagundes-Klen; coorientadora Edson Antônio da Silva. -- Toledo, 2021.

127 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2021.

1. Engenharia química. 2. Monteverdia aquifolia. 3. Extração de avançada de compostos bioativos. 4. Conteúdo fenólico e atividade antioxidante. I. Fagundes-Klen, Márcia Regina, orient. II. da Silva, Edson Antônio, coorient. III. 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 Tales Prado Alves à  
Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em  
10 de setembro de 2021

**COMISSÃO JULGADORA**



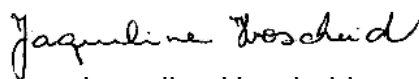
Marcia Regina Fagundes-Klen  
Orientador(a)



Carlos Eduardo Borba  
Membro interno



Kátia Andressa Santos  
Membro interno



Jaqueline Hoscheid  
Membro externo



Aline Raquel Muller Tones  
Membro externo

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me proporcionou força para perseverar, e quem deposito toda minha fé, agradeço todas as situações que me fizeram chegar a esse momento.

A Professora, Márcia R. Fagundes Klen pela supervisão, pela confiança até quando eu não mais a tinha e principalmente pelos conselhos, apoio, compreensão e paciência.

Ao Professor, Edson Antonio da Silva pela co-orientação, sempre disposto a ajudar, solucionando muitas dúvidas durante todas as atividades e trabalhos desenvolvidos.

A minha amiga Carina Contine Triques pelo empenho e comprometimento em me ajudar, te desejo um futuro brilhante.

Aos meus pais, pela compreensão da minha ausência, pelo amor e incentivo na continuação dos meus estudos.

A minha esposa, Daiane Dourado pelo amor, companheirismo, apoio e paciência nessa jornada, sendo ela o principal pilar de nossa casa e zelando pelo bem estar de nossas filhas, Valentina e Laura.

A todos os professores que me ajudaram desde a graduação até este momento, muitos tenho como exemplos de profissionais, os quais me proporcionaram uma nova perspectiva de futuro.

Aos colegas que fiz na UNIOESTE nessa etapa, me ajudaram e contribuíram diretamente para que esse desafio se concretiza, em especial a Paula Alessandra Palsikowski, Kátia Andressa Santos e Elissandro Klein.

Ao Capes pelo suporte financeiro.

A Unioeste (Toledo), em sua totalidade professores, funcionários e colegas pela vivência, contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

Por fim, a todos que estimularam, por meio de pensamentos, atos e/ou palavras à concretização deste trabalho.

Os rios não bebem sua própria água,  
as árvores não comem seus próprios frutos.  
O sol não brilha pra si mesmo,  
e as flores não espalham sua fragrância para si.  
Viver para os outros é uma regra da natureza.  
A vida é boa quando você faz alguém feliz,  
mas a vida é melhor ainda,  
quando os outros são felizes por sua causa.

Sumo Pontífice Francisco

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
ABSTRACT .....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral .....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
3.1 Espinheira santa ( <i>Monteverdia aquifolia</i> ) .....	21
3.1.1 Constituintes químicos.....	23
3.1.2 Componentes químicos e propriedades terapêuticas.....	28
3.2 Métodos de extração.....	30
3.2.1 Extração convencional.....	31
3.2.2 Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico.....	33
3.2.3 Extração supercrítica com cossolventes.....	36
3.2.4 Curvas de extração.....	38
3.2.5 Modelagem matemática SFE .....	40
3.2.6 Extração com líquido pressurizado (PLE).....	46
3.2.7 Extração com solvente assistida por ultrassom (UAE) .....	47
3.3 Considerações Parciais.....	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	52
4.1 Origem e preparo das folhas de <i>M. aquifolia</i> .....	52
4.1.1 Determinação do teor de umidade.....	52
4.1.2 Análise granulometria .....	53
4.1.3 Densidade real das folhas .....	53
4.2 Extração .....	53
4.2.1 Extração convencional – Soxhlet (SOX).....	53
4.2.2 Extração com solventes pressurizados (PLE) .....	54
4.2.3 Extração assistida por ultrassom (UAE) .....	55
4.2.4 Extração com fluido supercrítico (SFE) .....	56
Módulo de extração .....	56

Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico.....	57
Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico e cossolventes .....	58
Solubilidade do extrato no solvente supercrítico .....	59
Densidade do leite ( $\rho_a$ ).....	60
Porosidade do leite ( $\varepsilon$ ).....	60
Modelagem matemática da cinética de extração com CO <sub>2</sub> supercrítico ....	60
4.3 Caracterização dos extratos.....	61
4.3.1 Composição química .....	61
4.3.2 Conteúdo fenólico total (CFT).....	62
4.3.3 Atividade antioxidante.....	62
Método de eliminação do radical DPPH .....	62
Método de redução do ferro (FRAP) .....	63
4.4 Análise estatística .....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
5.1 Caracterização das folhas de <i>M. aquifolia</i> e leite de extração .....	64
5.2 Obtenção dos extratos .....	65
5.2.1 Extração SOX e PLE .....	65
5.2.2 Extração assistida por ultrassom (UAE) .....	69
5.2.3 Estimativa de CFT, AA <sub>DPPH</sub> e AA <sub>FRAP</sub> para as extrações SOX e PLE	74
5.2.4 Estimativa do CFT, AA <sub>DPPH</sub> e AA <sub>FRAP</sub> para as UAE .....	76
5.2.5 Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico.....	82
Tempo de extração estática .....	82
Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico .....	83
Extração com CO <sub>2</sub> e cossolventes .....	88
Curvas cinéticas de extração com CO <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> +cossolvente .....	90
Modelagem das curvas cinéticas de extração .....	94
5.2.6 CFT, AA <sub>DPPH</sub> e AA <sub>FRAP</sub> para as SFE-CO <sub>2</sub> e cossolventes.....	100
5.3 Composição química dos extratos SOX, PLE, UAE e SFE .....	103
5.4 Comparação entre os métodos de extração .....	106
6 CONCLUSÕES.....	108
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	110
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111
ANEXOS – ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS .....	127



## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1- Espinheira santa ( <i>Monteverdia aquifolia</i> ). Fonte: Autor. ....	22
Figura 3.2 - Estrutura básica de flavonoides e diferentes classes baseadas nela. Fonte (adaptado): Raffa et al. (2017). ....	24
Figura 3.3 - Estruturas modelo de (A) taninos hidrolisáveis e (B) taninos condensados. Fonte (adaptado): Huang et al. (2018). ....	25
Figura 3.4 - Classificações químicas e estruturas centrais dos triterpenoides tetracíclicos e pentacíclicos. Fonte (adaptado): YAN et al. (2014). ....	26
Figura 3.5 - Extrator Soxhlet convencional. Fonte (Adaptado): ZYGLER et al. (2012). ....	32
Figura 3.6 - Diagrama de fase esquemático mostrando os três estados da matéria: sólido, líquido e gás, bem como o estado do fluido supercrítico. Fonte (Adaptado): ERKEY, 2011. ....	34
Figura 3.7 - Períodos característicos de extração. Fonte (Adaptado): Reis et al. (2016). ....	39
Figura 3.8 - Sistema representativo do Leito de extração supercrítico, H corresponde a altura do leito e h distância axial ao longo do leito. Fonte: Autor... ..	42
Figura 3.9 - Formação e colapso das bolhas de cavitação. Fonte: Autor.....	49
Figura 4.1 - Diagrama do processo de extração com fluido supercrítico, com os seus principais componentes: 1 – cilindro de CO <sub>2</sub> ; 2 – banho termostático; 3 – módulo Spe-ed SFE Basic (Booster); 4 – compressor; 5 – vaso de extração; 6 – frasco vial; 7 – bomba de cossolvente; 8 – frasco de cossolvente; F – filtro; M – manômetros; V – válvulas; VM – válvula micrométrica; RT – rotâmetro e TV– totalizador de vazão. ....	57
Figura 5.1. Rendimento em extratos brutos de folhas de <i>M. aquifolia</i> obtidos pelos métodos Soxhlet (SOX – 360 min) e líquido pressurizado (PLE – 30 min). As barras de erro representam o desvio padrão para os tratamentos.....	66
Figura 5.2. Perfil cinético para o rendimento em extrato bruto das folhas de <i>M. aquifolia</i> obtidas com EtOH pressurizado a 40(■), 50 (●) e 60 °C (▲). As barras de erro representam o desvio padrão para as réplicas. ....	68
Figura 5.3. Perfil cinético para o rendimento em extrato bruto das folhas de <i>M. aquifolia</i> obtidas com AcEt pressurizado a 40(■), 50 (●) e 60 °C (▲). As barras de erro representam o desvio padrão para as réplicas. ....	68
Figura 5.4. Perfil cinético para o rendimento em extrato bruto das folhas de <i>M. aquifolia</i> obtidas com n-hexano pressurizado a 40(■), 50 (●) e 60 °C (▲). As barras de erro representam o desvio padrão para as réplicas. ....	69
Figura 5.5. Gráfico de Pareto evidenciando os efeitos mais pronunciados das variáveis temperatura (X <sub>1</sub> ), amplitude (X <sub>2</sub> ) e razão solvente/folha (X <sub>3</sub> ) sobre rendimento em extrato nas UAE. ....	71

Figura 5.6. Superfícies de resposta para o rendimento em extrato de <i>M. aquifolia</i> . Efeitos correlativos de (a) amplitude e temperatura; (b) razão solvente/folha e amplitude; e (c) razão solvente/folha e temperatura. ....	73
Figura 5.7. Superfície de resposta para CFT (a - c), AA <sub>DPPH</sub> (d - f) e AA <sub>FRAP</sub> (g - i). Efeitos correlativos da amplitude e temperatura (a, d, g); efeitos correlativos da razão solvente/folhas e temperatura do solvente (b, e, h) e os efeitos correlativos da razão solvente/folhas e amplitude (c, f, i). ....	79
Figura 5.8. Perfis para valores preditos e a desejabilidade global em função das variáveis independentes na extração assistida por ultrassom.....	81
Figura 5.9. Curvas cinéticas de extração com CO <sub>2</sub> supercrítico para diferentes tempos de extração estática de 5, 30, 60 e 90 min. ....	83
Figura 5.10. Gráfico de Pareto demonstrando os efeitos das variáveis independente no rendimento da SFE: temperatura (X <sub>1</sub> ), pressão (X <sub>2</sub> ) e vazão (X <sub>3</sub> ), onde (L) e (Q)– são referentes aos termos linear e quadrático do modelo.....	86
Figura 5.11. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos (a) e Gráfico dos resíduos versus valores preditos (b). ....	86
Figura 5.12. Superfícies de resposta para o rendimento em extrato das folhas de <i>M. aquifolia</i> . Efeitos correlativos de vazão e pressão (a), pressão e temperatura (b) e vazão e temperatura (c). ....	88
Figura 5.13. Cinética experimental para extração de folhas de <i>M. aquifolia</i> com CO <sub>2</sub> supercrítico (condições experimentais Tabela 5.7). ....	91
Figura 5.14. Cinética experimental para extração de folhas de <i>M. aquifolia</i> com CO <sub>2</sub> supercrítico e o cossolvente EtOH. ....	92
Figura 5.15. Cinética experimental para extração de folhas de <i>M. aquifolia</i> com CO <sub>2</sub> supercrítico e o cossolvente AcEt. ....	93
Figura 5.16. Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de <i>M. aquifolia</i> via extração supercrítica com CO <sub>2</sub> puro: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová.....	97
Figura 5.17. Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de <i>M. aquifolia</i> via extração supercrítica com CO <sub>2</sub> puro: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová.....	98
Figura 5.18. Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de <i>M. aquifolia</i> via extração supercrítica com CO <sub>2</sub> puro: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová.....	98
Figura 5.19. Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de <i>M. aquifolia</i> via extração supercrítica com CO <sub>2</sub> +EtOH: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová. ....	99
Figura 5.20. Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de <i>M. aquifolia</i> via extração supercrítica com CO <sub>2</sub> +AcEt: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová. ....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Compostos químicos encontrados na <i>M. aquifolia</i> .....	27
Tabela 3.2. Propriedades críticas de algumas substâncias utilizadas em SFEs. .	35
Tabela 4.1. Valores independentes e os níveis adotados para o planejamento Box-Behnken nas extrações assistidas por ultrassom.....	55
Tabela 4.2. Valores das variáveis independentes e os níveis adotados para o planejamento Box-Behnken nas extrações supercríticas com CO <sub>2</sub> . ....	58
Tabela 5.1. Dados da caracterização da matéria-prima e leito de partículas. ....	64
Tabela 5.2. Matriz do planejamento Box-Behnken e rendimentos em extrato (% em peso) das folhas de <i>M. aquifolia</i> obtidas nas UAE. ....	69
Tabela 5.3. ANOVA para o ajuste aos dados experimentais das UAE. ....	72
Tabela 5.4. CFT e AA <sub>DPPH</sub> e AA <sub>FRAP</sub> para os extratos das folhas de <i>M. aquifolia</i> obtidos pelos métodos SOX e PLE com diferentes solventes.....	75
Tabela 5.5. CFT e AA <sub>DPPH</sub> e AA <sub>FRAP</sub> dos extratos das folhas de <i>M. aquifolia</i> obtidos nas UAE utilizando EtOH como solvente. ....	77
Tabela 5.6. Valor estatístico F e <i>p</i> -valor para as respostas TPC, AA <sub>DPPH</sub> e AA <sub>FRAP</sub> para os extratos de <i>M. aquifolia</i> , obtidos pela técnica dos UAE com etanol. ....	78
Tabela 5.7. Condições experimentais e rendimentos das SFE em extrato das folhas de <i>M. aquifolia</i> empregando CO <sub>2</sub> . ....	84
Tabela 5.8. ANOVA para o ajuste aos dados experimentais das SFE com CO <sub>2</sub> . 85	
Tabela 5.9. Condições experimentais e rendimentos das SFE com cossolventes. ....	89
Tabela 5.10. Parâmetros ajustados para o modelo de Sovová (1994), para as extrações supercríticas com CO <sub>2</sub> e cossolventes. ....	95
Tabela 5.11. CFT e AA <sub>DPPH</sub> e AA <sub>FRAP</sub> dos extratos obtidos nas SFE com CO <sub>2</sub> puro. ....	101
Tabela 5.12. CFT e AA <sub>DPPH</sub> e AA <sub>FRAP</sub> dos extratos obtidos nas SFE com cossolventes.....	101
Tabela 5.13. Composição química dos extratos SOX, PLE e UAE. ....	104
Tabela 5.14. Concentração de friedelina e $\alpha$ -tocoferol nos extratos SOX, PLE e UAE. ....	105
Tabela 5.15. Maiores valores de rendimento, CFT e atividade antioxidantes das extrações investigadas. ....	106

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS E NOMENCLATURAS

AA – Atividade antioxidante

AA<sub>DPPH</sub> – Método antioxidante 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

AA<sub>FRAP</sub> – Método antioxidante redutor de Fe<sup>2+</sup>

CER – Período de taxa constante de extração

CFT – Conteúdo fenólico total

CG-MS – Cromatografia gasosa-espectrometria de massa

C<sub>p</sub> – Capacidade calorífica específica do solvente (J·g<sup>-1</sup>·°C<sup>-1</sup>)

DC – Período de difusão intrapartícula

d<sub>p</sub> – Diâmetro médio das partículas (mm)

FER – Período de taxa decrescente de extração

EAG – Equivalente de ácido gálico

H – Altura do leito

h – Coordenada na direção axial do leito

J (X, Y) – Taxa de transferência de massa na interface sólido-fluido (g·cm<sup>-3</sup>·s<sup>-1</sup>)

K<sub>fa</sub> – Coeficiente de transferência de massa no filme externo (min<sup>-1</sup>)

K<sub>sa</sub> – Coeficiente de transferência de massa no sólido (min<sup>-1</sup>)

m<sub>ext</sub> – Massa de extrato (g)

$\dot{m}_F$  – Vazão mássica de solvente (g min<sup>-1</sup>)

m<sub>s</sub> – Massa de sólido inerte (g)

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

P – Potência do ultrassom (W)

P<sub>C</sub> – Pressão crítica

PLE – Extração com líquido pressurizado

r<sub>k</sub> – Fração de soluto de difícil acesso (g.g<sup>-1</sup>)

SFE – Extração com fluido supercrítico

SOX – Extração Soxhlet

T – Temperatura (°C)

t – Tempo (s)

T<sub>C</sub> – Temperatura crítica

t<sub>CER</sub> – Tempo do período CER (min)

TEQ – Equivalentes a micromoles de Trolox

$t_{FER}$  – Tempo do período FER (min)

$u$  – Velocidade superficial do fluido ( $\text{cm s}^{-1}$ )

UAE – Extração assistida por ultrassom

$V_{Leito}$  – Volumeo de vaso de extração ( $\text{cm}^{-3}$ )

$W$  – Parâmetro adimensional relacionado à transferência de massa no interior do sólido

$X_K$  – Razão mássica do soluto de difícil acesso ( $\text{g g}^{-1}$ )

$X_O$  – Concentração inicial de soluto no sólido ( $\text{g g}^{-1}$ )

$X_P$  – Razão mássica do soluto de fácil acesso ( $\text{g g}^{-1}$ )

$Y_S$  – Solubilidade do soluto no solvente ( $\text{g g}^{-1}$ )

$Z$  – Parâmetro adimensional relacionado à transferência de massa – fase fluida

$\varepsilon$  – Porosidade do leito

$\rho_a$  – Densidade aparente ( $\text{g cm}^{-3}$ )

$\rho_F$  – Densidade do fluido ( $\text{g cm}^{-3}$ )

$\rho_r$  – Densidade real ( $\text{g cm}^{-3}$ )

$\rho_S$  - Densidade do sólido ( $\text{g cm}^{-3}$ )

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FOLHAS DE ESPINHEIRA SANTA (*Monteverdia aquifolia*) VIA TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA UTILIZANDO COSSOLVENTES E EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

**DOUTORANDO: TALES PRADO ALVES**

**ORIENTADOR: PROF. DRa. MARCIA R. FAGUNDES-KLEN**

**RESUMO**

A espinheira santa (*Monteverdia aquifolia*) é uma planta medicinal, nativa da América do Sul, seus extratos apresentam em sua composição substâncias bioativas, coadjuvantes no tratamento de diversas moléstias. Geralmente, os métodos convencionais são aplicados para obtenção de seus extratos, os quais muitas vezes são onerosos e deletérios aos compostos bioativos. Dentro deste contexto, o presente projeto de pesquisa visa investigar os diferentes métodos de obtenção dos extratos das folhas de *M. aquifolia*, via extração Soxhlet, líquido pressurizado, assistido por ultrassom, supercrítica com CO<sub>2</sub> e supercríticas com cossolventes, examinando o rendimento e a qualidade dos extratos obtidos, quanto ao teor de fenólicos, atividade antioxidante e composição química. As extrações com líquido pressurizado (30 min e 100 bar) e Soxhlet (360 min) foram realizadas nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e nas temperaturas de ebulição dos solventes etanol, acetato de etila e n-hexano, respectivamente. Nas extrações com os solventes pressurizado os maiores rendimentos foram 5,29%, 3,13% e 2,05% com etanol, acetato de etila e n-hexano, nesta ordem, obtidos a 60 °C. A técnica convencional Soxhlet foi efetiva quando realizada com etanol, alcançando um rendimento de 8,30% em peso. Essas técnicas demonstraram a afinidade dos compostos das folhas por solventes polares e o aprimoramento da extração com a elevação da temperatura. A partir desses resultados, o etanol foi selecionado para seguir com as extrações assistidas por ultrassom, na qual, um planejamento *Box-Behnken* foi empregado para investigar as variáveis temperaturas (40, 50 e 60 °C), amplitude de sonicação (20, 50 e 80%) e razão solvente/ folha (10, 15 e 20 mL g<sup>-1</sup>) por um tempo total de 30 min. A combinação entre os parâmetros adotados (50 °C, 80% de amplitude e 20 mL g<sup>-1</sup> razão solvente/folha) resultou em um rendimento máximo de 6,57% em peso, obtido em um tempo, temperatura e volume de solvente

reduzidos, quando comparados as técnicas Soxhlet e com os solventes pressurizados. As extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico as variáveis investigadas foram pressão (200, 250 e 300 bar), temperatura (40, 50 e 60 °C) e vazão (2, 4 e 6 mL min<sup>-1</sup>), seguindo um planejamento Box-Behnken, em um tempo total de 100 min. O maior rendimento de 1,13% obtidos em extrato foi na condição de 50 °C, 300 bar e 6 mL min<sup>-1</sup>. Nessa condição, os efeitos da adição 1, 3 e 5% V V<sup>-1</sup> dos cossolventes etanol e acetato de etila foram examinados, alcançando os maiores rendimentos na concentração de 5% de 1,13% e 1,06% em peso, respectivamente, não superando o maior rendimento obtido com CO<sub>2</sub> puro. O ajuste do modelo de Sovová as curvas cinéticas de extração supercrítica mostraram um alto grau de acurácia. A estimativa do conteúdo fenólico total foi maior nos extratos etanólicos nas extrações assistida por ultrassom (402,33 mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>), seguida da extração pressurizada (325 mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>), Soxhlet (237,40 mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>) e SFE (18,21 mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>). A maior atividade antioxidante determinada pelo método DPPH foi observado no extrato etanólico obtido na extração com o solvente pressurizado (1014,01 µmol TEQ g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>) e pelo método FRAP no extrato etanólicos obtido na extração assistida por ultrassom (4237,60 µmol Fe<sup>2+</sup> g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>). A caracterização da composição química realizada, revelou a presença de compostos de grande interesse, sendo os majoritários esqualeno, vitamina E, friedelina e friedelanol. A quantificação de vitamina E e friedelina foi maior nos extratos obtidos nas PLE com AcEt. De modo geral, os métodos não convencionais foram superiores em relação ao método convencional, apresentando uma composição química, conteúdo fenólico e atividade antioxidantes aprimoradas.

**Palavras-chave:** *Monteverdia aquifolia*, extração convencional, extração supercrítica, extração supercrítica cossolventes, extração com líquido pressurizado, extração assistida por ultrassom, rendimento, compostos bioativos, conteúdo fenólico, atividade antioxidante, composição química.

# EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ESPINEHIRA SANTA LEAVES (MONTEVERDIA AQUIFOLIA) BY SUPERCRITICAL TECHNOLOGY USING CO-SOLVENTS AND ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION

**AUTHOR: TALES PRADO ALVES**

**SUPERVISOR: PROF. DRa. MARCIA R. FAGUNDES KLEN**

## ABSTRACT

Espinheira santa (*Monteverdia aquifolia*) is a medicinal plant, native from South America, and its extracts present in their composition bioactive substances, coadjuvants in the treatment of various diseases. Usually, conventional methods are applied to obtain its extracts, which most of the time are expensive and deleterious to the bioactive compounds. In this context, the present research project aims at investigating different methods of obtention of the *M. aquifolia* leaves extract through Soxhlet (SOX), pressurized-liquid (PLE), ultrasound-assisted (UAE), supercritical CO<sub>2</sub> (SFE), and SFE with cosolvents extractions, evaluating the yield and the quality of the extracts obtained, regarding their chemical composition, total phenolics content (TPC), and antioxidant activity. The PLE (30 min and 100 bar) and SOX (360 min) were performed at temperatures 40, 50, and 60 °C and in the boiling temperatures of the solvent's ethanol, ethyl acetate, and n-hexane, respectively. In the PLE, the highest yields were 5.29%, 3.13%, and 2.05% with ethanol, ethyl acetate, and n-hexane, respectively, obtained at 60 °C. SOX conventional technique was effective when performed with ethanol, reaching a yield of 8.30% in weight. These techniques evidenced the affinity of the compounds by polar solvents and improvement of the yields with temperature increase. From these data, ethanol was selected to continue with UAE, in which a Box-Behnken experimental design was used to investigate the variables temperature (40, 50, and 60 °C), sonication amplitude (20, 50, and 80%), and solvent/leaf ratio (10, 15, and 20 mL g<sup>-1</sup>) for a total period of 30 min. The combination of the adopted parameters (50 °C, amplitude 80%, and solvent/leaf ratio 20 mL g<sup>-1</sup>) resulted in a maximum yield of 6.57% in weight, obtained at a reduced time, temperature, and solvent volume when compared to SOX and PLE techniques. In the SFE-CO<sub>2</sub>, the variables investigated were pressure (200, 250, and 300 bar), temperature (40, 50, and 60



°C), and flow (2, 4, and 6 mL min<sup>-1</sup>), following a experimental design in a total time of 100 min. The highest yield of extract was 1.13%, obtained in the condition 50 °C, 300 bar, and 6 mL min<sup>-1</sup>. In this condition, the effects of the addition of 1, 3, and 5% V V<sup>-1</sup> of the cosolvents ethanol and ethyl acetate were investigated, reaching the highest yields 1.13% and 1.06% in weight, respectively, in the concentration 5%, but not higher than the highest yield obtained with pure CO<sub>2</sub>. The adjustments of the Sovová model to the kinetics curves of SFE showed a high level of accuracy. The TPC estimate was higher in the ethanolic extracts in UAE (402.33 mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>), followed by PLE (325 mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>), SOX (237.40 mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>), and SFE (18.21 mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>). The highest antioxidant activity determined by the DPPH method was observed in the ethanolic extract obtained in the PLE (1014.01 μmol TEQ g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>) and by the FRAP method the ethanol extract obtained by UAE (4237.60 μmol Fe<sup>2+</sup> g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>). The characterization of the chemical composition revealed the presence of compounds of great interest, being the majority squalene, vitamin E, friedelin, and friedelanol. The quantification of vitamin E and friedelin was higher in the extracts obtained in the PLE with ethyl acetate. Generally, the unconventional methods were superior to the conventional method, presenting improved chemical composition, TPC, and antioxidant activities.

**Keywords:** *Monteverdia aquifolia*, conventional extraction, supercritical extraction, supercritical extraction with cosolvents, pressurized-liquid extraction, ultrasound-assisted extraction, yield, bioactive compounds, phenolic content, antioxidant activity, chemical composition.

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de produtos naturais, vêm gradativamente ganhando espaço nas prateleiras e no cotidiano doméstico, em virtude da tendência mundial por hábitos mais saudáveis e sustentabilidade ambiental, questões determinantes que definem os parâmetros de consumo no século 21, corroborado pelos notórios efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos (MOSCATO & MACHIN; 2018). As plantas medicinais e seus derivados ocupam um lugar de destaque na medicina popular brasileira, com amplas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e de aromas (MUHAMMAD *et al.*, 2020; SREEN *et al.*, 2021). No Brasil, o Estado do Paraná é destaque pela tradição no cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares, concentrando aproximadamente 90% da produção nacional, que movimentou em 2014 mais de R\$ 78 milhões com uma produção de 27,4 mil toneladas (EMATER, 2015).

*Monteverdia aquifolia* (Mart.) Biral, anteriormente conhecida pelo nome científico *Maytenus aquifolia* (Mart.), e sob o vernáculo “espinheira santa”, é uma planta medicinal perene de porte médio arbóreo da família Celastraceae, nativa da América do Sul, encontrada principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (LORENZI & MATOS, 2002; BIRAL *et al.*, 2017).

Dentre as espécies de espinheira santa a *M. aquifolia*, assim como a *M. ilicifolia*, são as mais disseminadas e exploradas economicamente, devido a sua aplicabilidade na medicina popular e na elaboração de formulações para fins terapêuticos, com efeitos farmacológicos comprovados (MINOZZO *et al.*, 2012; MMA, 2011; ANVISA, 2016;). Seus inúmeros efeitos benéficos contribuem para sua popularidade como um “santo remédio”, na linguagem popular. A mesma, é indicada para vários distúrbios estomacais como dores, azia, úlceras gástricas e pépticas, podendo ser utilizada com total segurança como coadjuvante destes tratamentos. A capacidade para tratar tantos distúrbios está associada às atividades antiulcerogênica, ação anti-inflamatória, ação analgésica, ação cicatrizante e antiespasmódico (GONZALEZ *et al.*, 2001; JORGE *et al.*, 2004; MOSSI *et al.*, 2009; CALOU *et al.*, 2014).

A principal forma de utilização ou consumo da espinheira santa acontece através de chás, infusão das folhas ou diretamente sobre a pele, como cicatrizante.

Entretanto, já são disponibilizados no mercado produtos à base de espinheira santa em forma de tinturas e cápsulas. Suas preparações geralmente são obtidas a partir das folhas, cascas e raízes. Esses elementos contêm diversos compostos como flavonoides, taninos e triterpenos, que atualmente são de grande interesse por parte das indústrias farmacêuticas (REIS & SILVA, 2004; HAIDA *et al.*, 2012; SÁ *et al.*, 2017). O potencial terapêutico da espinheira santa e das demais plantas medicinais está intimamente ligado a seus componentes bioativos, que têm como características a ação antioxidante, a capacidade de sequestrar radicais livres e de se complexar com proteína, polissacarídeos e íons metálicos (macromoléculas) (MOSSI *et al.*, 2009; BERNAL *et al.*, 2011; HOLNIK *et al.*, 2015).

Os extratos de *M. aquifolia* apresentam em sua composição substâncias de alto valor biológico, coadjuvantes no tratamento de diversas moléstias que acometem o ser humano. Geralmente, esses compostos são extraídos da matriz vegetal por técnicas convencionais, as quais muitas vezes são onerosas, inadequadas e deletérias aos compostos bioativos. Em resposta às deficiências das técnicas clássicas, novos métodos vêm sendo desenvolvidos e disseminados. A extração supercrítica (SFE - supercritical fluid extraction), a extração com solventes assistida por ultrassom (UAE - Ultrasound-assisted extraction), entre outras, visam contornar as adversidades, minimizando os efeitos negativos da temperatura e dos solventes orgânicos, contribuindo para melhorias dos produtos extraídos, estabilidade química, maior atividade biológica e rendimentos, através de extrações mais limpas e ambientalmente seguras (KHODDAMI *et al.*, 2013; HELENO *et al.*, 2016; DAS & EUN *et al.*, 2018; JIMÉNEZ *et al.*, 2018).

Dentro desse contexto, o presente projeto de pesquisa visou investigar os diferentes métodos de obtenção dos extratos das folhas de *M. aquifolia*: extração com fluido supercrítico, extração com solventes orgânicos assistidos por ultrassom, extração com fluidos pressurizado e extração convencional Soxhlet, avaliando as variações nos rendimentos e na qualidade dos extratos obtidos quanto ao conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e composição química. Assim, espera-se contribuir com o tema, bem como na disseminação das tecnologias, visando uma maior aplicabilidade na obtenção de extratos de *M. aquifolia*, que sejam seguros e com sua bioatividade preservada, favorecendo a incorporação dos seus compostos em novas formulações mais eficazes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar diferentes métodos de extração (extração com solvente pressurizado, extração assistida por ultrassom, extração supercrítica com ou sem adição de cossolventes e Soxhlet) na obtenção de extratos das folhas de espinheira santa (*Monteverdia aquifolia*). Além disso, avaliar o rendimento, qualidade e composição química volátil dos extratos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da temperatura na obtenção do extrato de *M. aquifolia* com os solventes etanol, acetato de etila e n-hexano pressurizado;
- Avaliar os efeitos das variáveis: temperatura, razão solvente/massa de folha e potência irradiação ultrassônica na extração assistida por ultrassom;
- Avaliar os efeitos da temperatura, pressão e vazão de solvente na extração supercrítica utilizando CO<sub>2</sub>;
- Avaliar o efeito da adição de cossolvente em modo dinâmico na extração supercrítica conduzida com CO<sub>2</sub>;
- Modelar matematicamente as curvas cinéticas das extrações supercríticas;
- Determinar o conteúdo fenólico total dos extratos;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos DPPH e FRAP;
- Caracterizar quimicamente a composição dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Quantificar os compostos  $\alpha$ -tocoferol, esqualeno e friedelina por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Comparar as variáveis respostas rendimento, teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e composição química dos extratos obtidos pelas técnicas não convencionas com a extração convencional Soxhlet.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil possui uma flora rica, composta por mais de 45 mil espécies de plantas, que correspondem a aproximadamente 22% do total mundial. Estima-se que 25% de todos os medicamentos modernos são derivados de forma direta ou indireta de plantas medicinais. Os produtos naturais possuem inúmeros ingredientes ativos, que contribuem para prevenção e tratamento de enfermidades. Sua utilização como remédio caseiro é uma prática muito comum pela população brasileira. O saber popular sobre as plantas medicinais tem o costume de ser repassado de geração em geração, variando com a cultura estabelecida em cada região. Esse saber quando associado a novas tecnologias tem apresentado resultados significativos que cooperam diretamente com a descoberta de novas substâncias bioativas, assim como o desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos (BRASIL, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2017).

#### 3.1 Espinheira santa (*Monteverdia aquifolia*)

*Monteverdia aquifolia* (Mart.) Biral é uma planta perene, arbórea pertencente à família das Celastraceae, conhecida popularmente como espinheira santa, mas que, de acordo com cada região em que se encontra, recebe diferentes nomenclaturas como erva cancerosa, salva-vidas e sombra de touro, denominações estas que estão associadas às suas propriedades medicinais e à presença de acúleos foliares, normalmente confundidos com espinhos. A espécie é nativa da América do Sul, encontrada principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, entre eles: Uruguai, Paraguai, norte e leste da Argentina, além de estar disseminada em todo território brasileiro, com presença marcante na região sul do Brasil (OKANO, 1992; CORDEIRO *et al.*, 1999; DI STASI & LIMA, 2002; LORENZI & MATOS, 2002; REIS & SILVA, 2004).

A *M. aquifolia* é um arbusto ou árvores de médio porte, possui de 1,5 a 13 metros de altura, apresenta ramos glabros, cilíndrico-achatados. Suas folhas são cartáceas, sua base é aguda ou obtusa, ápice agudo a obtuso e pecioladas com a presença de vários acúleos em suas bordas. Suas flores são numerosas e

agrupadas em pequenas inflorescências fasciculadas de cor amarelo-esverdeada e fruto do tipo cápsula orbiculares castanho-amarelado (FIGURA 3.1). Seu florescimento ocorre em meados de setembro a dezembro e frutificação em outubro a fevereiro (DI STASI & LIMA, 2002; OKANO, 1992; CALOU *et al.*, 2014).



**Figura 3.1-** Espinheira santa (*Monteverdia aquifolia*). Fonte: Autor.

Dentre as plantas medicinais brasileiras e entre as espécies de espinheira santa, a *M. ilicifolia* é uma das mais exploradas economicamente, devido ao seu “status”, que foi alvo dos principais estudos, entretanto, *M. aquifolia* em alguns relatos têm demonstrado ações farmacológicas semelhantes ou até mais eficazes (DI STASI, 2004; STEENBOCK & REIS, 2011; ANTUNES *et al.*, 2020). Estas espécies estão entre os poucos fitoterápicos que possuem efeitos farmacológicos de combate à gastrite e úlceras, comprovadas por pesquisas coordenadas pela Central de medicamentos (CEME) do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2016). Suas folhas possuem diversos componentes que conferem a elas atividades analgésicas, anti-inflamatória e antiulcerogênica. Essas características permitem sua utilização na medicina popular e na elaboração de formulações para fins terapêuticos, direcionada principalmente ao tratamento de distúrbios do trato digestivo, tornando-se uma das plantas medicinais mais utilizadas para essa finalidade (GONZALEZ *et al.*, 2001; CIPRIANI *et al.*, 2009; NIERO *et al.*, 2011; WONFOR *et al.*, 2017).

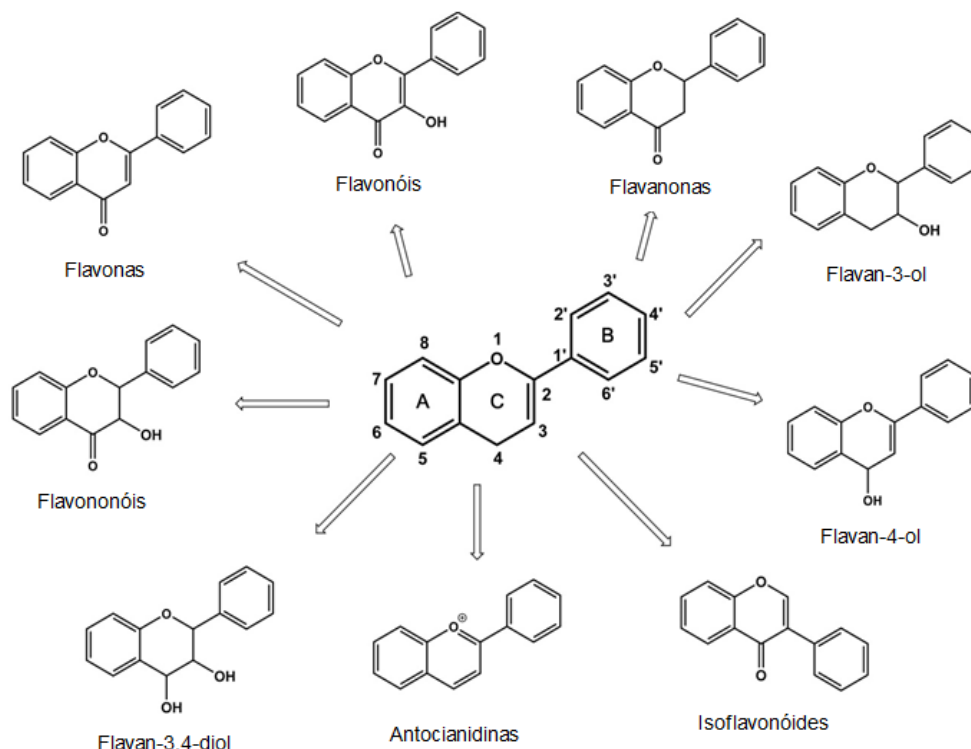
Estudos realizados anteriormente demonstraram que as substâncias da *M. aquifolia* possuem diversas atividades biológicas importantes, como analgésicos e antiulcerogênicos (FORMIGONI *et al.*, 1991; VILEGAS *et al.*, 1999; GONZALEZ *et al.*, 2001), atividade microbiana (PULLEN *et al.*, 2002; WEBER, 2013), anti-inflamatório (KIMURA *et al.*, 2000) e atividade antioxidante (CORSINO *et al.*, 2003; VELLOSA *et al.*, 2007; HAIDA *et al.*, 2012; CANSIAN *et al.*, 2015; CHIAPETTI *et al.*, 2019). A ampla gama de atividades biológicas das plantas e sua capacidade medicinal em reduzir o risco de doenças crônicas, assim como da *M. aquifolia*, estão associadas principalmente aos metabólitos secundários polifenóis, taninos e terpenoides (BERNAL *et al.*, 2011; HOLNIK *et al.*, 2015).

### 3.1.1 Constituintes químicos

A composição química das plantas e do gênero *Monteverdia* é proveniente dos metabolismos primário e secundário, responsáveis pela geração de uma infinidade de compostos químicos (metabólitos). O metabolismo primário dá origem aos aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos e carboidratos, responsáveis pela sobrevivência básica da planta, já o secundário é responsável pela adaptação da planta às condições ambientais, considerando os fatores bióticos e abióticos. Os metabólitos secundários são únicos para uma determinada espécie ou família, ou seja, não é universal. Entre os principais metabólitos presentes nas plantas têm-se os flavonoides, alcaloides, terpenoides, fenóis e taninos, compostos caracterizados por exibir diversas propriedades biológicas promissoras e com potencial terapêutico elevado. Com ênfase para as ações anti-inflamatórias e antitumorais (NETO & LOPES 2007; MACHADO *et al.*, 2008; MARTINS, 2012; PAZ *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2018).

Dentre os constituintes fenólicos naturais das plantas, os flavonoides são amplamente distribuídos nas folhas, frutos e raízes, sendo biossintetizados por uma via comum mista, que integra os precursores das vias Shikimato e acetato-malonato (KARAM *et al.*, 2013). As estruturas são formadas basicamente após a confluência das duas vias, originando uma estrutura básica com 15 átomos de carbono, que consiste em dois anéis aromáticos fenílicos (A e B) unidos por três átomos de carbono (4, 3 e 2), estruturas em comum, que se combinam com um

átomo de oxigênio formando um terceiro anel aromático heterocíclico 4H-pirano (C) (FIGURA 3.2) (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; GOMES *et al.*, 2008; RAFFA *et al.*, 2017).



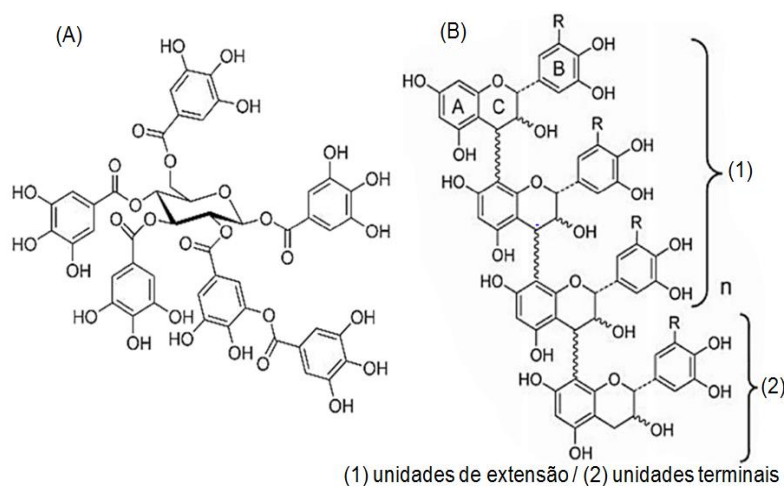
**Figura 3.2** - Estrutura básica de flavonoides e diferentes classes baseadas nela. Fonte (adaptado): Raffa *et al.* (2017).

A classificação fundamenta-se na estrutura química e suas conformações, estado de oxidação, presença de grupos funcionais e substituintes, responsáveis pelas diferentes classes de flavonoides (flavan-3-ol, flavan-4-ol, flavan-3,4-diol, flavonol, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas).

Os taninos também são compostos fenólicos e estão entre os metabólitos mais abundantes produzidos pelas plantas. São polifenóis com peso molecular relativamente alto e apresentam a capacidade de formar complexos insolúveis com alcaloides e proteínas. Nas plantas, eles desempenham o papel de proteção contra herbívoros, fungos e bactérias. Os taninos são classificados considerando-se a identidade do grupo fenólico precursor e a forma como se unem entre si, dando origem a dois grandes grupos, taninos hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são constituídos por um núcleo esterificado com ácidos fenólicos (ácido gálico), unidos uns aos outros por ligações de éster, que são facilmente



hidrolisáveis. Já os taninos condensados são polímeros ou oligômeros, que possuem precursores de unidades flavonóis (catequina, galocatequina, epigalocatequina e epicatequina), os mesmos são unidos por ligações carbono-carbono, mais estáveis e de difícil ruptura (FIGURA 3.3) (MADHAN *et al.*, 2005; BAGGIO *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2018).

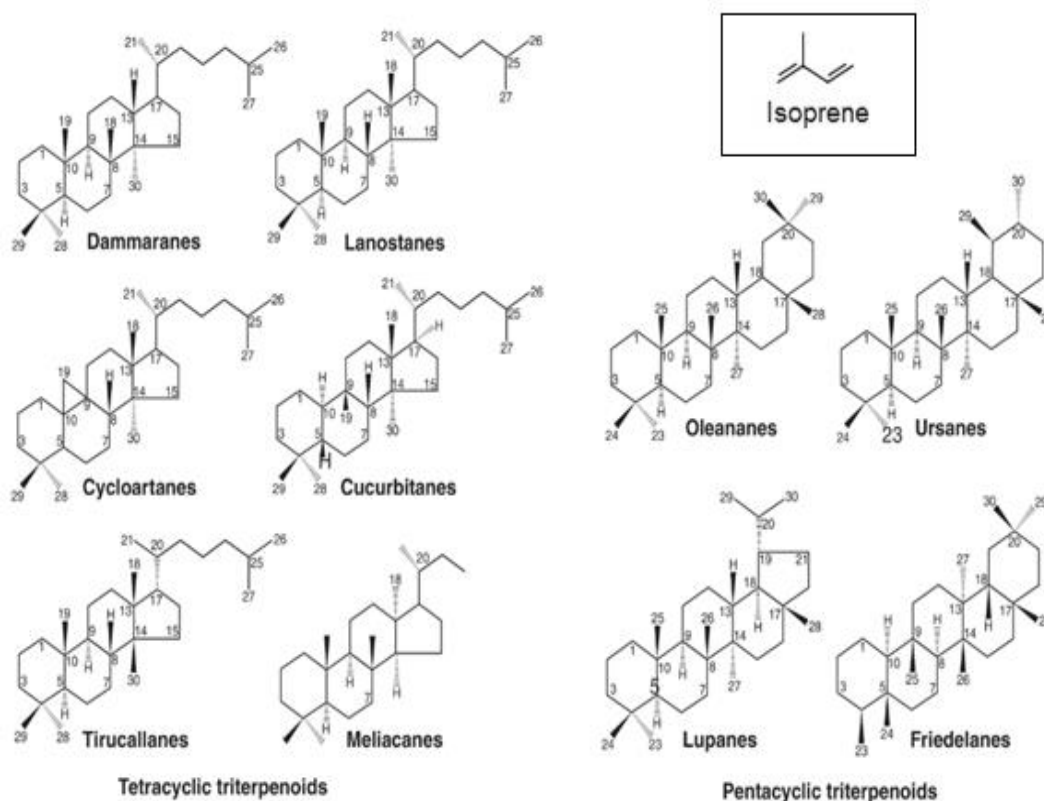


**Figura 3.3** - Estruturas modelo de (A) taninos hidrolisáveis e (B) taninos condensados. Fonte (adaptado): Huang *et al.* (2018).

Outra classe importante de metabólitos produzidos pelas plantas são os compostos terpênicos. Tratam-se de estruturas constituídas de unidades de isopreno ( $C_5$ ) e, conforme o número de unidades, são classificados, como monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}$ ) e politerpenos ( $(C_5)_n$ ;  $n > 8$ ) (KIYAMA, 2017). Os monos e sesquiterpenos são os constituintes majoritários dos óleos essenciais, misturas complexas, que em alguns casos são superiores a 100 compostos terpênicos diferentes, conferindo um amplo espectro de atividade biológica, com alto valor agregado. Entretanto, representam menos de 5% da matéria vegetal seca, uma fração muito modesta se comparada aos demais constituintes das plantas (FORNARI *et al.*, 2012; EL ASBAHANI *et al.*, 2015).

Dentro da classe dos terpenoides, os triterpenos também se destacam pelas atividades biológicas, os mesmos apresentam diversas estruturas, caracterizadas pelo esqueleto básico sintetizado a partir do esqualeno intermediário de 30 carbonos, que por meio de ciclização e oxidação, permite a formação de mais de 20 mil membros. Entre os terpenoides mencionados na literatura para a família

Celastraceae, têm-se os tetracíclicos e pentacíclicos (FIGURA 3.4), estruturas estas que incluem os oleanos, lupanos, glutinanos, ursanos, taraxeranos, damaranos, lanostanos e friedelanos, que são considerados marcadores químicos do gênero *Maytenus* e os principais triterpenoides presentes nas folhas de *M. aquifolia* e *M. ilicifolia* (VILEGAS *et al.*, 1999; ALVARENGA & FERRO, 2006; YAN *et al.*, 2014; MOREIRA *et al.*, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2020).



**Figura 3.4** - Classificações químicas e estruturas centrais dos triterpenoides tetracíclicos e pentacíclicos. Fonte (adaptado): YAN *et al.* (2014).

Diversos estudos realizados sobre o mapeamento da composição química do gênero *Monteverdia*, outrora denominado *Maytenus*, sugerem a presença de inúmeros metabólitos secundários, responsáveis pela bioatividade e seus efeitos farmacológicos, dependentes parcialmente e/ou de sinergias entre compostos (VELOSO *et al.*, 2017; ANTUNES *et al.*, 2020). Variações tanto na concentração, quanto na ausência ou presença de substâncias de uma população para outra, podem ocorrer, como reflexo de fatores ambientais e aspectos nutricionais (YARIWAKE *et al.*, 2005; MOSSI *et al.*, 2010). Os compostos indentificados na espécie *M. aquifolia* são apresentados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Compostos químicos encontrados na *M. aquifolia*.

<b>Parte da Planta</b>	<b>Classe do Composto</b>	<b>Metabólito</b>	<b>Referência</b>
Folha	Triterpeno friedelano	Friedelina, friedelan-3-ol	Vilegas et al. (1994)
Folha	Triterpeno friedelano	Friedelina, friedelan-3-ol	Lanças et al. (1997)
Folha e raiz	Triterpeno quinonametídeo*	Maitenina e 22 $\beta$ -hidroxi-maitenina	Corsino et al. (1998)
Folha	Flavonoide	kaempferol	Sannomiya et al. (1998)
	Triterpeno	Friedelina, friedelan-3-ol, lupeol, lupenona, simiarenol, $\beta$ -amirina e esqualeno	
Folha	Fitoesteroide	$\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol, ergosterol e Bassicasterol	Cordeiro et al. (1999)
	Tocoferol	$\alpha$ -tocoferol e tocoferóis	
	Ácido graxo	Ácido hexadecanóico	
Folha	Flavonoide	Quercetina e kaempferol	Vilegas et al. (1999)
Folha e raiz	Triterpeno friedelano	Friedelina e friedelan-3-ol,	Corsino et al. (2000)
	Triterpeno quinonametídeo*	Pristimerina e maitenina	
Folha	Triterpeno friedelano	Friedelina, friedelan-3-ol	Vasconcelos et al. (2000)
Folha	Flavonoide	Kaempferol (tetrassacárido)	Leite et al. (2001)
Folha e raiz	Flavonoide*	Epigallocatequina, ouratea-catequina, kaempferol, quercetina e proantocianidina	Corsino et al. (2003)
Folha e raiz	Triterpeno quinonametídeo*	Pristimerina e maitenina	Nossack et al. (2004)
Folha	Flavonoide	Quercetina e kaempferol	Yariwake et al. (2005)
	Triterpeno friedelano	Friedelina e friedelan-3-ol	
Folha	Triterpenos friedelano	Friedelina, friedelan-3-ol	Pereira et al. (2005)
	Fenóis e taninos.	(não especificado)	
Folha	Flavonoide	Quercetina, rutina, kaempferol e quercitrina	Tiberti et al. (2007)
Folha	Flavonoide	Quercetina e kaempferol	Diagone et al. (2012)
Folha	Tanino	(não especificado)	Holnik et al. (2015)
	Ácido graxo	(S) -HOTrE	
Folha	Ácido fenólico	Ácido protocatecuico	Antunes et al. (2020)
	Flavonoide	Epigallocatequina/ galocatequina e kaempferol	

### 3.1.2 Componentes químicos e propriedades terapêuticas

A família Celastraceae é uma importante fonte de compostos secundários bioativos. Dentre os compostos isolados de suas espécies, os triterpenoides são de grande interesse, devido a sua ampla gama de atividades biológicas e potencial terapêutico promissor, como agentes antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais (ALVARENGA & FERRO, 2006; SHAN *et al.*, 2013; MARTUCICCIELLO *et al.*, 2010; FACUNDO *et al.*, 2015), justificando o crescimento de pesquisas nos últimos anos.

Contudo, a biossíntese dos compostos da classe dos triterpenos e fitoesteroides, ocorre a partir de um precursor comum, de forma concisa, são derivados a partir da epoxidação da estrutura linear do esqualeno e pela ação das enzimas ciclases (BUSQUETS *et al.*, 2008). O esqualeno e os fitoesteroides são compostos lipossolúveis e são reportados por possuir efeitos farmacológicos significativos. O esqualeno é de grande interesse por parte da indústria que apresenta uma grande demanda entre 1000–2000 toneladas por ano, devido às suas inúmeras propriedades (antimicrobianos, anti-inflamatórios, antioxidantes, anticâncer e imunomoduladores) (DHAR *et al.*, 2016; SOU *et al.*, 2019).

A friedelina é um dos triterpenos derivados do esqualeno, sendo um dos mais importantes observados nos extratos de espinheira santa, trata-se de uma cetona triterpênica com atividades anti-inflamatórias e gastroprotetoras e um precursor de quinonemetidas antitumorais, considerado candidato ou protótipo de drogas que possam contribuir para o combate a doenças como a AIDS e o câncer (CORSINO *et al.*, 2000; ALVARENGA & FERRO, 2006; ALVES *et al.*, 2018).

Recentemente, os triterpenos friedelina, friedelan-3-ol, 3 $\beta$ -friedelanol e pristimerina (quinonametídeo) e  $\beta$ -amirina foram caracterizados pelos efeitos gastroprotetores, antiviral, citotóxicos, apoptótico, antiproliferativo e inibitórios significativos sobre úlcera gástrica (ANTONISAMY *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2018), anti-coronavírus (CHANG *et al.*, 2012); células de câncer de mama (SUBASH-BABU *et al.*, 2017), sarcoma de Kaposi (MARTUCICCIELLO *et al.*, 2010) e leucemia promielocítica (COSTA *et al.*, 2008), entre outras linhas celulares de

cancro. Esses compostos ainda recebem atribuições como ação antioxidante (SUNIL *et al.*, 2013), anti-inflamatório e antifibrogênico (THIRUPATHI *et al.*, 2017), proteção hepática (XU *et al.*, 2018) e ação antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium ulcerans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Candida tropicalis* e *Candida kruse* (ODEH *et al.*, 2016).

Os flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, compõem outro grupo de compostos importantes, comumente encontrados no gênero *Monteverdia* (*Maytenus*), e assim como os triterpenos, manifestam atividade biológica de grande interesse (NIERO *et al.*, 2011).

Na literatura, em estudos fitoquímicos demonstraram que os compostos fenólicos como os flavonoides quercertina e kaempferol, epigallocatequina, catequina, rutina e quercitrina e seus derivados, análogas as substâncias identificadas nos extratos de *M. aquifolia* (TABELA 3.1), apresentaram propriedades como antiúlceras (VILEGAS *et al.*, 1999), antioxidante (CORSINO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2010; BABUJANARTHANAM *et al.*, 2011), antitripanossomais e antileishmania (SILVA *et al.*, 2012), antivirais (CHLOW *et al.*, 2016), ansiolítico (MURADE *et al.*, 2021), anti-inflamatório (KUMAR *et al.*, 2016). O consumo de produtos que carregam em sua composição compostos fenólicos, podem fornecer uma gama de benefícios a saúde, reduzindo ou combatendo doenças futuras.

As caracterizações do perfil químico de extratos de *M. aquifolia* demonstra uma forte presença de triterpenos friedelanos, em especial os compostos friedelan-3-ona, friedelan-3-ol e friedelina, além de outros relevantes como esqualeno, esteroides, ácido graxos e vitamina E. Esse último, é considerado um dos compostos mais ativo biologicamente, relacionado a sua alta capacidade antioxidante, resguardando as células de espécies de oxigênio reativo (ZHANG *et al.*, 2020). Os extratos constituídos desses componentes podem exibir um elevado potencial terapêutico, fazendo-se necessário o estudo da composição química e sua variação com os fatores que controlam os métodos de extração.

### 3.2 Métodos de extração

Extratos ricos em compostos bioativos podem ser obtidos de diferentes partes das plantas e por diversos modos, e em geral, o tipo e a natureza da matriz determina o número das diferentes etapas que devem ser incorporadas aos procedimentos de extração. A seleção do método de extração deve ser meticulosa, considerando as características da matriz e a interação analito matriz, para assegurar que os constituintes bioativos não sejam afetados, pois, a escolha inapropriada pode provocar alterações químicas e físicas dos analitos e, conseqüentemente, a perda da bioatividade, além de refletir em interpretações errôneas de resultados posteriores (SASIDHARAN *et al.*, 2011; TONGNUANCHAN & BENJAKUL, 2014).

Os métodos clássicos de extração, entre eles Soxhlet, maceração e hidrodestilação, se utilizam de diferentes solventes com ou sem aplicação de calor e/ou agitação. Essas técnicas têm como características comuns os longos tempos de extração, temperaturas elevadas e o uso demasiado de solvente, fatores estes prejudiciais aos compostos termolábeis, além de implicar na necessidade de remoção do solvente excedente após estabelecido para o processo de extração (AZMIR *et al.*, 2013).

Entretanto, com a demanda exponencial por compostos bioativos de origem natural para aplicações mais amplas e seguras, fez-se impulsionar o desenvolvimento de novos processos de separação, os quais surgiram como solução às necessidades das indústrias químicas e nutracêutica por produtos de alta qualidade com elevado rendimento e baixo custo de produção.

Dentre as novas tecnologias emergentes aplicadas nos processos de separação têm-se: a extração assistida por micro-ondas (MAE - Microwave-assisted extraction), extração com fluido supercrítico (SFE - Supercritical fluid extraction), extração com líquido pressurizado (PLE - Pressurized Liquid Extraction), extração assistida por ultrassom (UAE - Ultrasound-assisted extraction), extração assistida por campo elétrico pulsado (PEF - pulsed electric field), extração assistida por enzimas (EAE - Enzyme assisted extraction), entre outras. Essas tecnologias de separação são consideradas atrativas, pois,

caracterizam-se pelo curto tempo de extração, volume reduzido de solventes orgânicos, conseqüentemente menor tempo para evaporação, e assim, atingem rendimentos elevados com menor tempo e o uso reduzido de recursos energéticos (KHODDAMI *et al.*, 2013; EL ASBAHANI *et al.*, 2015; HELENO *et al.*, 2016; DAS & EUN *et al.*, 2018; JIMÉNEZ *et al.*, 2018; PANDEY & SHRIVASTAVA, 2018).

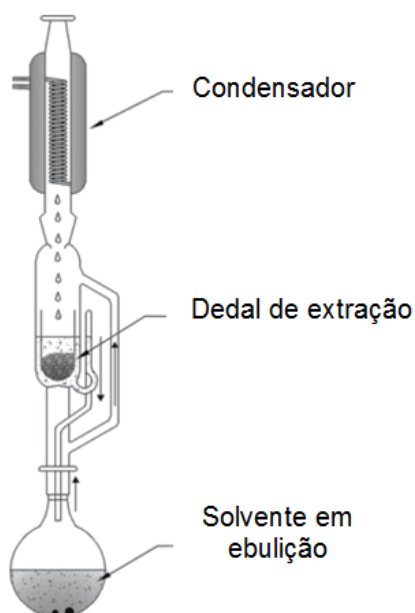
### 3.2.1 Extração convencional

As técnicas convencionais de extração podem ocorrer por três formas: sólido-líquido, líquido-líquido e gás-líquido, sua utilização é bem diversificada e tem sido aplicada em diferentes matrizes. A extração sólido-líquido é a mais comum, permitindo a separação ou transferência de compostos por lixiviação de uma matriz sólida para uma fase líquida. Entre os métodos, a destilação a vapor e a hidrodestilação, são consideradas técnicas simples para a obtenção de compostos. A destilação por arraste a vapor consiste basicamente na evaporação de um líquido volátil seguida de condensação. Nesse caso o vapor entra em contato a matriz e promove o arraste dos analitos voláteis. Já na hidrodestilação, a matriz sólida é mantida em contato direto com a água, o vapor produzido é rico em compostos voláteis, separados com base na destilação azeotrópica. Estas técnicas são frequentemente aplicadas na obtenção de óleos essenciais, mas apresentam diversas desvantagens, além das já mencionadas, têm-se a formação de subprodutos indesejáveis, termicamente degradados, resíduos de solventes no produto, menores rendimentos, perda de compostos polares solúveis em água e extração incompleta (KIM & HONG, 1999; DANH *et al.*, 2009; MOUAHID *et al.*, 2017).

A extração Soxhlet é outra técnica comumente utilizada nas rotinas de laboratórios, visando a separação de analitos de uma matriz sólida, fundamentada na extração sólido-líquido desenvolvida em 1879 por Franz Ritter von Soxhlet, químico alemão e fisiologista nutricional. Inicialmente a técnica tinha como propósito determinar o teor de gordura no leite (SOXHLET, 1879). O aparato desenvolvido é popularmente conhecido como extrator Soxhlet (FIGURA 3.5). Atualmente, esse processo é utilizado como método padrão para extrair analitos e

é referência para fins de comparação com outros métodos de extração (ZYGLER *et al.*, 2012; HELENO *et al.*, 2016).

O aparato possui três partes, cada uma responsável por um processo: um frasco de destilação e concentração do analito, suporte de amostra (dedal) e um condensador para recuperação do solvente. A extração ocorre pelo ciclo intermitente de evaporação e condensação do solvente. Quando o solvente atinge o nível de transbordamento no dedal, um sifão aspira a solução que conduz ao balão de destilação, que por sua vez promove a separação dos solutos do solvente, que retorna ao sistema na forma de vapor. A cada ciclo de extração e/ou preenchimento e esgotamento do dedal, uma fração de solução rica em soluto é extraída da matriz.



**Figura 3.5** - Extrator Soxhlet convencional. Fonte (Adaptado): ZYGLER *et al.* (2012).

Segundo Zyglér *et al.* (2012), a técnica Soxhlet geralmente não demanda condições drásticas para extração, mas a escolha de um solvente adequado para extração é um aspecto importante, que influenciará diretamente no rendimento. A seleção do solvente deve ser baseada na sua capacidade de dissolver os analitos, ou seja, é preciso que a polaridade entre analito e solvente seja semelhante. Essa técnica em questão é comumente usada para extrair analitos valiosos de materiais vegetais, como folhas, raízes, sementes e caules.



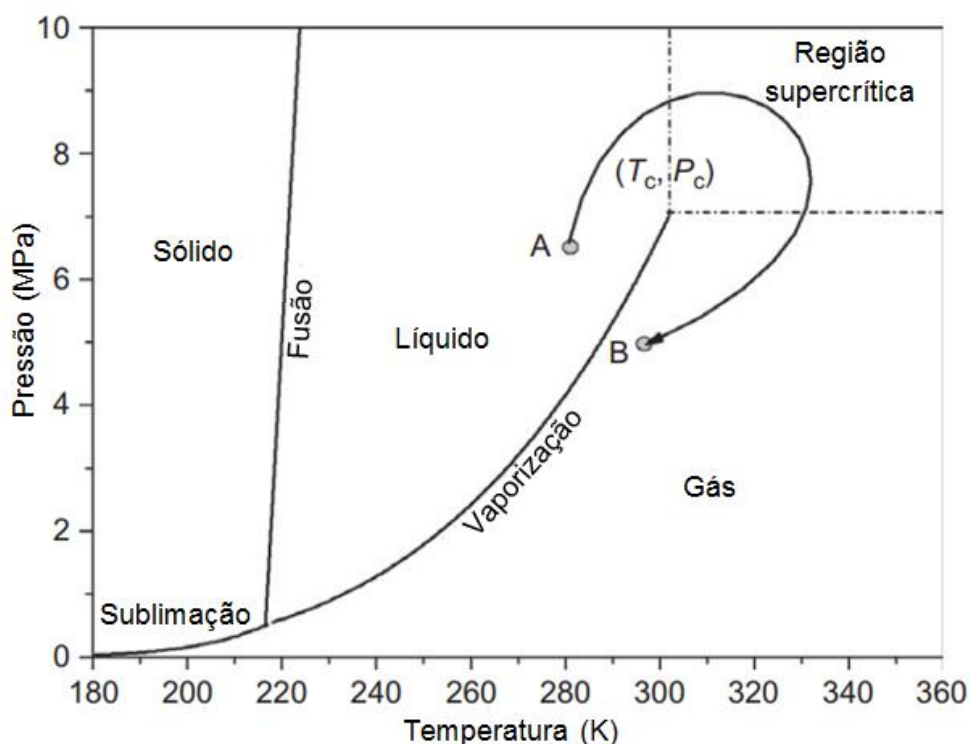
### 3.2.2 Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico

A SFE surgiu como uma técnica promissora, em resposta às limitações da extração tradicional, oferecendo várias vantagens operacionais sobre os métodos convencionais, com o intuito da separação e obtenção de analitos de forma mais limpa, sustentável e eficaz. O processo de extração empregando fluidos supercríticos pode ser dividido em duas etapas principais: (I) a extração e a (II) separação do soluto do solvente. A princípio, o fluido puro selecionado é pressurizado e aquecido sequencialmente ao entrar no extrator, o fluido é alimentado continuamente até a estabilização do leito de extração, na pressão escolhida. Ao atingir a pressão, bem como a temperatura desejada, a matriz e o solvente são mantidos em confinamento por um tempo pré-determinado, intervalo de extração estática. Posterior a este período de confinamento, se inicia o tempo de extração dinâmica, onde o solvente é percolado no extrator, podendo o fluxo ser ascendente ou descendente. A separação do soluto do solvente é alcançada na saída do extrator, onde o solvente sai transportando os compostos solubilizados e, por redução de pressão e/ou aumento da temperatura, o soluto torna-se isento de solvente, sem haver a necessidade de etapas posteriores de purificação. Em alguns casos o processo é dotado de válvulas de expansão ou separador que promove a volta do solvente ao estado gasoso, com a possibilidade de o gás ser reciclado e injetado novamente no sistema (SILVA *et al.*, 2016; CHEMAT *et al.*, 2017a).

Segundo PEREIRA & MEIRELES (2010), o fenômeno de extração pode ser descrito da seguinte forma: (I) a matriz sólida absorve o solvente supercrítico, promovendo a dilatação das estruturas celulares, o que facilita o fluxo de solvente e reduz a resistência a transferência de massa; (II) os compostos solúveis são dissolvidos pelo solvente; (III) os compostos dissolvidos são transferidos por difusão para a superfície do sólido; e (IV) os compostos são transportados pelo solvente e depois removidos do extrator.

A técnica consiste basicamente na utilização de um fluido no estado supercrítico, considerado assim, quando em condições acima de sua temperatura crítica ( $T_c$ ) e pressão crítica ( $P_c$ ). Essas são as condições mais elevadas onde um

gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão e onde o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura, condições essas que caracterizam o ponto crítico (FIGURA 3.6). Acima das condições críticas os fluidos ganham atributos em suas propriedades físico-químicas, relevantes para o processo de extração de sólido-líquido e se distinguem das propriedades exibidas pelo fluido quando abaixo do ponto crítico (BRUNNER, 2005; SILVA *et al.*, 2016).



**Figura 3.6** - Diagrama de fase esquemático mostrando os três estados da matéria: sólido, líquido e gás, bem como o estado do fluido supercrítico. Fonte (Adaptado): ERKEY, 2011.

Na região supercrítica mostrada na Figura 3.6, não existe distinção entre fases, portanto, há apenas uma única região homogênea, independentemente da pressão e a temperatura, assim uma substância pode passar do estado líquido para o gasoso, caminho A para B, pela região supercrítica sem exibir qualquer mudança em seu estado físico (ERKEY, 2011).

Antes da extração propriamente dita, a etapa de seleção do solvente é crucial, pois uma boa solubilização do soluto no solvente implicará em rendimentos aprimorados. Um bom solvente deve apresentar alguns atributos como ser de fácil

separação, baixo custo, inerte e de fácil manipulação (BRUNNER, 1994). Dentre os vários solventes utilizados (TABELA 3.2), o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) apresenta vantagens que o fazem sobressair aos demais candidatos, pois preenche todos os pré-requisitos de um bom solvente, como a alta disponibilidade e pureza elevada. Outro fator que favorece o seu emprego são as condições críticas brandas de temperatura e pressão, 31,1 °C e 73,8 bar, respectivamente. Estas condições contribuem também para a conservação de compostos voláteis e termossensíveis (ERKEY, 2011).

**Tabela 3.2.** Propriedades críticas de algumas substâncias utilizadas em SFEs.

<b>Solvente</b>	<b>T<sub>c</sub> (°C)</b>	<b>P<sub>c</sub> (bar)</b>
<b>Dióxido de carbono</b>	<b>31,1</b>	<b>73,8</b>
Etano	32,5	49,1
Propano	96,8	42,6
Etileno	9,5	50,6
Amônia	132,4	113,9
Água	374,1	221,0
Ciclohexano	279,9	40,3
Metanol	240,0	79,5
Etanol	243,1	63,9
Isopropanol	235,6	53,7
Tolueno	318,6	41,1
Benzeno	289,0	48,9
Clorotrifluormetano	28,9	39,2
Triclorofluormetano	198,1	44,7

FONTE (Adaptado): Erkey, 2011 e Silva et al. 2016.

O notável interesse pelo CO<sub>2</sub>, ainda é incrementado devido ao seu caráter inofensivo, não explosivo, não poluente e não tóxico, além de ser reconhecido geralmente como um solvente seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e European Food Safety Authority (EFSA) para a manufatura de produtos de uso humano, tornando viável a sua utilização na extração de compostos de matrizes vegetais (MENDIOLA *et al.*, 2007; BARZOTTO *et al.*, 2019).

Segundo Melo et al. (2014), o dióxido de carbono é um dos fluidos mais utilizados nas extrações supercríticas de biomassa vegetal, principalmente na obtenção de compostos de sementes e folhas, seguido de frutas, raízes, flores, rizomas e cascas, também é um dos principais candidatos para substituir os solventes orgânicos.

Entretanto, a especificidade do fluido supercrítico é dependente de suas propriedades físicas, como densidade, viscosidade e difusividade, que podem ser facilmente moduladas por um aumento na pressão ou temperatura, além dos seus valores críticos. Alterações na pressão no processo de extração modificam a densidade do fluido, conseqüentemente a força do solvente é modificada, ficando mais próxima a dos líquidos que possuem maior poder de solvatação. Por outro lado, sua viscosidade mais próxima de gases e difusividade, relativamente alta, contribui com sua mobilidade através de materiais sólidos, favorecendo a transferência de massa entre as fases (SILVA *et al.*, 2016; CHEMAT *et al.*, 2017a).

Embora, a utilização CO<sub>2</sub> em extrações supercríticas seja consequência das propriedades críticas baixas e segurança em sua manipulação, o gás por sua vez apresenta baixa polaridade, por conseguinte é mais adequado para a extração de compostos não polares, lipofílicos ou pouco polares. (PARK *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2014). Diante da vasta gama de moléculas polares ativas ou de alto peso molecular presentes na biomassa vegetal o poder de solubilização do CO<sub>2</sub> supercrítico frente a esses compostos é reduzido, isto é, as interações intermoleculares também são um fator chave na etapa de extração. Contudo, essa limitação de solvência do CO<sub>2</sub> pode ser superada com a adição de modificadores, chamados de cossolventes, utilizados para aumentar os rendimentos em analitos polares (ZULKAFI *et al.*, 2014).

### 3.2.3 Extração supercrítica com cossolventes

O conhecimento da solubilidade dos analitos em um fluido supercrítico é essencial para avaliar a viabilidade do processo e estabelecer as melhores condições operacionais de extração. Considerando variações na temperatura e/ou pressão, esta tem grande repercussão sobre a hidrodinâmica dos fluidos,

solubilidade e transferência de massa (SILVA *et al.*, 2016). A temperatura influencia de forma semelhante à pressão de vapor dos compostos extraíveis da biomassa vegetal e a elevação da pressão em uma determinada temperatura, resulta no aumento da densidade, a propriedade está relacionada ao poder de solvatação do solvente (MELO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016). Embora, a solubilidade seja função da temperatura e pressão do fluido supercrítico, o papel desempenhado pelo cossolvente é de fundamental importância, afinal sua adição permite o ajuste da afinidade do fluido aos analitos, aumentando a extração e sua seletividade (BRUNNER, 1994; MELO *et al.*, 2014). Além disso, contribui para dilatar as células vegetais, favorecendo tanto a penetração do solvente como a difusão do soluto (VEGGI *et al.*, 2014).

A adição de um solvente polar juntamente com CO<sub>2</sub>, resulta em um solvente misto, com maior densidade, onde os analitos polares apresentam maior solubilidade em relação ao CO<sub>2</sub> puro, favorecendo os rendimentos em analitos polares e aumentando o rendimento global (KOPCAK & MOHAMED, 2005). Esse comportamento pode ser baseado nas premissas da solubilidade, onde semelhante dissolve semelhante (MOKRANI & MADANI, 2016). Essa maior solubilidade também pode ser atribuída às forças de interação químicas (ligações de hidrogênio) e o aumento das forças de dispersão, devido a maior densidade apresentada pelo solvente misto. Ainda, seus efeitos podem ser mais pronunciados a medida que o ponto crítico é abordado, em virtude da maior compressibilidade do fluido na condição crítica (KOPCAK & MOHAMED, 2005).

A extração supercrítica com CO<sub>2</sub> e cossolventes é um método adequado para obtenção de produtos para a indústria nutracêuticos a partir da biomassa vegetal, propiciando o aumento e diversificação de compostos em extratos, resinas, oleoresinas e óleos essenciais (CAMPONE *et al.*, 2018). Entre os solventes orgânicos disponíveis, diversas investigações sugerem que a água, o etanol e metanol são bons para tal finalidade, e estão sendo aplicados com sucesso em várias matrizes vegetais submetidas a extrações supercríticas com ganhos nos quesitos rendimentos e qualidade. Como exemplo, na extração de compostos das folhas frescas de *Piper piscatorum* (PIMENTEL *et al.*, 2013), compostos fenólicos das folhas de bambu (ZULKAFI *et al.*, 2014), extratos não voláteis de flores

(*Hypericum caprifoliatum*) (ALMEIDA *et al.*, 2013), compostos polifenólicos da casca de jatobá (VEGGI *et al.*, 2014), extratos das raízes de *Arctium lappa* (RODRIGUEZ *et al.*, 2018).

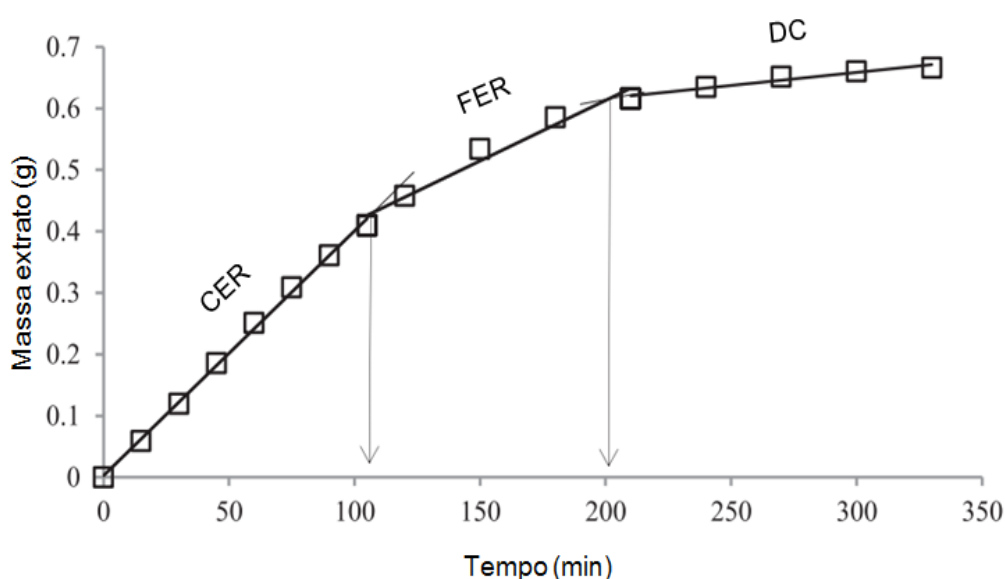
A utilização do etanol como cossolvente é dominante nas extrações supercríticas, sendo utilizado em mais de 50% dos trabalhos relacionados ao tema, seguido do metanol com participação de 21%, água 5%, diclorometano e n-hexano, 3% e 2% respectivamente (MELO *et al.*, 2014). O etanol, assim como a água, se desponta dos demais solventes, visto que, são considerados como GRAS, e ambientalmente seguros, podendo ser aplicados em processos para obtenção de compostos relacionados a alimentos e nutracêuticos (VEGGI *et al.*, 2014).

Embora, o etanol seja o solvente orgânico mais aplicado em SFE, novas abordagens vêm aplicando outros solventes alternativos, puros ou misturados em processos pressurizados, entre eles o acetato e lactato de etila, que demonstram baixa toxicidade. Estes solventes são considerados como GRAS e são aprovados pela FDA como aditivo farmacêutico e alimentar, além de serem importantes para a indústria de aromas (FALCO & KIRAN, 2012; BERMEJO *et al.*, 2015), e têm demonstrado efeitos benéficos em relação a extração CO<sub>2</sub> puro e com etanol como cossolvente, na obtenção de compostos e extratos (VARGAS *et al.*, 2010; BERMEJO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017).

#### 3.2.4 Curvas de extração

O estudo do processo de extração requer o conhecimento sobre os dados termodinâmicos e dados cinéticos, responsáveis pela compreensão da solubilidade, seletividade e transferência de massa, respectivamente. A solubilização de analitos a partir da superfície da matriz vegetal pode ocorrer por vários estágios e a transferência de massa geralmente é baseada em mecanismos convectivos. Há dois aspectos relevantes em relação ao transporte de massa, o transporte dos analitos no interior do sólido até a superfície, que ocorre por mecanismos difusivos e a remoção dos analitos a partir da superfície para o solvente supercrítico, sendo esta etapa promovida pela convecção mássica (SILVA *et al.*, 2016).

A avaliação gráfica do processo de extração supercrítica é realizada por meio da obtenção de curvas globais de extração (OEC - overall extraction curves), normalmente é representada em um gráfico de massa extraída acumulada em função do tempo de extração e/ou, em função da massa de solvente utilizada (SILVA *et al.*, 2016). As curvas variam de acordo com os parâmetros do processo, temperatura, pressão, tamanho de partícula, tempo, vazão de solvente/cossolvente e os demais fenômenos que ocorrem no interior do leito de extração. Geralmente, as OEC (FIGURA 3.7), apresentam três fases distintas, controladas por diferentes mecanismos de transferência de massa.



**Figura 3.7** - Períodos característicos de extração. Fonte (Adaptado): Reis et al. (2016).

1ª Fase (CER: Constant Extraction Rate) – Período de taxa de extração constante, caracterizado pela grande disponibilidade de soluto nas partículas da matriz (soluto de fácil acesso), onde prevalece a transferência de massa por convecção, isto é, o processo é controlado pelo fluxo de solvente.

2ª Fase (FER: Falling Extraction Rate) - Período de taxa de extração decrescente, devido há depleção de soluto na superfície do sólido, onde se inicia o mecanismo de difusão, operando em conjunto com o mecanismo de convecção.

3ª Fase (DC: Diffusion Controlled) - Período de taxa de extração lenta controlada por difusão (DC). A camada externa de soluto foi exaurida e a

transferência de massa ocorre exclusivamente pelo mecanismo de difusão intrapartícula. A curva aproxima-se do valor teórico de soluto extraível do sólido.

### 3.2.5 Modelagem matemática SFE

No estudo da SFE, depois da obtenção das curvas é interessante caracterizar cada período de extração e descrever o processo matematicamente, de forma que as equações obtidas possam ser utilizadas no próprio estudo da cinética de extração (parâmetros cinéticos), projetos de processos, extratores e sua otimização. A modelagem ainda possibilita a estimativa dos valores reais dos parâmetros significativos, viabilizando o estudo teórico em larga escala, através da previsão das curvas de extração. Esta estimativa é atrativa do ponto de vista econômico, visto que os experimentos reais em larga escala são de elevado custo (HUANG *et al.*, 2012).

Os modelos matemáticos utilizados para descrever o processo de extração supercrítica podem ser classificados em três grupos: empíricos, modelos baseados na analogia da transferência de calor e modelos baseados na integração de equações diferenciais de balanços de massa. Segundo Sovová (2012) os modelos de natureza empírica embora expressem diretamente a dependência do rendimento pelo tempo de extração, seus parâmetros ajustáveis não têm significado físico, portanto, são de viabilidade limitada e inapropriados para previsões de aumento de escala. Os modelos empíricos são compreendidos como funções matemáticas simples, fornecem soluções fáceis e se assemelham às isotermas de Langmuir e equações químicas de primeira ordem. Esse tipo de abordagem não supre a necessidade de descrição dos fenômenos de transferência de massa em uma unidade de extração (SOVOVÁ, 2017).

Em contrapartida os modelos baseados em equações de balanço de massas com referência ao fenômeno de transferência de calor permitem descrever os aspectos importantes do processo. O modelo de Crank (1975), por exemplo, parte do princípio da transferência de calor de uma partícula esférica para um meio uniforme, de forma análoga para SFE, considera-se que as superfícies das partículas sólidas estão cobertas pelo soluto de forma uniforme, e o soluto é



liberado no solvente supercrítico em função do tempo. Ao aplicar a segunda lei de Fick para difusão (EQUAÇÃO 1), e resolvendo o balanço de massa, temos a Equação 2 e 3 que representa a quantidade de massa de soluto que se difunde através da partícula em função do tempo de extração.

$$\frac{\partial x}{\partial t} = D_{AB} \nabla^2 x = D_{AB} \frac{\partial^2 x}{\partial r^2} \quad (1)$$

onde:  $D_{AB}$  é o coeficiente de difusão da segunda lei de Fick ( $L^2 T^{-1}$ ),  $r$  a direção radial.

$$\frac{X}{X_0} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D_{ef} t}{r^2}\right) \quad (2)$$

$$m(h = H, t) = \left(1 - \frac{X}{X_0}\right) X_0 m_t \quad (3)$$

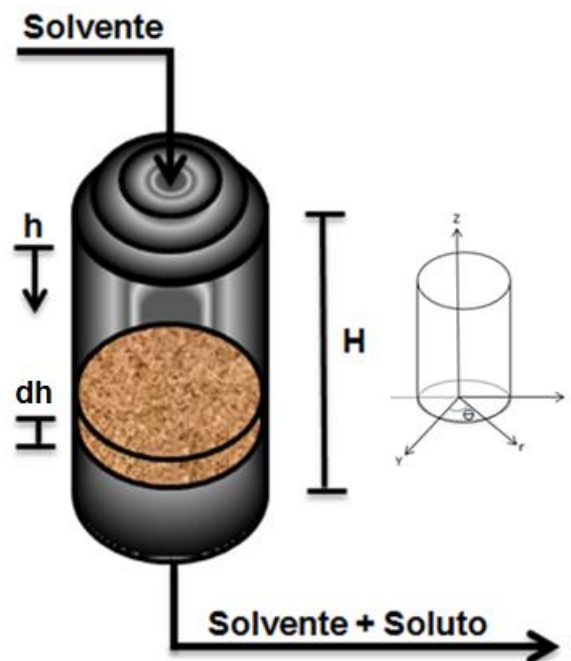
onde:  $X$  concentração remanescente no sólido;  $X_0$  é a concentração inicial de soluto no sólido;  $r$  é o raio da partícula;  $t$  é o tempo de extração e  $D_{ef}$  é o coeficiente de difusão;  $m_t$  é a massa total de matéria prima,  $h$  é a coordenada axial do extrator e  $H$  a altura do extrator.

Embora o modelo de difusão faça menção a transferência de massa, ele se resume apenas ao termo de acumulação e difusão no sólido, o que conduz em muitos casos a ajustes grosseiros e inadequados, pois negligência o termo de transferência de massa por convecção, termo esse que é predominante no início do processo de extração supercrítica. Já os modelos propostos para descrever o processo SFE baseados em balanços de massa diferencial ao longo de um leito de extração, permitem avaliar os efeitos de equilíbrio de fases, das resistências de transferência de massa e do padrão de fluxo na taxa de extração (SOVOVÁ, 2017).

Existem diversos modelos propostos para descrever os fenômenos em um leito de extração, variando desde equações simples, até equações complexas. Entre eles o modelo proposto por Sovová (1994), considera um leito preenchido por partículas de uma matriz vegetal, composta por células quebradas e intactas (BIC - Broken and Intact Cells), tem sido um dos mais adotado para ajustes das curvas de extração supercrítica. O modelo considera o escoamento axial de solvente

através de um leito de extração cilíndrico preenchido com uma matriz vegetal moída, disposta de forma homogênea (FIGURA 3.8).

O modelo de Sovová (1994) pondera a natureza física da matriz vegetal, que geralmente é submetida a processos para sua fragmentação (moagem ou maceração), resultando no aumentando a área superficial e quebra das paredes celulares, deixando exposta uma fração do soluto ao solvente, favorecendo assim, o contato do soluto com o solvente. Desta forma, pode-se considerar que a fração inicial de soluto contida na fase sólida ( $X_0$ ) é composta da fração de soluto de fácil acesso presente na superfície da partícula ( $X_P$ ), e pela fração de soluto inacessível presente dentro da partícula sólida ( $X_K$ ) (MARTÍNEZ, 2005; MELO *et al.*, 2016). Assim, o processo de remoção da fração de soluto pode ser conduzido tanto por convecção das células externas, como por difusão do soluto das células intactas internas para as células quebradas.



**Figura 3.8** - Sistema representativo do Leito de extração supercrítica, H corresponde a altura do leito e h distância axial ao longo do leito. Fonte: Autor.

A concentração inicial ( $t = 0$ ) do soluto na fase sólida pode ser expressa pela Equação 4:

$$X(t = 0) = X_0 = \frac{O}{m_S} = X_P + X_K = \frac{P}{m_S} + \frac{K}{m_S} \quad (4)$$

onde: X corresponde a concentração do soluto na fase sólida; O é massa total de soluto;  $m_s$  é massa de material inerte; P é massa de soluto de fácil acesso e K é massa de soluto de difícil acesso.

A compreensão da composição do sistema de extração e os fenômenos de transporte entre as fases são fundamentais para o balanço de massa do processo. Geralmente, o leito de extração é caracterizado pela existência de duas fases: uma sólida composta pela matriz vegetal fragmentada homogênea (células quebradas e intactas); e uma fluida, correspondente ao solvente supercrítico que escoia axialmente ( $z = h$ ) removendo o soluto da matriz vegetal, conforme representado na Figura 3.8. Assumindo-se que a altura do leito é infinitamente maior que seu diâmetro ( $H \gg \Phi$ ), a transferência de massa nas direções radial ( $r$ ) e tangencial ( $\Theta$ ) podem ser negligenciadas nas equações de balanço de massa. Portanto, o transporte de massa entre as fases pode ser dividido em: (I) convecção do soluto na fase fluida; (II) dispersão de soluto na fase fluida; (III) difusão da mistura de soluto e solvente na fase sólida e (IV) transferência de massa na interface sólido/líquido. (BRUNNER, 1994; MARTÍNEZ, 2005; PEDERSSETTI *et al.*, 2011).

Os balanços de massa no leito de extração para fase sólida e para a fase fluida presente no sistema são representados pelas Equações 5 e 6, respectivamente.

Para fase sólida:

$$\underbrace{\frac{\partial X}{\partial t}}_{\text{Acúmulo}} = \frac{\partial}{\partial h} \left( \underbrace{D_{aX}}_{\text{Difusão}} \frac{\partial Y}{\partial h} \right) - \underbrace{\frac{J(X,Y)}{(1-\varepsilon)\rho_s}}_{\text{TM interfacial}} \quad (5)$$

Para fase fluida:

$$\underbrace{\frac{\partial Y}{\partial t}}_{\text{Acúmulo}} + \underbrace{u}_{\text{Convecção}} \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{\partial}{\partial h} \left( \underbrace{D_{aY}}_{\text{Dispersão}} \frac{\partial Y}{\partial h} \right) + \underbrace{\frac{J(X,Y)}{\rho_f \varepsilon}}_{\text{TM interfacial}} \quad (6)$$

onde: X e Y são as razões de massa de soluto na fase sólida e fluida, respectivamente, ( $g\ g^{-1}$ ), t é o tempo de extração (s), u é a velocidade intersticial do solvente ( $cm\ s^{-1}$ ), h é a coordenada axial no leito de extração (cm),  $D_{aY}$  o coeficiente de dispersão axial na fase fluida ( $cm^2\ s^{-1}$ ),  $D_{aX}$  o coeficiente de difusão axial na fase sólida ( $cm^2\ s^{-1}$ ),  $\varepsilon$  é a porosidade do leito,  $\rho_f$  e  $\rho_s$  são as densidades

do fluido e do sólido, respectivamente, ( $\text{g cm}^3$ ), e  $J(X, Y)$  é a taxa de transferência de massa interfacial ( $\text{g cm}^{-3} \text{s}^{-1}$ ).

A partir dos balanços para as fases que compõem o leito de extração, o modelo proposto por Sovová (1994) considera algumas hipóteses de forma que as equações de balanço podem ser simplificadas: (I) processo isotérmico e isobárico; (II) propriedades físicas do solvente são consideradas constantes durante a extração; (III) leito compactado é considerado homogêneo quanto à concentração inicial de soluto e distribuição de partícula, assim como a fração vazia; (IV) acumulação de soluto no solvente é insignificante; (V) o solvente é livre de soluto na entrada do leito; (VI) os fenômeno de transferência de massa de todos os extratos são semelhantes; (VII) dispersão axial é negligenciada, considerando fluxo em pistão (*plug flow*). Além disso, no balanço de massa os termos referentes à dispersão e à difusão na fase sólida são desconsiderados, pois são avaliados como insignificantes quando comparados com a convecção na fase fluida. As Equações 7 e 8 representam os balanços simplificados em termos de transferência de massa interfacial  $J(X, Y)$ .

Para fase sólida:

$$-\rho_S(1 - \varepsilon) \frac{\partial X}{\partial t} = J(X, Y) \quad (7)$$

Para fase fluida:

$$\rho_F \varepsilon \frac{\partial Y}{\partial t} + \rho_F u \frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad (8a)$$

Geralmente, em processos de SFE a fase fluida pode ser tratada como uma solução diluída, assim a densidade do solvente pode substituir a densidade da fase fluida. Além disso, o primeiro termo no equilíbrio na fase fluida é frequentemente negligenciado (EQUAÇÃO 8b), pois o fluxo do fluido é considerado constante através de qualquer seção transversal perpendicular ao leito (*plug flow*).

$$\rho_F u \frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad (8b)$$

O termo  $J(X, Y)$  se refere ao transporte de massa na interface e é uma função dependente da disponibilidade e/ou concentração de soluto na partícula. Segundo SOVOVÁ (1994), o soluto de fácil acesso ( $X_P$ ) é extraído primeiro, em um período de taxa constante de extração (CER), até o momento em que a migração interna de soluto para interface não consiga mais compensar a taxa de remoção a partir da mesma ( $X \leq X_K$ ), neste momento se inicia a etapa de extração decrescente (FER). O fim da etapa decrescente é marcado pelo esgotamento do soluto de fácil acesso das partículas ( $X_P = 0$ ), ficando disponível apenas o soluto de difícil acesso, intimamente ligado à partícula sólida ( $X = X_K$ ), etapa de remoção conduzida pelo transporte difusional.

Os termos de transferência de massa interfacial devem ser considerados quando  $X > X_K$  e  $X \leq X_K$ , usando coeficientes de transferência de massa local para ambas as fases, conforme as Equações 9 e 10.

$$J(X, Y) = k_F a \rho_F (Y_S - Y) \longrightarrow X > X_K \quad (9)$$

$$J(X, Y) = k_S a \rho_S X \left(1 - \frac{Y}{Y_S}\right) \longrightarrow X \leq X_K \quad (10)$$

onde:  $k_F a$  e  $k_S a$  são os coeficientes de transferência de massa nas fases fluida e sólida ( $\text{min}^{-1}$ ), respectivamente, e  $Y_S$  é a solubilidade do soluto no solvente ( $\text{g g}^{-1}$ ).

As condições iniciais e de contorno para a solução das equações de balanço de massa são as seguintes:

$$X(h, t = 0) = X_0 \quad (11)$$

$$Y(h = 0, t) = 0 \quad (12)$$

A partir das considerações, o modelo de Sovová (1994) permite a descrição das curvas de extração para as três etapas mencionadas. A solução analítica é descrita nas Equações 13 a 20, que ilustram as fases distintas do processo de extração.

Período CER:  $t < t_{CER}$

$$m_{ext}(t) = \dot{m}_F Y_S t [1 - \exp(-Z)] \quad (13)$$

Período FER:  $t_{CER} < t \leq t_{FER}$

$$m_{ext}(t) = \dot{m}_F Y_S [t - t_{CER} \exp(Z_W(t) - Z)] \quad (14)$$

Período DC:  $t > t_{FER}$

$$m_{ext}(t) = m_s \left\{ X_0 - \frac{Y_S}{W} \ln \left[ 1 + \exp \left( \frac{W X_0}{Y_S} \right) - 1 \right] \exp \left[ \frac{W \dot{m}_F}{m_s} (t_{CER} - t) \right] \left( \frac{X_P}{X_0} \right) \right\} \quad (15)$$

Em que:

$$t_{CER} = \frac{m_s (X_0 - X_K)}{Y_S Z \dot{m}_F} \quad (16)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_s}{W \dot{m}_F} \ln \left[ \frac{X_K + (X_0 - X_K) \exp \left( \frac{W X_0}{Y_S} \right)}{X_0} \right] \quad (17)$$

$$Z_W = \frac{Z Y_S}{W X_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \exp \left[ \frac{W \dot{m}_F}{m_s} (t_{CER} - t) - X_K \right]}{X_0 - X_K} \right\} \quad (18)$$

$$Z = \frac{m_s k_F a \rho_F}{\dot{m}_F (1 - \varepsilon) \rho_S} \quad (19)$$

$$W = \frac{m_s k_S a}{\dot{m}_F (1 - \varepsilon)} \quad (20)$$

onde:  $m_{ext}$  é a massa de extrato (g);  $m_F$  a vazão mássica de solvente ( $g \text{ s}^{-1}$ );  $t$  é o tempo de extração (min);  $m_s$  é a massa de sólido inerte (g);  $X_0$  é a concentração inicial de extrato na matriz sólida ( $g \text{ g}^{-1}$ );  $t_{FER}$  é o tempo em que esgota o óleo de fácil acesso na saída da coluna (min);  $t_{CER}$  é tempo em que o óleo de fácil acesso na entrada da coluna se esgota (min);  $\varepsilon$  é a porosidade do leito;  $Z_W$ ,  $Z$  e  $W$  são os parâmetros adimensionais do modelo.

### 3.2.6 Extração com líquido pressurizado (PLE)

A extração com líquido pressurizado ou acelerada por solvente (ASE – *Accelerated Solvent Extraction*), como também é conhecida, têm se destacado nas últimas décadas por ser capaz de extrair compostos de uma forma rápida. Esta técnica combina temperaturas (50 a 150 °C) e pressões (35 a 200 bar), ambos parâmetros em condições elevadas, entretanto, não ultrapassam as condições críticas do solvente, assim, o solvente permanece em seu estado líquido (ANDREU & PICÓ, 2019). A alta pressão no processo permite que a extração ocorra em temperaturas elevadas, acima do ponto de ebulição do solvente, evitando a transição de fase (SOUZA *et al.*, 2021). A temperatura, por sua vez, é considerada

o principal fator que afeta a eficiência e seletividade da extração, seu aumento melhora a transferência de massa e difusão do solvente, contribui ainda para redução da tensão superficial e viscosidade do solvente, ao mesmo tempo que reduz o tempo de extração, conseqüentemente o consumo de solvente é reduzido (HERREIRO *et al.*, 2013; ALLAIN *et al.*, 2021).

Considerada uma técnica inovadora a PLE é uma das alternativas aos métodos clássicos para obter extratos naturais melhorados (JIMÉNEZ *et al.*, 2018). Para este processo de extração, o procedimento pode ser conduzido em modo estático ou dinâmico. Geralmente, o processo estático ocorre por um período muito curto, pois, tempos longos não melhoram os resultados finais, podendo ser realizado em um ou mais ciclos. No processo dinâmico o solvente flui de forma ininterrupta pela amostra, neste caso, necessitando apenas estabelecer o melhor fluxo de solvente para evitar gasto demasiado (HERREIRO *et al.*, 2013; ANDREU & PICÓ, 2019).

Notáveis benefícios são observados nas propriedades funcionais e econômicas dos extratos, atribuídos à redução de reações de oxidação (sistema fechado) e ao curto tempo requerido no processo, capaz de exaurir a fração solúvel em minuto (10-20 min) (CHEMAT *et al.*, 2011; BERMEJO *et al.*, 2015; MENDOZA *et al.*, 2017). Outro aspecto importante é a eliminação de etapas posteriores de filtração, isso, associado ao baixo consumo de solvente e tempo requerido, coloca a PLE em conformidade com as estratégias para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis. Diversos trabalhos têm reportado a utilização na obtenção de extratos e compostos a partir de folhas de chá verde (BERMEJO *et al.*, 2015), folhas de mate (SOUZA *et al.*, 2021), folhas de feijão (SANTOS *et al.*, 2021), folhas de *Lippia citriodora* (JIMÉNEZ *et al.*, 2018), cascas e polpas de juçara (MENDOZA *et al.*, 2017), trufas (CALVO *et al.*, 2020), raiz de vetiver (SANTOS *et al.*, 2019) entre outras biomassas.

### 3.2.7 Extração com solvente assistida por ultrassom (UAE)

O ultrassom (US) tem sido utilizado para melhorar a eficiência de diversos processos químicos, físicos e biotecnológicos, demonstrando grande potencial e

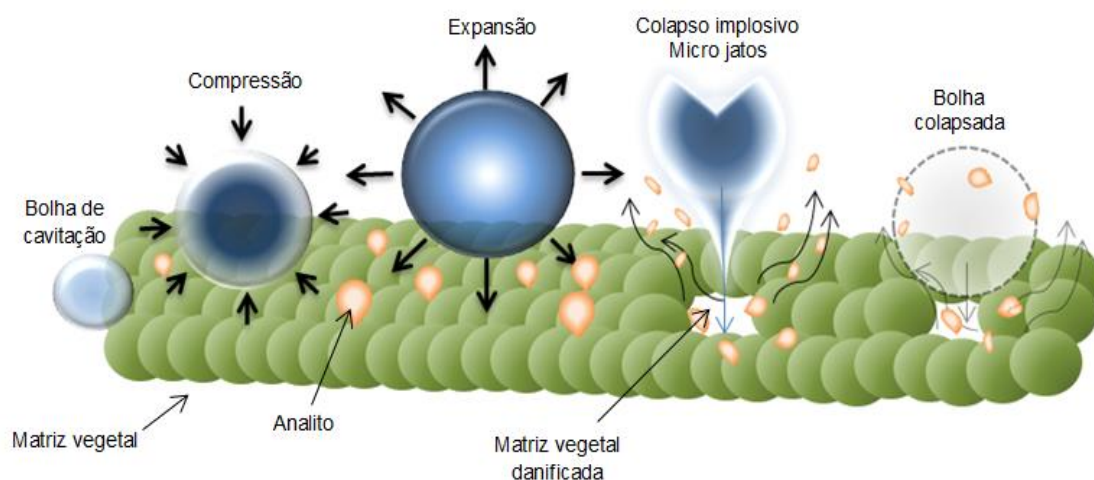
versatilidade para o desenvolvimento de novas aplicações. O emprego do US em processos de extração vem recebendo bastante atenção nas últimas décadas e sua utilização têm-se intensificado, visto que, é considerada uma tecnologia nova adequada para melhorar a eficiência de extração de compostos bioativos, alcançando altos rendimentos, apresentando notáveis benefícios relacionados aos aspectos econômicos e ambientais (SAMARAM *et al.*, 2015; WEN *et al.*, 2018).

Buscando melhorar a eficiência do processo em questão, diversos trabalhos têm reportado a utilização de ultrassom para extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais, como: compostos polifenóis de folhas de chá preto (BOTH *et al.*, 2014); flavonoides e alcaloides de folhas de boldo (PETIGNY *et al.*, 2013); compostos antioxidantes da casca de romã (PAN *et al.*, 2012); recuperação de antocianinas e outros compostos fenólicos de cascas e polpas de berinjela roxa (FERARSA *et al.*, 2018); compostos antioxidantes de folhas de amora-preta (AYBASTIER *et al.*, 2013); compostos aromáticos sensíveis do alho (KIMBARIS *et al.*, 2006); óleo essencial de sementes de cominho (ASSAMI *et al.*, 2012); componentes voláteis de açafrão (SERESHTI *et al.*, 2014); óleo de semente de crambe (TAVARES *et al.*, 2017); óleo de sementes oleaginosas/colza (SICAIRE *et al.*, 2016); óleo de sementes de mamão (SAMARAM *et al.*, 2015), entre outros.

O efeito do ultrassom pode ser baseado em uma interação direta com espécies moleculares, bem como o fenômeno de cavitação acústica. Este fenômeno tem como característica a criação de microbolhas em meio líquido, cheias de gás ou vapor, que oscilam em ciclos de compressão e expansão, até seu colapso, e implodem. O colapso provoca a liberação de grandes quantidades de energia, ocasionando a elevação local da temperatura e pressão, produzindo altas forças de cisalhamento e jatos de líquidos no solvente. Esses jatos tem energia suficiente para danificar fisicamente as paredes celulares da matriz vegetal (FIGURA 3.9), em alguns casos esse estresse mecânico, pode levar a fragmentação da matéria-prima (VEILLET *et al.*, 2010; CHEMAT *et al.*, 2011).

As perturbações promovidas pela propagação das ondas em meio líquido aumentam a superfície de contato entre as fases, o que é potencializado pela redução no tamanho de partículas, favorecendo a transferência de massa e o aumento na taxa de extração (JADHAV *et al.*, 2009).





**Figura 3.9** - Formação e colapso das bolhas de cavitação. Fonte: Autor.

A Figura 3.9 ilustra o mecanismo de extração a partir de uma matriz sólida: (I) ciclos de compressão e rarefação que criam vazios em torno da matriz sólida, os vazios são conhecidos como bolhas de cavitação que podem crescer durante as fases de rarefação que diminuem durante os ciclos de compressão; (II) ao atingirem tamanho crítico colapsam, liberando grandes quantidades de energia; (III) no momento do colapso próximo a superfície da matriz sólida a temperatura e pressão podem alcançar 5000 K e 2000 bar, gerando micro jatos de solvente dirigidos para superfície do sólido; (IV) a superfície da matriz é danificada e/ou rompida e um contato direto é estabelecido entre os analitos ativos dentro das paredes celulares e o solvente externo (CHEMAT *et al.*, 2011). O mecanismo de extração envolve dois fenômenos físicos, a difusão através das paredes das células e a lavagem do conteúdo das células quebradas (VINATORU *et al.*, 2017).

As ondas ultrassônicas nas UAE, podem ser produzidas por dois tipos de dispositivos: banho ultrassônico, que é comumente utilizado para dispersão de sólidos em um solvente e menos aplicado, pois a intensidade de entrega é baixa e altamente atenuada pela água e pelas paredes do recipiente utilizado para o experimento. Já os equipamentos tipo sonda, são muito mais poderosos, pois a intensidade é aplicada em uma pequena superfície e diretamente imersa no recipiente de reação/extração, de modo que ocorre menos atenuação em comparação ao banho. As ondas ultrassônicas produzidas são ondas sonoras de

altas frequências, acima dos 20 kHz, caracterizadas como inaudíveis pelo ser humano (CHEMAT *et al.*, 2011; CHEMAT *et al.*, 2017a).

Além de selecionar a configuração mais adequada do equipamento, também é importante identificar os parâmetros que podem influenciar no processo UAE, tais como: tipo de solvente, potência de sonicação, teor de umidade do sólido, razão sólido e solvente, tamanho de partícula, tempo e temperatura de extração. Esses parâmetros são frequentemente avaliados e investigados em vários estudos (PAN *et al.*, 2012; BOTH *et al.*, 2014; CENTENO *et al.*, 2014; SICAIRE *et al.*, 2016; TAVARES *et al.*, 2017).

O estudo dos parâmetros de processo é de grande importância para obter uma alta eficácia na extração, que resulta em uma maior obtenção de analitos e rendimento. Entretanto, é necessário considerar que o rendimento nem sempre é o único objetivo de um processo de extração, mas também o menor uso de recursos não renováveis, juntamente com o baixo consumo de energia (CHEMAT *et al.*, 2017a).

As principais vantagens do emprego UAE em relação aos demais métodos convencionais são rendimentos maiores, temperatura e tempo de extração reduzido, menor volume de solvente e transferência de energia e massa mais rápidas. Em relação aos não convencionais, destaca-se o baixo custo, eficiência e o aumento simples de escala do dispositivo ultrassônico (CHEMAT *et al.*, 2011; ALBAHARI *et al.*, 2018; KLEIN *et al.*, 2018). As vantagens dos UAE são claras e, por essa razão, as indústrias farmacêutica, nutracêutica e alimentar têm um grande interesse na tecnologia e sua adoção.

### **3.3 Considerações Parciais**

A revisão da literatura expôs *Monteverdia aquifolia*, popularmente denominada espinheira santa como uma espécie muito bem difundida na medicina caseira e com relatos significativos na comunidade científica. Este é um dos poucos fitoterápicos que possuem efeitos comprovados e aprovados, a princípio na década de 90 pela central de medicamentos do ministério da saúde (CEME), indicado como coadjuvante no tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal. Seus extratos já

foram obtidos por diversas formas, inclusive por extração com fluido supercrítico, contudo, os dados disponíveis são singelos, desprovidos de informações mais detalhadas. Contudo, não foram encontrados estudos que tenham sido conduzidos com cossolvente no processo supercrítico e que tenham investigado os efeitos das variáveis pelo método dinâmico de extração. Portanto, se faz necessário uma nova avaliação da abordagem SFE e investigação da extração dinâmica com cossolventes. Também não foram encontrados registros até o presente momento sobre estudo detalhados da extração assistida por ultrassom e com líquidos pressurizados, que utilizaram essa matriz vegetal em questão. Estas três técnicas caracterizadas como avançadas ou não convencionais, são algumas das alternativas disponíveis para suprir as deficiências dos métodos convencionais de extração (destilação, hidrodestilação, maceração e Soxhlet). As extrações SFE, UAE e PLE são consideradas limpas, rápidas e ambientalmente seguras ou menos agressivas, operando com volume de solvente reduzido em menor tempo, minimizando os efeitos adversos sobre os produtos extraídos.

Desta forma, a proposta deste trabalho é estudar os processos de extração SFE, UAE e PLE, comparando com o método convencional Soxhlet, avaliar os efeitos das variáveis que influenciam as extrações não convencionais, visando obter o máximo de rendimento em extratos de *M. aquifolia*, levando em conta os parâmetros de qualidade, ou seja, caracterizar os extratos, quanto a sua composição química e atividade antioxidante

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Origem e preparo das folhas de *M. aquifolia*

As folhas de *M. aquifolia* foram colhidas na cidade de Toledo (Paraná, Brasil), nas coordenadas 24°44'43.8" S, 53°44'41.9" W, entre os meses de julho e setembro de 2018, solstício de inverno. Em um primeiro momento a árvore de médio porte foi identificada pelo saber popular local, como sendo espinheira santa, em seguida, foram retirados ramos de suas partes aéreas, de onde as folhas foram separadas manualmente. A seleção das folhas foi realizada visualmente, dando preferência as mais saudáveis, sem injúrias em sua superfície, de coloração e de textura uniformes.

A identificação e confirmação da espécie foram realizadas pelo Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNOP (Cascavel, Brasil), onde uma amostra está depositada sob o n°. UNOP 10377. As folhas foram secas em dois estágios: 1° - a sombra por cinco dias ( $25 \pm 5$  °C) e 2° - secagem complementar em estufa de circulação forçada por 12 horas a 40 °C. Em seguida, as mesmas foram fragmentadas (multiprocessador Philco 800 w) e classificadas em um conjunto de peneiras de Tyler (9-48 mesh), acopladas a um agitador mecânico (Produtest) por 15 min. As porções retidas nas peneiras de 12 (12,4%), 16 (30,1%), 20 (7,6%) e 28 (16,8%), foram misturadas e armazenadas a 4 °C em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade até sua utilização.

#### 4.1.1 Determinação do teor de umidade

Após o preparo da matriz e mistura das frações retidas nas peneiras, o teor de umidade foi estimado seguindo o método gravimétrico. Foram pesadas aproximadamente 5 g da matéria-prima em placa de Petri, em seguida foi colocada em estufa de secagem por 3 horas a 105 °C (AOAC, 2012), mais tarde, acondicionada em dessecador até atingir a temperatura ambiente para aferir sua massa. Este procedimento se repetiu até alcançar a massa constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre a massa antes e depois da secagem em estufa. As medidas foram realizadas em triplicata.

#### 4.1.2 Análise granulometria

O diâmetro médio das amostras utilizadas nos experimentos, resultante da mistura das frações mássicas retidas nas peneiras 12, 16, 20 e 28 mesh, foi estimado de acordo com GOMIDE (1983), Equação 21.

$$d_p = \sqrt{\frac{\sum_1^n \frac{m_i/M}{\bar{d}_i}}{\sum_1^n \frac{m_i/M}{\bar{d}_i^3}}} \quad (21)$$

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

#### 4.1.3 Densidade real das folhas

A determinação da densidade real ( $\rho_r$ ) da amostra de *M. aquifolia* processada ( $\rho_s$ ) foi realizada por picnômetria utilizando gás hélio (Micromeritics®, modelo AccuPyc II 1340 - Norcross, EUA), no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC da Faculdade de Engenharia Química, Unicamp. A densidade real foi obtida pela média de 10 determinações.

## 4.2 Extração

### 4.2.1 Extração convencional – Soxhlet (SOX)

A extração convencional foi realizada em aparato Soxhlet. Em cada ensaio foram utilizadas 10 g de folhas de *M. aquifolia* trituradas pesadas em cartuchos de celulose e 250 mL de solvente. O reservatório de solvente foi aquecido com o auxílio de uma manta térmica até a temperatura específica de ebulição do solvente utilizado e mantido sob refluxo por um período de 360 min. As extrações foram conduzidas com três diferentes solventes etanol (EtOH), acetato de etila (EtAc) e *n*-hexano (Hex), com 99% de pureza (Neon).

O excesso de solvente foi removido do extrato em um evaporador rotativo a vácuo a 50 °C (IKA, RV 10), em seguida o solvente residual foi removido em estufa de circulação forçada a 50 °C. Os extratos foram armazenados em frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração a 4 °C. As extrações com cada solvente foram efetuadas em triplicata.

O rendimento em extrato foi calculado utilizando a Equação 22.

$$rend. (\%) = \frac{m_{extrato}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (22)$$

onde:  $m_{extrato}$  representa a massa total de extrato obtida ao final da extração e  $m_{amostra}$  representa a massa de folha utilizada na extração

#### 4.2.2 Extração com solventes pressurizados (PLE)

As PLE foram realizadas em um módulo de escala laboratorial, constituído por um leito de extração de aço inoxidável (14,4 cm<sup>3</sup>), um forno elétrico responsável por controlar a temperatura, uma válvula micrométrica, um reservatório de solvente e uma bomba de alta pressão para líquidos (Waters, modelo 515). Em cada condição de extração, o leito foi preenchido com aproximadamente 2,75 g de folhas trituradas, em seguida a célula foi aquecida até a temperatura de trabalho (40, 50 e 60 °C). Em seguida, o solvente (EtOH, EtAc e Hex) foi bombeado do reservatório para o leito com fluxo constante de 2 mL min<sup>-1</sup>, até que o sistema fosse pressurizado a 10 MPa. Nesse momento, a válvula micrométrica foi aberta suavemente até o ponto em que fosse possível manter a pressão do sistema constante a 10 MPa.

As curvas cinéticas de extração foram determinadas nas três temperaturas (40, 50 e 60 °C) para os três solventes utilizados. Alíquotas dos extratos foram coletadas em frascos de vidro em intervalos de 30 s (0-2 min), 1 min (2-6 min), 2 min (6-18 min) e 4 min (até 30 min). Ao fim do processo, os extratos foram concentrados e secos em estufa de circulação forçada a 50 °C e armazenados em frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração a 4 °C. As extrações com cada solvente foram efetuadas em triplicata, para cada temperatura avaliada. As condições operacionais de temperatura e pressão foram selecionadas com base

em relatos da literatura de Mendoza et al. (2017), Santos et al. (2019) e Palsikowski (2020) que também aplicaram esta técnica.

#### 4.2.3 Extração assistida por ultrassom (UAE)

As UAE foram realizadas com EtOH, selecionado a partir dos resultados das extrações Soxhlet e PLE. Um volume variável de solvente foi utilizado para uma massa fixa de 5 g de folhas trituradas. Um planejamento experimental Box-Behnken de três níveis para três fatores independentes (TABELA 4.1), amplitude (20, 50 e 80% - da potência nominal máxima do equipamento), temperatura (40, 50 e 60 °C) e razão solvente/ massa de folha (10, 15 e 20 mL g<sup>-1</sup>), foi utilizado para investigar os efeitos das variáveis independentes que influenciam o processo de extração. As respostas avaliadas foram: rendimento (X<sub>0</sub> %), conteúdo fenólico total (CFT) e atividade antioxidante (AA<sub>DPPH</sub> e AA<sub>FRAP</sub>). Os intervalos das variáveis foram baseados em estudos anteriores (KLEIN *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2019; PALSIKOWSKI *et al.*, 2020).

**Tabela 4.1.** Valores independentes e os níveis adotados para o planejamento Box-Behnken nas extrações assistidas por ultrassom.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	+1
X <sub>1</sub> - Temperatura (°C)	40	50	60
X <sub>2</sub> – Potência (%)	20	50	80
Potência (W)	11,56 ± 0,01	30,49 ± 0,12	38,69 ± 0,80
X <sub>3</sub> - Razão solvente/folha (mL g <sup>-1</sup> )	10	15	20

O procedimento de extração foi conduzido acomodando previamente a massa de folhas em uma célula de vidro encamisada (250 mL), em seguida, EtOH foi adicionado na célula, na proporção correspondente ao planejamento. Um processador ultrassônico do tipo sonda com 13 mm de diâmetro e potência nominal de 750 W (Sonics, VCX 750) foi usado para sonicar a mistura (EtOH/folha) a uma frequência de 20 kHz e com a sonda inserida a 1 cm de profundidade. Os ensaios

foram realizados em modo contínuo, ou seja, a potência dissipada no ambiente foi mantida constante durante o processo de extração. A temperatura da célula de extração foi controlada com auxílio de um banho termostático (Marconi, Ma-184).

O tempo de processamento foi definido em 30 minutos, determinado em ensaios cinéticos preliminares na condição central do projeto (50% de amplitude, 50 °C e 15 mL g<sup>-1</sup>). Ao fim de cada processo de extração, a fração líquida foi separada por filtração a vácuo e o extrato foi concentrado, seco e armazenado em flaconetes de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração a 4 °C.

A caracterização da energia ultrassônica dissipada no meio de extração foi determinada pelo método calorimétrico, onde a temperatura exata do solvente foi registrada a cada segundo durante 5 minutos de sonicação, utilizando um termômetro Omega HH376 e o Software SE376 RTD Thermometer, versão 4.1.0.0, conforme descrito por Palsikowski *et al.*, (2020). A potência da sonicação efetiva (P) dissipada foi calculada a partir da variação da temperatura provocada pelas ondas acústicas, expressa pela Equação (23):

$$P = m \cdot C_p \cdot \frac{dT}{dt} \quad (23)$$

onde m (kg) é a massa do solvente; C<sub>p</sub> é a capacidade calorífica do solvente (água, 4200 J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>) e dT/dt é a inclinação da curva temperatura/tempo. As medidas foram realizadas em triplicada para cada percentual de potência adotada no planejamento.

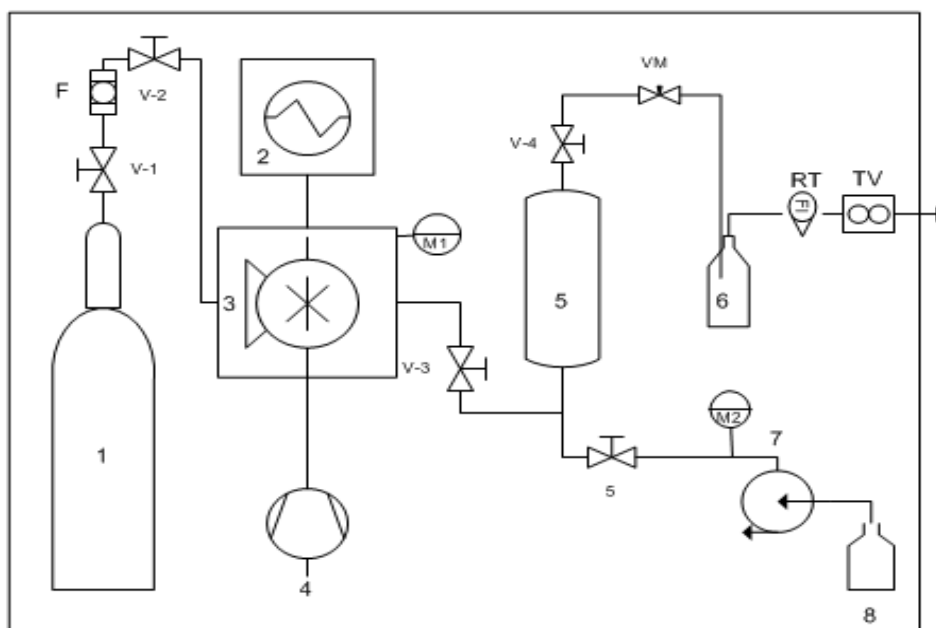
#### 4.2.4 Extração com fluido supercrítico (SFE)

##### Módulo de extração

As extrações foram realizadas em uma unidade de extração de escala laboratório Spe-ed SFE Basic (Applied Separations, modelo 9955, Allentown, EUA) do Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Além do módulo, um banho termostático à -5 °C (Julabo, F25-ME), assegura que o CO<sub>2</sub> se mantenha o líquido antes de entrar na bomba e um compressor de ar fornece o suprimento de ar comprimido à bomba (8 bar e 8 pés<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>). O módulo também é composto por um vaso de extração de aproximadamente 46,71 cm<sup>3</sup> (1,36 cm (Ø) x 32,21 cm (H)), um forno com



aquecimento elétrico, válvula micrométrica, um rotâmetro e um totalizador de vazão, conforme ilustrado na Figura 4.1.



**Figura 4.1** - Diagrama do processo de extração com fluido supercrítico, com os seus principais componentes: 1 – cilindro de CO<sub>2</sub>; 2 – banho termostático; 3 – módulo Spe-ed SFE Basic (Booster); 4 – compressor; 5 – vaso de extração; 6 – frasco vial; 7 – bomba de cossolvente; 8 – frasco de cossolvente; F – filtro; M – manômetros; V – válvulas; VM – válvula micrométrica; RT – rotâmetro e TV – totalizador de vazão.

### *Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico*

O procedimento experimental para a extração dos compostos das folhas de espinheira santa foi baseado nos estudos realizados por Palsikowski et al. (2019) e Klein et al. (2018), com modificações. Aproximadamente 17,5 g das folhas foram acomodadas e compactadas no vaso de extração, com o auxílio de um bastão de aço inox e, acoplado ao forno de aquecimento. Após, o sistema atinge a temperatura de trabalho, o CO<sub>2</sub> liberado para leito de extração e pressurizado na pressão de operação, em seguida, o tempo de 60 min foi fornecido ao sistema, para extração estática, com válvula de saída fechada. Esse tempo foi definido com base em testes preliminares, a fim de assegurar a penetração total do solvente na matéria-prima e solubilização do extrato de fácil acesso. Posteriormente, deu-se início a etapa de extração dinâmica.

A investigação das principais variáveis independentes, sendo elas temperatura (°C), pressão (bar) e vazão (mL min<sup>-1</sup>), foi realizada por meio de um delineamento Box-Behnken para três níveis e fatores, conforme apresentado na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Valores das variáveis independentes e os níveis adotados para o planejamento Box-Behnken nas extrações supercríticas com CO<sub>2</sub>.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> - Temperatura (°C)	40	50	60
X <sub>2</sub> - Pressão (bar)	200	250	300
X <sub>3</sub> - Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	2	4	6

O produto resultante de cada ensaio foi coletado em frasco Vial de 40 mL e sua massa determinada em intervalos de tempo 5 (0-30 min), 10 (30-60 min) e por fim, 20 min (60-100 min) de extração. Posteriormente, os extratos foram solubilizados em EtOH (99%) e transferidos para um frasco âmbar, e colocados para eliminação do solvente em estufa de circulação forçada a 50 °C. Após, secos foram mantidos sob refrigeração a 4 °C.

#### *Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico e cossolventes*

Na configuração com cossolvente, as extrações foram realizadas com o auxílio de uma bomba autônoma programável (Waters, 515 HPLC), conforme ilustrado na Figura 4.1, responsável por bombear o modificador para linha de alimentação do vaso de extração. O procedimento de extração foi realizado em modo contínuo na condição de maior rendimento obtido com CO<sub>2</sub> puro (50 °C, 300 bar e 6 mL min<sup>-1</sup>), utilizando dois agentes modificadores distintos EtOH e EtAc, adicionando 1, 3 e 5% (v v<sup>-1</sup>) a vazão do CO<sub>2</sub>. As concentrações foram selecionadas com base nos estudos realizados por LIMA et al. (2019) e SANTOS et al. (2019).

Para cada arranjo experimental, a mesma percentagem de modificador foi adicionada ao vaso de extração antes da pressurização, considerando a massa de CO<sub>2</sub> necessária para preencher o leito preenchidos com as folhas. De forma

análoga ao procedimento de extração com CO<sub>2</sub> puro, o tempo de 60 min foi fornecido ao sistema para extração estática, ao término, a etapa de extração dinâmica foi iniciada, seguindo os mesmos intervalos de tempo utilizado nas extrações com CO<sub>2</sub> puro. Os extratos foram coletados em frasco Vial de 40 mL, conectado à válvula micrométrica. Após, as extrações o excedente de solvente foi eliminado do extrato com o auxílio de uma estufa de circulação forçada a 50 °C e a massa de extrato aferida. As extrações com cada solvente foram efetuadas em duplicata, para cada porcentagem avaliada.

A estimativa da densidade da mistura dos solventes no sistema (CO<sub>2</sub>+EtOH e CO<sub>2</sub>+AcEt), foi realizada a partir das frações molares no sistema, assumindo que os cossolventes se comportam como um líquido incompressível. A densidade do CO<sub>2</sub> foi obtida no NIST (WEBBOOK) e a densidade do EtOH e do AcEt na temperatura de operação foram calculadas conforme a Equação 24 (GREEN & PERRY, 2007):

$$\rho = \frac{C_1}{C_2 \left[ 1 + \left( 1 - \frac{T}{C_3} \right)^{C_4} \right]} \quad (24)$$

onde:  $\rho$  é a densidade (kmol m<sup>-3</sup>), T é a temperatura (K), e C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, e C<sub>4</sub> são constantes cujos valores dependem do componente em questão. No caso do EtOH, C<sub>1</sub> é 1,6288, C<sub>2</sub> é 0,27469, C<sub>3</sub> é 514, e C<sub>4</sub> é 0,23178, e do AcEt, C<sub>1</sub> é 0,8996, C<sub>2</sub> é 0,25856, C<sub>3</sub> é 523,3, e C<sub>4</sub> é 0,278.

#### *Solubilidade do extrato no solvente supercrítico*

O método dinâmico foi usado para determinar a solubilidade (Y<sub>S</sub>), a partir dos dados cinéticos experimentais. Os valores de solubilidade para cada temperatura e pressão foram representados graficamente como massa total de extrato (g) versus massa de solvente utilizado (g). Uma regressão linear foi realizada para cada condição e a solubilidade foi obtida a partir da inclinação da linha ajustada aos valores experimentais utilizando-se os dados da parte linear da curva de extração, conforme a Equação 25.

$$Y_S = \frac{m_{extrato}}{m_{solvente}} \quad (25)$$

onde:  $Y_s$  é a solubilidade do extrato no solvente ( $\text{g g}^{-1}$ );  $m_{extrato}$  a massa total de extrato (parte linear) (g) e  $m_{solvente}$  massa de solvente gasta na extração (parte linear) (g).

#### *Densidade do leito ( $\rho_a$ )*

A densidade aparente do leito de partículas ( $\rho_a$ ) foi determinada a partir da relação dada pela Equação 26:

$$\rho_a = \frac{m_s}{V_{leito}} \quad (26)$$

onde:  $m_s$  é a massa de inerte, sendo esta a massa de amostra alimentada no vaso de extração (g), descontada a massa de extrato extraída e  $V_{leito}$  é volume do leito ( $\text{cm}^3$ ).

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

A porosidade do leito de extração foi determinada pela razão entre o volume ocupado pelo fluido e seu volume total, utilizando-se a Equação 27:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (27)$$

onde:  $\rho_a$  é a densidade do leito ( $\text{g cm}^{-3}$ ) e  $\rho_r$  é a densidade real das folhas ( $\text{g cm}^{-3}$ ), conforme a seção 4.1.3.

#### *Modelagem matemática da cinética de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico*

Conforme mencionado por Santos, 2018 e Palsikowski, 2020, na modelagem das curvas cinéticas de extração representadas pelo modelo matemático de Sovová (sessão 3.2.5), a fração de soluto na fase sólida ( $r_k = X_p/X_o$ ) é dependente do processo de preparação da biomassa, sendo um fator volumétrico entre as células rompidas intactas. Com a finalidade de conferir ao parâmetro um significado físico, seu valor pode ser considerado constante, visto que o procedimento de preparação foi o mesmo para todo o material. No ajuste deste parâmetro utilizou-se o método “golden search”, com a seguinte função objetivo (EQUAÇÃO 28):

$$F = \sum_{i=1}^{n_{exp}} \sum_{j=1}^N \left( \underbrace{m_{ext_{ij}}^{Calc}}_A - \underbrace{m_{ext_{ij}}^{Exp}}_B \right) \quad (28)$$

onde: A é referente a massa de extrato predita pelo modelo matemático; B é a massa de extrato obtida experimentalmente;  $n_{exp}$  é o número experimentos e N o número de pontos da curva cinética experimental.

Os parâmetros adimensionais do modelo de Sovová Z e W, que estão relacionados aos coeficientes de transferência de massa no filme externo e no sólido, respectivamente, foram determinados com o emprego do método de otimização multivariável Simplex Down-Hill a partir da minimização da função objetivo dada pela Equação (29).

$$F = \sum_{j=1}^{n_{exp}} \left( \underbrace{m_{ext_j}^{Calc}}_A - \underbrace{m_{ext_j}^{Exp}}_B \right)^2 \quad (29)$$

### 4.3 Caracterização dos extratos

#### 4.3.1 Composição química

As análises para determinação da fração volátil dos extratos das folhas de *M. aquifolia* foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá em Umuarama – PR, utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (GC/MS QP2010 SE, Shimadzu, Chiyoda-ku, Tóquio, Japão).

As amostras foram diluídas em EtOH (Panreac) antes de serem injetadas na coluna SH-RTx-5MS (Shimadzu, 5% fenil-metilsiloxano, 30 m × 0,25 mm id, 0,25 µm) usando um amostrador automático (Shimadzu AOC-20i). O hélio foi utilizado para transportar a amostra através da coluna com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e velocidade linear de 37,5 cm s<sup>-1</sup>. Em cada análise, a quantidade de amostra injetada foi de 1 µL com proporção de divisão de 30:1. Inicialmente, a temperatura da coluna foi fixada em 120 °C, aquecimento de 6 °C min<sup>-1</sup> a 260 °C e posteriormente a 3 °C min<sup>-1</sup> atingindo a temperatura final de 300 °C, condição na qual permaneceu por 5 minutos. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram mantidas em 250 °C. Os espectros de massa foram registrados a 70 eV com

uma faixa de massa de m/z 30 a 600 amu. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação de seus espectros de massa com os espectros disponíveis no banco de dados do NIST (National Institute of Standards and Technology).

Foram analisados os extratos obtidos com cada solvente para cada uma das técnicas avaliadas. Foram analisados o ponto central dos planejamentos Box-Behnken das UAE e SFE (CO<sub>2</sub> puro), todos os ensaios das SFE com cossolvente, PLE e Soxhlet.

#### 4.3.2 Conteúdo fenólico total (CFT)

O CFT foi investigado nos extratos de folhas de *M. aquifolia*, aplicando-se um método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, proposto por Singleton & Rossi (1965) com modificações. O procedimento consistiu na reação composta por 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%), 2,0 mL de uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 7,5% (m/v) e 0,3 mL do extrato (0,25 mg mL<sup>-1</sup>). A solução resultante da mistura foi mantida por 5 min a 50 °C, em banho termostático, em seguida, a absorbância foi medida a 765 nm (Shimadzu, UV-1800, Kyoto, Japão). O CFT de cada extrato foi quantificado por meio de uma curva construída com ácido gálico (5-200 µg mL<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup> = 0,997). O branco foi obtido substituindo-se o volume de amostra por água, mantendo-se as mesmas quantidades dos outros reagentes. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalentes por g de extrato (µg EAG g ext<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.3.3 Atividade antioxidante

##### *Método de eliminação do radical DPPH*

A atividade antioxidante dos extratos foi quantificada pelo método de eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), conforme descrito por Xu & Chang (2007), com algumas modificações. Uma alíquota de 0,2 mL da solução estoque do extrato foi adicionada a 3,8 mL da solução etanólica do radical DPPH (0,1 mM), homogeneizada e mantida em câmara escura por 30 min. A absorbância foi medida a 517 nm (Shimadzu, UV-1800, Kyoto, Japão). Os resultados foram

expressos como equivalentes a micromoles de Trolox (TEQ) por g de extrato ( $\mu\text{mol TEQ g ext}^{-1}$ ), por meio da construção de uma curva de calibração padrão (25 a 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $R^2 = 0,999$ ). As análises foram realizadas em triplicata.

#### *Método de redução do ferro (FRAP)*

O ensaio FRAP (poder antioxidante redutor do ferro ou capacidade redutora do ferro), seguiu a metodologia proposta por Benzie & Strain (1996), com algumas modificações. Uma alíquota de 0,1 mL da solução estoque do extrato foi adicionada a 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 homogeneizada e mantida por 30 min a 37 °C, em seguida, a absorbância foi medida a 593 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  por g de extrato ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g ext}^{-1}$ ), com o auxílio de uma curva de calibração padrão de  $\text{FeSO}_4$  (100 a 2.000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $R^2 = 0,999$ ). As análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.4 Análise estatística**

Os resultados foram tratados estatisticamente e expressos pela média e desvio padrão, quando necessário. A avaliação da influência das variáveis e de suas interações sobre as respostas foram realizadas pela análise de variância unidirecional (ANOVA) e as diferenças significativas foram analisadas pelo teste de Tukey, considerando um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Esse mesmo nível de significância ( $p < 0,05$ ) foi adotado para avaliação dos coeficientes do modelo de regressão. A qualidade do ajuste dos modelos foi avaliada considerando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), teste de Fisher (teste F) e desvio médio absoluto (DMA %). O software Statistica (versão 8.0, StatSoft, Inc., EUA) foi usado para a análise dos dados experimentais.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção, serão apresentadas as caracterizações das folhas de *M. aquifolia* e do leito de partículas. Posteriormente, são apresentados e discutidos os resultados dos efeitos da temperatura e dos solventes nas extrações Soxhlet, efeitos da temperatura, solvente e pressão nas extrações com líquido pressurizado, efeito da temperatura, tempo e potência nas extrações assistidas por ultrassom e por fim os efeitos da temperatura, pressão, tempo e utilização de cosolventes nas extrações supercríticas. Em cada método de extração também é apresentado e discutido o conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos extratos. Em seguida, são apresentados os resultados de caracterização dos extratos quanto à composição química, concentração de vitamina E e Friedelina.

### 5.1 Caracterização das folhas de *M. aquifolia* e leito de extração

Os resultados da caracterização inicial das folhas de *M. aquifolia* quanto à umidade, densidade real e o diâmetro médio e, de densidade aparente e porosidade do leito formado pelas partículas nas extrações supercríticas, são mostrados na Tabela 5.1. Esses fatores são fundamentais para avaliação dos processos de extração. Auxiliam na compreensão da transferência de massa e condições da matéria-prima, entre outros elementos, que possam exercer influência nos procedimentos de extração, tal como, o comportamento e interação do fluido supercrítico com a matéria-prima de estudo.

**Tabela 5.1.** Dados da caracterização da matéria-prima e leito de partículas.

Partículas			Leito	
Umidade (%)	Densidade real (g cm <sup>-3</sup> )	Diâmetro médio (mm)	Densidade aparente (g cm <sup>-3</sup> )	Porosidade (ε)
9,28	1,357	0,954	0,375	0,724

Em geral, na preparação de matérias-primas como as folhas de *M. aquifolia*, os procedimentos de fragmentação e secagem, são utilizados para melhorar a obtenção dos compostos. A taxa de extração é favorecida pela redução no tamanho



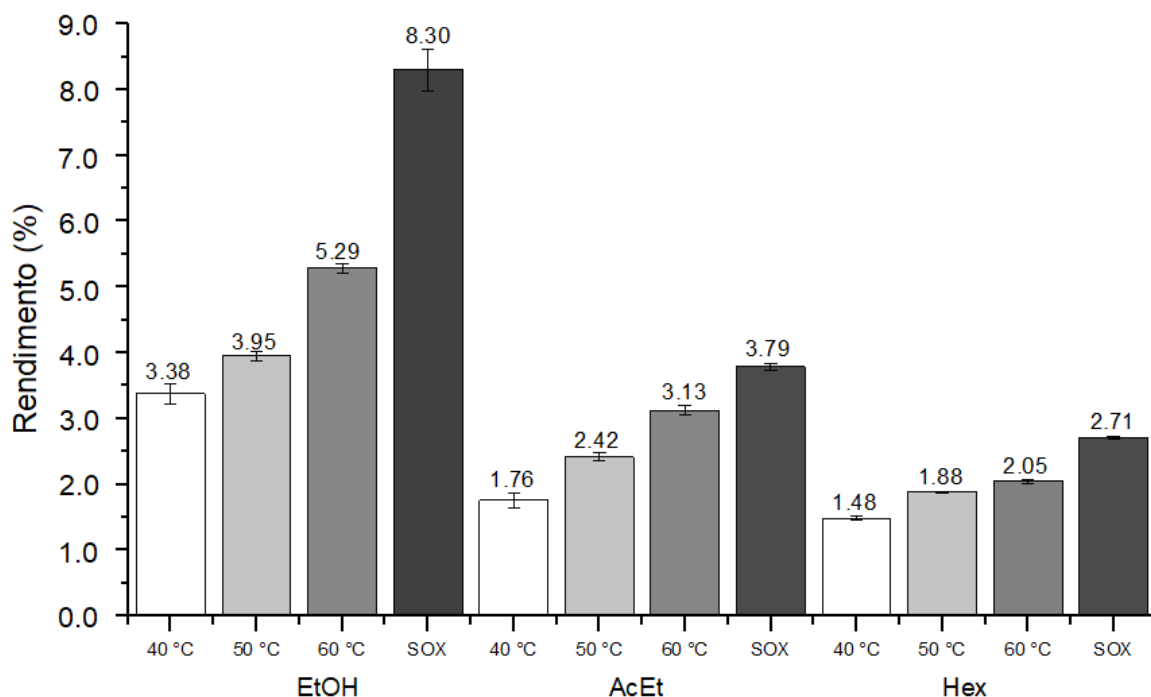
das partículas, em virtude do aumento da área superficial de contato com o solvente. Porém, deve-se estabelecer um tamanho médio de partícula, que forneça uma área superficial satisfatória (ZABOT *et al.*, 2012). A umidade é outro fator que deve ser controlado, dependendo da configuração e da técnica utilizada, a água presente na matriz vegetal compete com o soluto para interagir com o solvente ou pode agir como um facilitador (PEREITA & MEIRELES, 2010), sendo assim é necessário avaliar cada caso, mas geralmente, a secagem da matéria-prima é recomendada a qual deve apresentar um teor de água de entre 4 – 14%.

## **5.2 Obtenção dos extratos**

A obtenção dos extratos e seus compostos bioativos foram investigados através das técnicas de extração Soxhlet (SOX), com líquido pressurizado (PLE), assistido por ultrassom (UAE) e com cossolventes nas extrações com fluido supercrítico (SFE), avaliando a influência de diferentes solventes, sendo eles etanol (EtOH), acetato de etila (AcEt) e n-hexano (Hex), solventes esses com diferentes índices de polaridade 5.2, 4.4 e 0.0, respectivamente.

### **5.2.1 Extração SOX e PLE**

A Figura 5.1 apresenta os rendimentos dos extratos obtidos por extração SOX, onde foi investigada a influência dos solventes EtOH, EtAc e Hex em seus respectivos pontos de ebulição (78, 77 e 69 °C) e a influência da temperatura (40, 50 e 60 °C) nas extrações pressurizadas a 10 MPa.



**Figura 5.1.** Rendimento em extratos brutos de folhas de *M. aquifolia* obtidos pelos métodos Soxhlet (SOX – 360 min) e líquido pressurizado (PLE – 30 min). As barras de erro representam o desvio padrão para os tratamentos.

A eficiência da extração de SOX é dependente da polaridade do solvente (FIGURA 5.1). Os maiores rendimentos em extrato bruto obtidos na extração de SOX foram de 8,30% em peso, quando realizada com o EtOH, 3,79% com EtAc e 2,71% com Hex, indicando uma maior presença de compostos de alta polaridade. Na PLE, os maiores rendimentos observados foram 5,29%, 3,13% e 2,05% com EtOH, EtAc e Hex, respectivamente, todos na temperatura de 60 °C, revelando que a eficiência na obtenção dos extratos das folhas de *M. aquifolia* é dependente da polaridade do solvente e da temperatura de extração (JADHAV *et al.*, 2009).

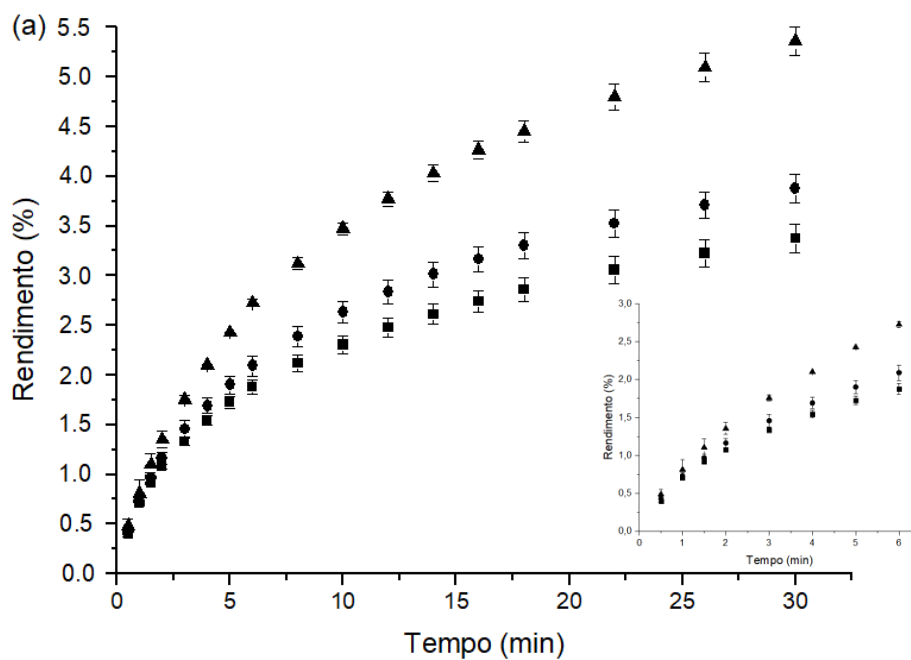
Embora a técnica SOX seja bem estabelecida e apresente ampla aplicação, atingindo os maiores rendimentos com os solventes testados, ainda requer um longo tempo de extração, impactando diretamente no gasto de energia. Este, por sua vez, é agravado pela grande quantidade de solvente utilizado, implicando na necessidade de procedimentos posteriores para sua eliminação. Além disso, a degradação térmica dos compostos é eminente, pois o solvente é mantido próximo ao seu ponto de ebulição por um longo período (ZYGLER *et al.*, 2012; HELENO *et al.*, 2016). Em contrapartida, o PLE com EtOH mostrou-se 12 vezes mais rápido,

consumindo 4 vezes menos solvente, o que permite, neste caso, a obtenção de aproximadamente o dobro do rendimento com três repetições de PLE, em apenas 25% do tempo necessário na SOX (360 min). Esses efeitos positivos são atribuídos à temperatura, que contribui diretamente para a redução do tempo, volume de solventes e energias utilizadas no processo pressurizado (HERREIRO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2021).

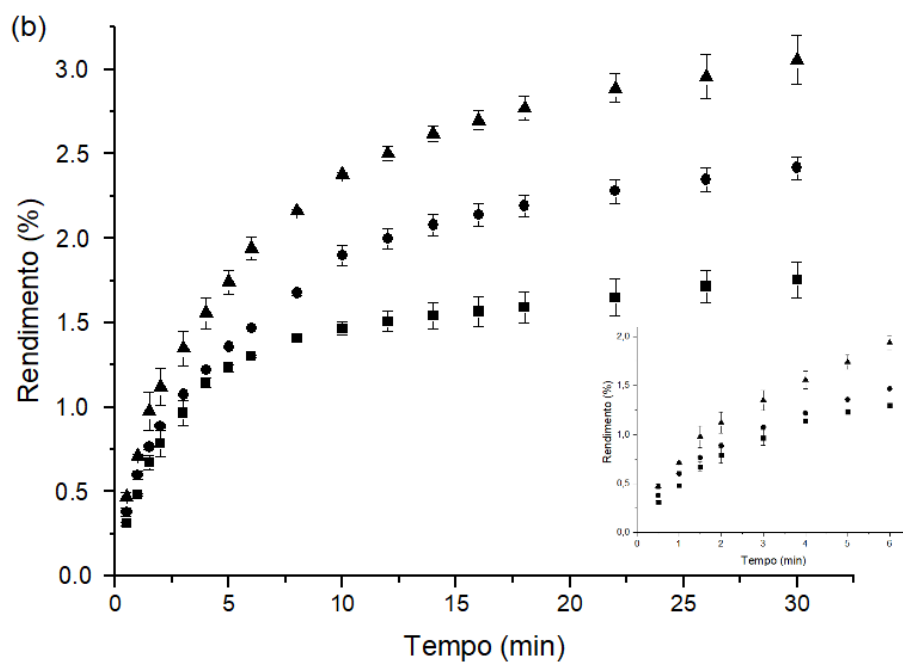
O aumento da temperatura, conforme mencionado anteriormente, influencia a cinética de extração (FIGURAS 5.2 a 5.4) e os rendimentos, devido a uma melhora no umedecimento da biomassa e atenuação da coesão entre matriz e analito, devido ao efeito da redução da viscosidade e tensão superficial do solvente (MENDIOLA *et al.*, 2007).

As vantagens do PLE em relação à extração SOX também são atribuídas à pressurização do sistema, que mantém o solvente na fase líquida no leito de extração, mesmo em temperaturas acima do seu ponto de ebulição. Esta variável contribui diretamente para as propriedades de transporte do solvente, proporcionando maior estabilidade ao processo, reduzindo distúrbios que inibem a interação entre o solvente e o analito, geralmente causados pela existência de ar nos poros da biomassa (TENA, 2019). No modo dinâmico, conforme utilizado nos experimentos, o solvente é bombeado de forma ininterrupta através do leito. Com isso, há uma melhora da taxa de extração pela remoção constantemente do solvente saturado do interior do extrator, colaborando para um maior contato entre o solvente fresco e a matriz sólida (MENDIOLA *et al.*, 2007).

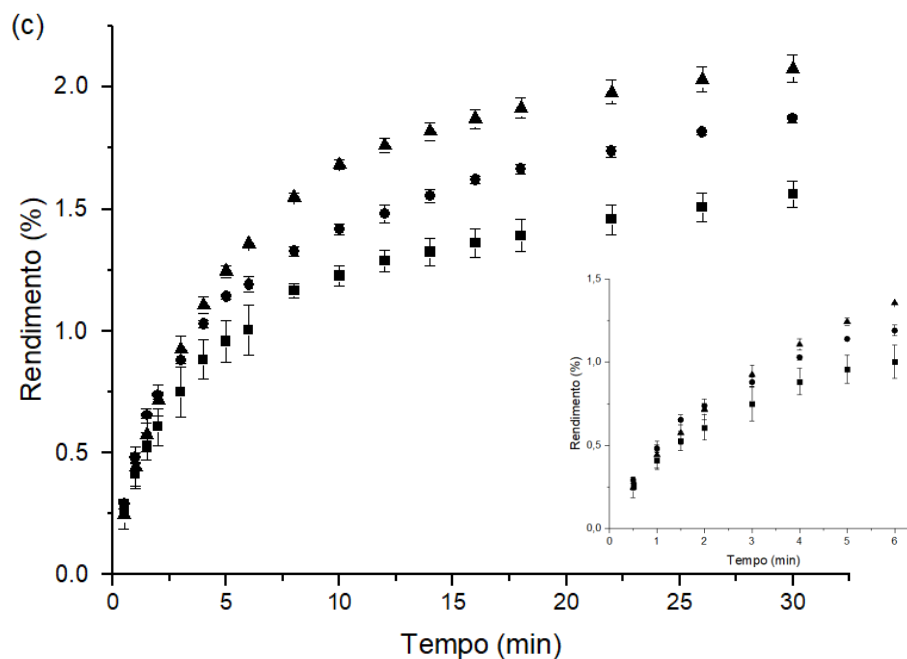
Duas etapas de extração podem ser identificadas na Figura 5.2, 5.3 e 5.4. Primeiramente, o processo de lavagem das partículas é facilitado, transcorrendo rapidamente em razão da maior disponibilidade de soluto nas superfícies das partículas. Com o andamento da extração, ocorre uma redução gradativa do soluto de fácil acesso, cedendo lugar ao processo de extração lento, controlado pela difusão até o equilíbrio. Essas duas etapas são identificadas pela inclinação mais acentuada (lavagem) e declínio da curva de extração (difusão).



**Figura 5.2.** Perfil cinético para o rendimento em extrato bruto das folhas de *M. aquifolia* obtidas com EtOH pressurizado a 40(■), 50 (●) e 60 °C (▲). As barras de erro representam o desvio padrão para as réplicas.



**Figura 5.3.** Perfil cinético para o rendimento em extrato bruto das folhas de *M. aquifolia* obtidas com AcEt pressurizado a 40(■), 50 (●) e 60 °C (▲). As barras de erro representam o desvio padrão para as réplicas.



**Figura 5.4.** Perfil cinético para o rendimento em extrato bruto das folhas de *M. aquifolia* obtidas com n-hexano pressurizado a 40(■), 50 (●) e 60 °C (▲). As barras de erro representam o desvio padrão para as réplicas.

### 5.2.2 Extração assistida por ultrassom (UAE)

Priorizando o rendimento, o EtOH foi escolhido como solvente para os ensaios das UAE, em consonância com os resultados obtidos nas extrações SOX e PLE. A matriz do planejamento experimental Box-Behnken é mostrada na Tabela 5.2, com os valores reais das variáveis independentes temperatura, amplitude da sonicação, razão solvente/biomassa e o percentual do rendimento (variável independente) obtido no processo ao final de 30 min.

**Tabela 5.2.** Matriz do planejamento Box-Behnken e rendimentos em extrato (% em peso) das folhas de *M. aquifolia* obtidas nas UAE.

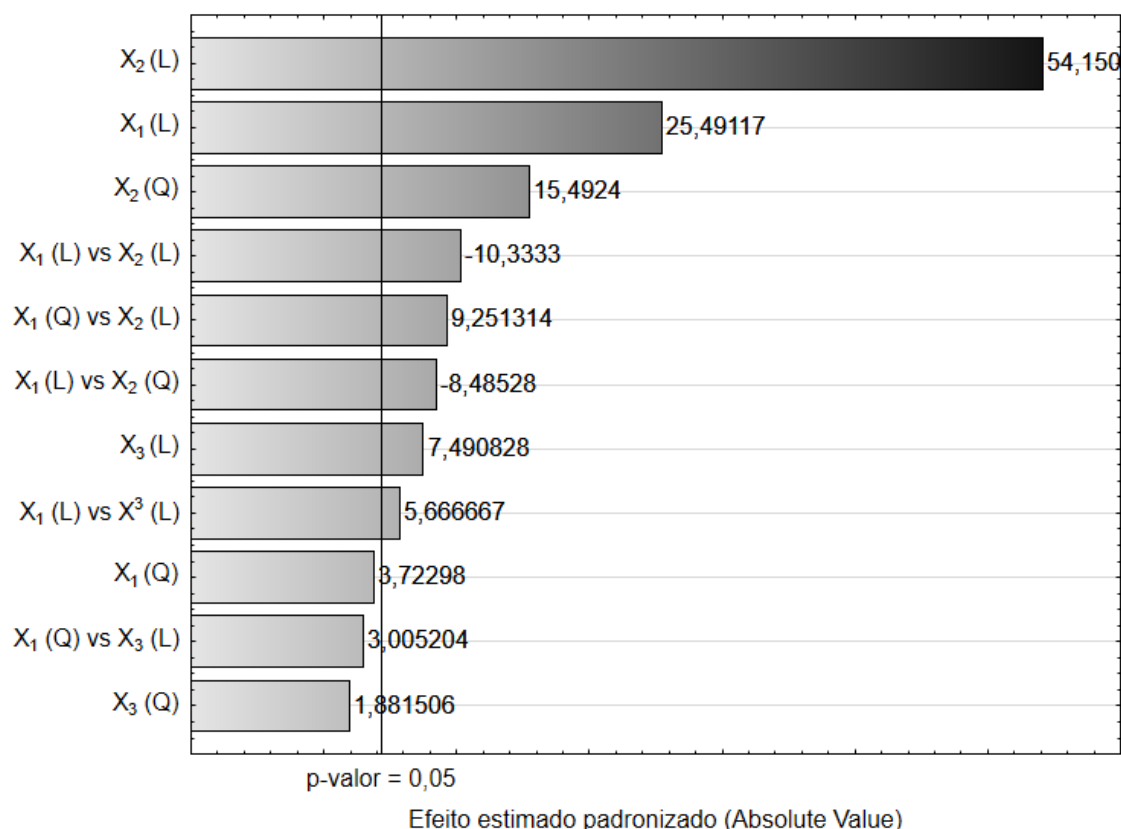
Ensaio	Temperatura (°C)	Amplitude (%)	Razão solvente/folha (mL g <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)
1	40	20	15	2,77
2	60	20	15	4,77
3	40	80	15	5,55
4	60	80	15	6,31

5	40	50	10	4,99
6	60	50	10	5,31
7	40	50	20	4,90
8	60	50	20	5,90
9	50	20	10	3,12
10	50	80	10	6,19
11	50	20	20	3,75
12	50	80	20	6,57
13*	50	50	15	5,45 ± 0,05*

\*Média ± desvio padrão para triplicata no ponto central.

A combinação dos parâmetros temperatura 50 °C, 80% da amplitude da sonicação e a razão solvente/folha de 20 mL g<sup>-1</sup>, permitiu atingir um rendimento máximo de 6,57% em peso. Este resultado foi 24,2% mais eficiente do que as extrações com o solvente pressurizado e correspondeu a apenas 79,2% do rendimento obtido na extração SOX. No entanto, o tempo, a temperatura e a quantidade de solvente por grama de folha, exigidos nas UAE foram menores quando comparados as outras técnicas avaliadas, evidenciando os benefícios da utilização do ultrassom para a obtenção dos extratos de matrizes vegetais (ALBAHARI *et al.*, 2018).

As estimativas dos efeitos principais e interações entre as variáveis adotadas no planejamento experimental Box-Behnken, em relação a obtenção de extratos de folhas de *M. aquifolia*, são apresentadas na Figura 5.5, onde (L) representa o termo linear e (Q) o termo quadrático do modelo. A análise estatística foi realizada considerando um intervalo de confiança de 95% (p <0,05).



**Figura 5.5.** Gráfico de Pareto evidenciando os efeitos mais pronunciados das variáveis temperatura ( $X_1$ ), amplitude ( $X_2$ ) e razão solvente/folha ( $X_3$ ) sobre rendimento em extrato nas UAE.

O modelo estatístico estabelecido a partir dessas variáveis, que estima o percentual de extrato obtido no processo UAE, é apresentado na Equação 30, considerando apenas os termos significativos ( $p < 0,05$ ).

$$\text{Rend.(\%)} = 5,01 + 0,57X_1 + 1,21X_2 + 0,18X_3 - 0,31X_1X_2 + 0,17X_1X_3 + 0,24X_2^2 - 0,18X_1X_2^2 + 0,20X_1^2X_2 \quad (30)$$

A ANOVA para o modelo quadrático é apresentada na Tabela 5.3. A viabilidade e a significância estatística de cada efeito foram determinadas pela probabilidade  $p$  ( $p$ -valor) e teste de Fisher (teste F), portanto, quanto maior a magnitude do valor F e quanto menor o  $p$ -valor, mais significativo é o coeficiente. A qualidade do ajuste foi avaliada pelo  $R^2$ . Sendo assim, os dados sugerem que o modelo é significativo e adequado para descrever os dados experimentais, uma vez que apresentou valor  $p < 0,05$ , atestado pela ausência de falta de ajuste (valor de  $p > 0,05$ ). O  $R^2$  foi de 0,9965, indicando que 99,6% das variações na resposta são

causadas pelas variáveis independentes do processo. A viabilidade do modelo também foi confirmada pelo teste F, no qual a condição de  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ ) foi satisfeita (calculado a partir de ANOVA e dados tabulados, respectivamente). Ainda, para que uma regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins predição, o valor da razão entre  $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$  deve ser exibir um valor no mínimo de três ou quatro, conforme preconizado por Barros Neto *et al.*, (1996) e Box *et al.*, (1978), assim, a relação observada foi de 23,71 evidenciando que o modelo também é preditivo.

**Tabela 5.3.** ANOVA para o ajuste aos dados experimentais das UAE.

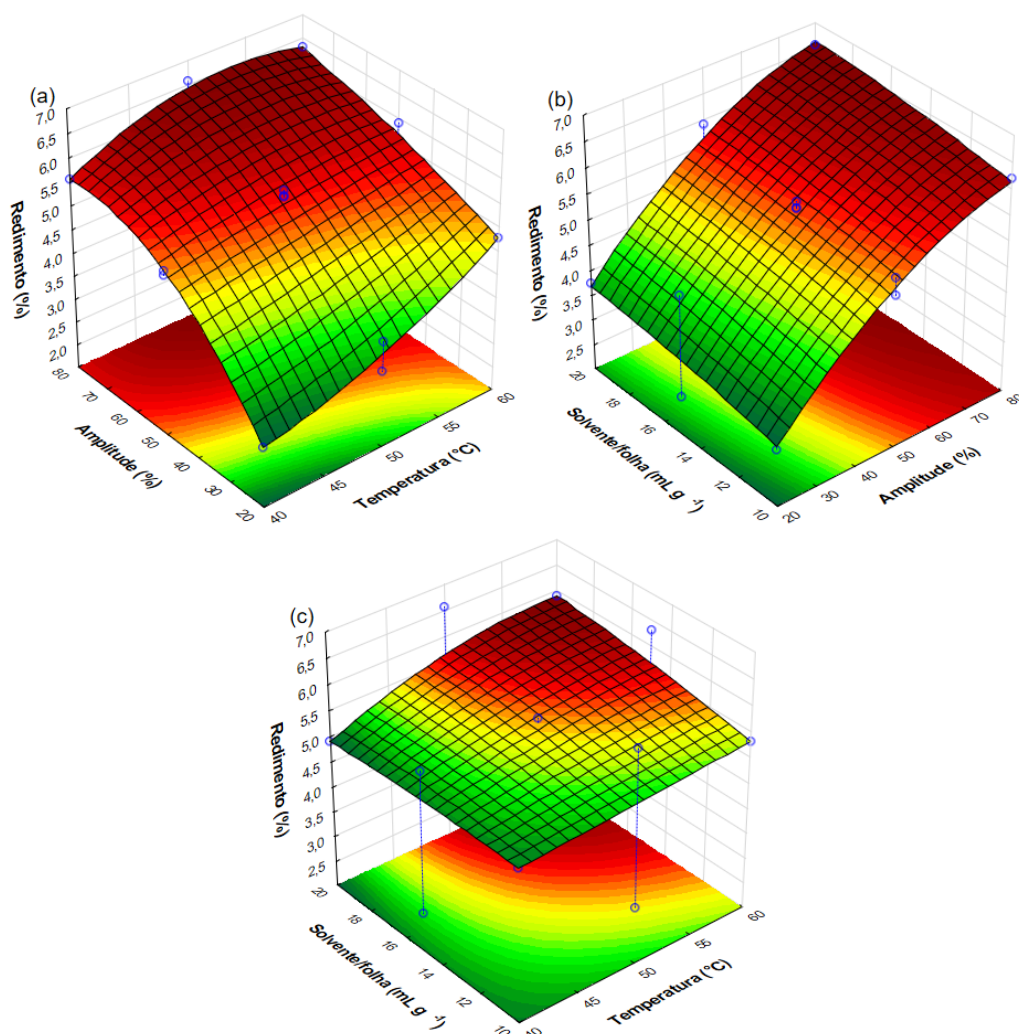
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	p-valor
Modelo	17,384	11	1,580	207,719	0,0463
Falta de ajuste	0,016	1	0,016	4,34	0,1726
Erro puro	0,007	2	0,004		
Total SQ	17,407	14			
R <sup>2</sup>	0,9987				
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	0,9939				

GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; QM: quadrado médio; F: estatística F; F<sub>tab</sub> = 8,76.

Os gráficos de superfície de resposta e regressão (FIGURA 5.6) ilustram os efeitos das variáveis independentes no rendimento das UAE e ajudam a interpretar as condições ideais para uma resposta otimizada. A Figura 5.6(a) demonstra os efeitos dos parâmetros mais significativos, temperatura e amplitude, conforme o gráfico de Pareto (FIGURA 5.5). Os maiores rendimentos são a repercussão da combinação dos efeitos mecânicos da cavitação e efeitos térmicos sob a matriz e o solvente. A fragmentação da matriz sólida, promovida pelo colapso das bolhas de cavitação, reduz os caminhos de difusão, e os efeitos térmicos, por sua vez, melhoram a umectação da biomassa pela atenuação da tensão superficial e viscosidade do solvente, o que favorece a eluição e solubilidade dos analitos (SAMARAM *et al.*, 2015; CHEMAT *et al.*, 2017b; FERARSA *et al.*, 2018). A proporção solvente/folha estabelece um gradiente de concentração na solução resultante. Quanto maior for esse gradiente, mais rápida a taxa de transferência de



massa é alcançada, conseqüentemente, mais rápido o equilíbrio é atingido (HELENO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018). Entretanto, a utilização de uma razão solvente/folhas inferior a um valor ótimo conduz a uma extração incompleta, por outro lado, uma razão superior ao valor ideal leva a um aumento no consumo de solvente (PALSİKOWSKI *et al.*, 2020).



**Figura 5.6.** Superfícies de resposta para o rendimento em extrato de *M. aquifolia*. Efeitos correlativos de (a) amplitude e temperatura; (b) razão solvente/folha e amplitude; e (c) razão solvente/folha e temperatura.

A Figura 5.6(c) exemplifica os efeitos da temperatura e a relação solvente/folha, anteriormente referidos. Sua tendência a um plano é explicada pela interação linear significativa entre as variáveis ( $X_1$ - $X_3$ ,  $p < 0,05$ ). O rendimento também aumentou com o aumento das variáveis citadas, porém, seu efeito foi

menos efetivo para uma amplitude fixa, o que evidencia a significância do tratamento ultrassônico, ou seja, o efeito da amplitude quando relacionado é mais pronunciado, corroborado pela curvatura mais acentuada da superfície (FIGURA 5.6a e 5.6b). Porém, quando essa variável não está relacionada, a superfície de resposta tende a ser mais achatada, efeitos esses já representados no gráfico de Pareto.

### 5.2.3 Estimativa de CFT, AA<sub>DPPH</sub> e AA<sub>FRAP</sub> para as extrações SOX e PLE

Os resultados do CFT e AA<sub>DPPH</sub> e AA<sub>FRAP</sub> para os métodos de extração SOX e PLE são apresentados na Tabela 5.4. A extração de compostos fenólicos depende de vários fatores como a presença de substâncias interferentes, o método de extração e suas variáveis, entre outros. Estes, devem ser avaliados para se conseguir uma extração aprimorada, visando a maior preservação dos constituintes fenólicos, essenciais para a atividade antioxidante dos produtos naturais (CHIAPETTI *et al.*, 2019).

O CFT foi maior nos extratos obtidos com EtOH a 40 °C com o solvente pressurizado (325 mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>), diminuindo gradativamente com o aumento da temperatura. Os resultados também demonstram a afinidade dos compostos fenólicos pelo solvente de maior polaridade utilizado, em ambas as técnicas o CFT reduziu com o índice de polaridade dos solventes avaliados (EtOH > AcEt > Hex). Com exceção dos casos onde as medias não apresentaram diferenças significativas, o CFT na extração SOX foram maiores que as PLE, quando realizadas AcEt (SOX<sub>AcEt</sub> > PLE<sub>AcEt</sub>). Esse menor rendimento na PLE, pode ser atribuído ao menor tempo de contato entre a matéria-prima e o solvente em questão, assim, não sendo o suficiente para garantir uma efetiva extração dos compostos presentes.

Na PLE, o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C, revelou a termossensibilidade do conteúdo fenólico. Segundo Mokrani & Madani (2016), altas temperaturas (>60 °C) podem contribuir para degradação do conteúdo fenólico. De forma oposta, Mendoza *et al.* (2017), relatam que o aumento de temperatura favorece a extração de compostos fenólicos do resíduo de juçara, onde o incremento da temperatura de extração de 60 para 80 °C, foi mais efetivo na extração do CFT, quando comparado a elevação da temperatura de 40 para 60 °C.

Desta forma, o comportamento dos compostos fenólicos na extração com solventes pressurizados pode variar, e outros aspectos devem ser considerados como o tipo, origem e a estabilidade dos compostos presentes, assim como, as variações dentro da técnica, que podem influenciar na recuperação (SOUZA *et al.*, 2021).

**Tabela 5.4.** CFT e AA<sub>DPPH</sub> e AA<sub>FRAP</sub> para os extratos das folhas de *M. aquifolia* obtidos pelos métodos SOX e PLE com diferentes solventes.

			CFT	AA <sub>DPPH</sub>	AA <sub>FRAP</sub>
Solvente	T (°C)	(mg EAG g <sub>ext.</sub> <sup>-1</sup> )	(µmol TEQ g <sub>ext.</sub> <sup>-1</sup> )	(µmol Fe <sup>2+</sup> g <sub>ext.</sub> <sup>-1</sup> )	
PLE	EtOH	40	325,52 ± 2,43 <sup>a</sup>	1014,01 ± 23,8 <sup>a</sup>	2590,60 ± 315,74 <sup>a</sup>
		50	275,40 ± 6,20 <sup>b</sup>	857,8 ± 12,40 <sup>b</sup>	2578,18 ± 98,34 <sup>a</sup>
		60	221,37 ± 0,94 <sup>c</sup>	670,35 ± 37,19 <sup>c</sup>	2230,35 ± 172,88 <sup>a</sup>
SOX	± 78	237,40 ± 1,35 <sup>c</sup>	727,78 ± 13,39 <sup>d</sup>	2529,52 ± 10,35 <sup>a</sup>	
PLE	EtAc	40	99,16 ± 2,43 <sup>b</sup>	163,04 ± 36,70 <sup>ab</sup>	894,94 ± 108,70 <sup>ab</sup>
		50	86,50 ± 1,89 <sup>c</sup>	109,48 ± 7,93 <sup>b</sup>	766,58 ± 5,18 <sup>b</sup>
		60	77,47 ± 1,75 <sup>c</sup>	180,89 ± 20,83 <sup>ab</sup>	957,05 ± 27,95 <sup>ab</sup>
SOX	± 77	112,40 ± 1,48 <sup>a</sup>	250,22 ± 13,39 <sup>a</sup>	1175,48 ± 2,07 <sup>a</sup>	
PLE	Hex	40	66,82 ± 0,54 <sup>a</sup>	48,49 ± 14,38 <sup>a</sup>	547,11 ± 3,11 <sup>a</sup>
		50	65,34 ± 0,67 <sup>a</sup>	38,07 ± 7,93 <sup>a</sup>	486,04 ± 4,14 <sup>b</sup>
		60	62,37 ± 0,40 <sup>b</sup>	27,16 ± 2,98 <sup>a</sup>	526,41 ± 3,11 <sup>ab</sup>
SOX	± 68	64,94 ± 0,27 <sup>ab</sup>	56,82 ± 9,92 <sup>a</sup>	567,82 ± 13,46 <sup>a</sup>	

Médias que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes entre si para o mesmo solvente, no intervalo de confiança de 95%.

Pode-se observar um efeito antagônico na temperatura na PLE, no qual, um aumento na temperatura de extração contribuiu para maiores rendimentos em extratos brutos (item 5.3.1), mas, reduziu o CFT, portanto, a redução da temperatura implica em menores rendimentos, e os compostos fenólicos são preservados. De acordo com Al-Dhabi *et al.* (2017), a temperatura é um fator crítico na extração de compostos fenólicos, por um lado, favorece o rendimento da extração, por outro, promove a oxidação dos compostos extraídos. Assim, a exposição à altas temperaturas por longos períodos de tempo, tem o potencial de perturbar a composição química dos extratos, alterando sua qualidade. Desta forma, a extração com solventes orgânicos em tempo reduzido e temperaturas

moderadas, abaixo do ponto de ebulição do solvente, são mais favoráveis para a qualidade dos extratos, bem como, para um processo de excelência (SOUZA *et al.*, 2021).

Os extratos de *M. aquifolia* obtidos pelos métodos SOX e PLE também foram caracterizados quanto à sua atividade antioxidante, avaliando-se a capacidade de eliminação dos radicais livres pelo método DPPH e a propensão em reduzir o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ a  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, método FRAP. Os testes citados são amplamente utilizados para avaliação da capacidade antioxidante de diversos extratos de produtos naturais (MOKRANI & MADANI, 2016).

Os resultados da atividade antioxidante sugerem uma ligação com a fração fenólica, uma vez que os valores mais relevantes de  $\text{AA}_{\text{DPPH}}$  e  $\text{AA}_{\text{FRAP}}$ , 1014,01  $\mu\text{mol TEQ g}_{\text{ext}}^{-1}$  e 2590,60  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{g}_{\text{ext}}^{-1}$ , respectivamente, foram determinados nos extratos com maior CFT, extraído a 40 °C. Essa conjectura é corroborada por Chiapetti *et al.* (2019), que relataram que a atividade antioxidante das frações etanólicas brutas e purificadas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolia*, determinada pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS, foram semelhantes, com os maiores valores observados para os extratos obtidos em baixas temperaturas de extração.

Normalmente, os extratos etanólicos de *M. aquifolia* demonstram maior atividade antioxidante do que os extratos aquosos, em função de sua composição ser mais variada em metabólitos secundários, capazes de capturar diferentes espécies reativas (VELLOSA *et al.*, 2007). A atividade antioxidante em porcentagem do extrato aquoso e etanólico (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *M. ilicifolia* (76,05%) e *M. aquifolia* (83,08%) são comparáveis aos de ácido ascórbico (91,63%), ácido gálico (91,10) e rutina (80,34%) (HAIDA *et al.*, 2012).

#### 5.2.4 Estimativa do CFT, $\text{AA}_{\text{DPPH}}$ e $\text{AA}_{\text{FRAP}}$ para as UAE

As estimativas de CFT,  $\text{AA}_{\text{DPPH}}$  e  $\text{AA}_{\text{FRAP}}$  para os extratos obtidos com EtOH assistido por ultrassom são mostradas na Tabela 5.5. Nas UAE, o maior CFT (402,33 mg EAG  $\text{g}_{\text{ext}}^{-1}$ ) foi obtido na temperatura de 50 °C, na menor amplitude de sonicação e razão solvente/folha, 20% e 10 mL  $\text{g}^{-1}$ , respectivamente, com atividade antioxidante estimadas nessas condições em 576,52  $\mu\text{mol TEQ g}_{\text{ext}}^{-1}$  (DPPH) e

3775,90  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}_{\text{ext}}^{-1}$  (FRAP). Porém, a relação previamente estabelecida nas extrações de SOX e PLE entre o CFT e a atividade antioxidante, não foi observada, uma vez que os extratos com menor TPC apresentaram maior atividade antioxidante. Essa ocorrência pode ser atribuída ao fato de o poder antioxidante não depender somente da composição fenólica, mas também do sinergismo entre os diversos constituintes químicos dos extratos naturais (HAIDA *et al.*, 2012). Isso pode ser atestado pela resposta  $AA_{\text{FRAP}} \gg AA_{\text{DPPH}}$ , em decorrência da sonicação, que pode ter favorecido a extração de outros componentes que manifestam maior tendência a doar elétrons do que átomos de hidrogênio, favorecendo a redução dos complexos  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ em vez de eliminar o radical DPPH.

**Tabela 5.5.** CFT e  $AA_{\text{DPPH}}$  e  $AA_{\text{FRAP}}$  dos extratos das folhas de *M. aquifolia* obtidos nas UAE utilizando EtOH como solvente.

Ensaio				TPC	DPPH	FRAP
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	(mg GAE g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )	( $\mu\text{mol TEQ g}_{\text{ext}}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}_{\text{ext}}^{-1}$ )
1	40	20	15	359,48	702,48	3881,49
2	60	20	15	354,90	396,01	3212,75
3	40	80	15	341,69	644,96	3978,80
4	60	80	15	330,37	542,80	3792,47
5	40	50	10	370,26	697,52	4237,60
6	60	50	10	312,86	486,27	3635,12
7	40	50	20	376,19	540,82	3839,46
8	60	50	20	305,58	554,70	3465,55
9	50	20	10	402,33	576,52	3775,90
10	50	80	10	351,39	559,66	3939,46
11	50	20	20	379,69	557,68	3761,41
12	50	80	20	323,37	518,01	3809,03
13	50	50	15	386,61 $\pm$ 2,11*	649,25 $\pm$ 16,22*	3966,86 $\pm$ 16,07*

\*Desvio padrão para a média da triplicata no ponto central; X<sub>1</sub> – Temperatura; X<sub>2</sub> – Amplitude; X<sub>3</sub> – Razão sólido/líquido

Uma melhor compreensão dos efeitos das variáveis envolvidas nas respostas CFT,  $AA_{\text{DPPH}}$  e  $AA_{\text{FRAP}}$  pode ser observada na Tabela 5.6, na qual são apresentados os resultados estatísticos, exibindo os valores da estatística F

( $F_{\text{calculado}}$ ) e o  $p$ -valor de cada fator, quando significativo, incluindo as interações. A Figura 5.7, por sua vez, ilustra graficamente os efeitos das variáveis sobre essas respostas.

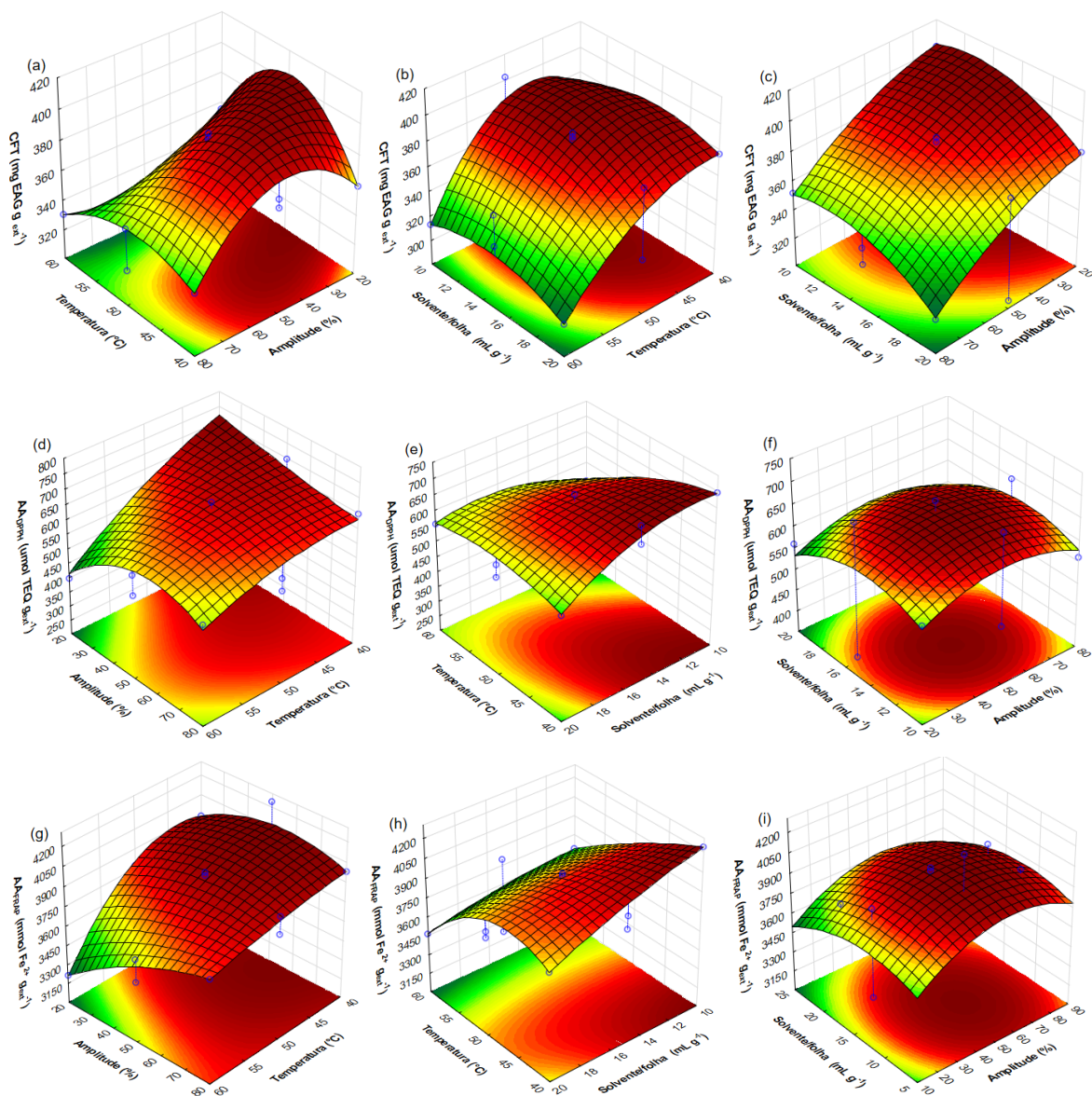
**Tabela 5.6.** Valor estatístico F e  $p$ -valor para as respostas TPC, AA<sub>DPPH</sub> e AA<sub>FRAP</sub> para os extratos de *M. aquifolia*, obtidos pela técnica dos UAE com etanol.

Variáveis	CFT		AA <sub>DPPH</sub>		AA <sub>FRAP</sub>	
	$F_{\text{calc}}$	$p$ -valor	$F_{\text{calc}}$	$p$ -valor	$F_{\text{calc}}$	$p$ -valor
Modelo	164,28	0,0046	14,44	0,0474	53,67	0,0441
X <sub>1</sub> (L)	190,50	0,0052	130,44	0,0076	930,98	0,0011
X <sub>2</sub> (L)	274,68	0,0036	NS	NS	316,02	0,0031
X <sub>3</sub> (L)	21,24	0,0440	NS	NS	211,45	0,0047
X <sub>1</sub> (L) vs X <sub>2</sub> (L)	NS	NS	26,44	0,0358	150,09	0,0066
X <sub>1</sub> (L) vs X <sub>3</sub> (L)	NS	NS	32,11	0,0298	33,69	0,0140
X <sub>2</sub> (L)vs X <sub>3</sub> (L)	NS	NS	NS	NS	57,64	0,0170
X <sub>1</sub> (Q)	546,02	0,0018	NS	NS	183,38	0,0054
X <sub>2</sub> (Q)	39,91	0,0241	20,91	0,0446	118,92	0,0031
X <sub>3</sub> (Q)	106,42	0,0093	22,48	0,0417	NS	NS
X <sub>1</sub> (L) vs X <sub>2</sub> (Q)	234,38	0,0042	NS	NS	NS	NS
X <sub>1</sub> (Q) vs X <sub>2</sub> (L)	78,64	0,0125	NS	NS	NS	NS
X <sub>1</sub> (Q) vs X <sub>3</sub> (L)	45,34	0,0213	NS	NS	57,64	0,0284
Falta de ajuste	NS	NS	NS	NS	NS	NS
R <sup>2</sup>	0,9983		0,9629		0,9949	
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	0,9923		0,8962		0,9764	

X<sub>1</sub> – Temperatura; X<sub>2</sub> – Amplitude; X<sub>3</sub> – Razão solvente/folha; NS – não significativo ( $p > 0,05$ ). (L) – termo linear e (Q) – termo quadrático do modelo. F: statistical F;  $F_{\text{tab}} = 8,76$  (TPC and FRAP);  $F_{\text{tab}} = 3,48$  (DPPH).

A partir da ANOVA, a viabilidade dos modelos pode ser verificada pelo teste F, no qual a condição  $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$  foi satisfeita para todas as variáveis dependentes, assim, é possível afirmar que os modelos são válidos e seus parâmetros se ajustam adequadamente aos dados experimentais, além ser preditivo com a razão calculada entre  $F_{\text{cal}} / F_{\text{tab}} > 4$ . Além disso, esse detalhe pode ser atestado pela ausência de falta de ajuste do modelo ( $p$ -valor  $> 0,05$ ), pela significância da

regressão ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) e pelos altos valores de  $R^2$  e  $R^2_{ajustado}$ , que explicam mais de 90% das variações nos dados experimentais.



**Figura 5.7.** Superfície de resposta para CFT (a - c), AA<sub>DPPH</sub> (d - f) e AA<sub>FRAP</sub> (g - i). Efeitos correlativos da amplitude e temperatura (a, d, g); efeitos correlativos da razão solvente/folhas e temperatura do solvente (b, e, h) e os efeitos correlativos da razão solvente/folhas e amplitude (c, f, i).

Sabe-se que a temperatura é um fator crítico nas extrações, acelerando e desencadeando diversas reações, da mesma maneira que, o poder de sonicação

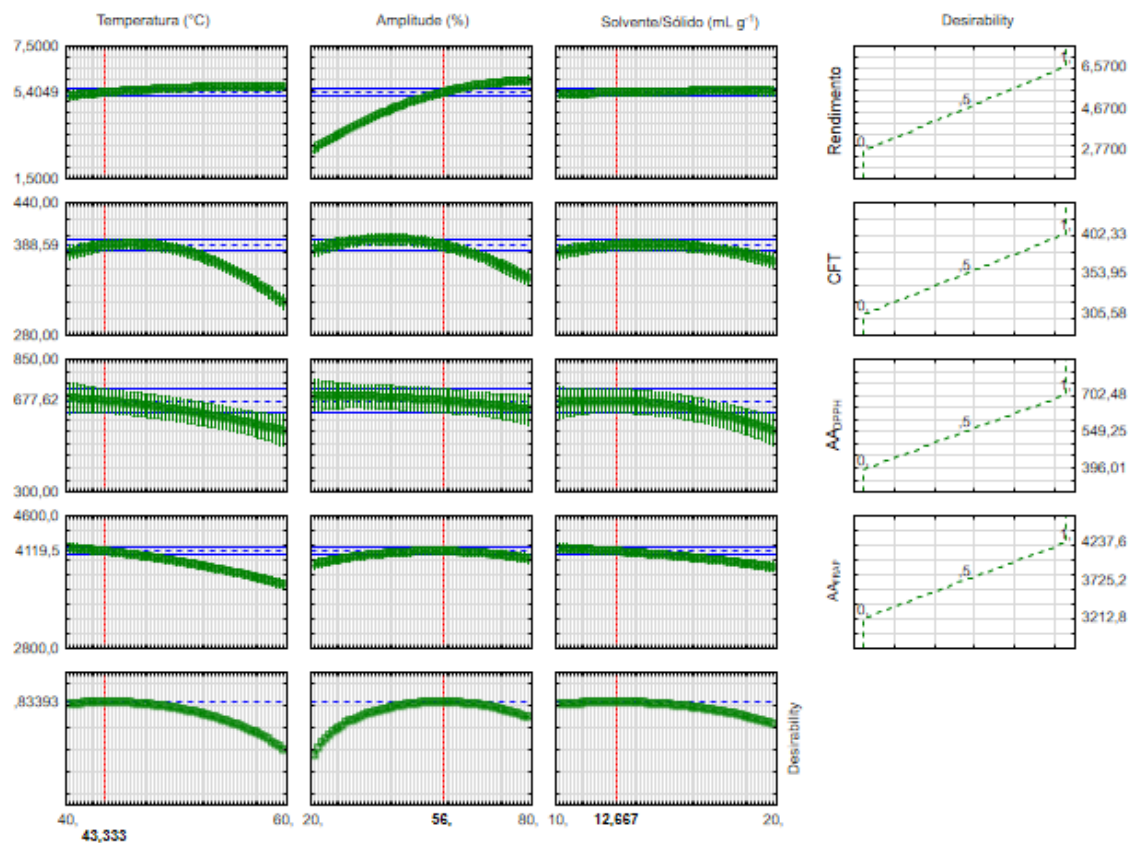
também é um parâmetro importante para melhorar a eficiência de extração de compostos fenólicos. As superfícies de resposta a, b, c, e, g e h (FIGURA 5.7), relacionadas aos efeitos correlativos da temperatura e amplitude e os efeitos correlativos da temperatura e razão solvente/folha, evidenciam a sensibilidade dos compostos extraídos à temperatura, visto que, as respostas de CFT e  $AA_{DPPH}$  foram reduzidas quando a temperatura de extração aumentou de 40 para 60 °C e a amplitude de 20 para 80%. Este aumento de temperatura e amplitude, quando associado ao tempo de extração (30 min), pode ter contribuído para diversos fatores restritivos, como a intensificação e/ou restrição de reações sonoquímicas, polimerização e/ou despolimerização, ruptura de ligações, intensificação de interação indesejada de compostos extraídos e produção de agentes oxidantes. Fatores estes, que contribuem para degradação dos compostos fenólicos, limitando sua capacidade antioxidante (CHEMAT *et al.*, 2011; TIWARI, 2015; AL-DHABI *et al.*, 2017).

A proporção de solvente/folha, influencia o rendimento em compostos fenólicos, como mencionado anteriormente, e estabelece um gradiente de concentração entre o interior das células vegetais e o solvente externo, acelerando o processo de extração. Em concordância com o pressuposto, os dados demonstram um pequeno aumento do CFT, quando o volume de solvente foi de 10 para 15 mL g<sup>-1</sup>, reduzindo em seguida, quando o volume foi ajustado para 20 mL g<sup>-1</sup>. O mesmo fato é observado quando a atividade antioxidante é considerada, onde é possível observar os maiores valores em volumes de solventes inferiores a 15 mL g<sup>-1</sup>. Esses dados, também corroboram com as afirmações anteriores de que parte da atividade antioxidante dos extratos vegetais é atribuída a presença dos compostos fenólicos, visto que,  $AA_{DPPH}$  exibiu um comportamento semelhante ao CFT, reduzindo na razão de 20 mL g<sup>-1</sup>. Portanto, o excesso de solvente não foi capaz de aumentar o percentual de compostos fenólicos, resultando apenas no desperdício de solventes/custos (WANG *et al.*, 2018).

Nas UAE, como no PLE, pode-se observar um efeito antagônico entre o rendimento e a qualidade dos extratos, relacionada ao CFT e  $AA_{DPPH}$  e  $AA_{FRAP}$ . Contudo, os parâmetros de temperatura, tem o poder de sonicação e a relação solvente/sólido devem ser controlados dentro de uma faixa adequada, para



favorecer a obtenção do melhor produto, com rendimento máximo. Para a extração do conteúdo fenólicos das folhas de *M. aquifolia*, os dados sugerem que as condições mais moderadas, são mais aconselháveis para preservar os compostos fenólicos extraídos e a atividade antioxidante dos extratos. A definição de uma condição ideal que favoreça o máximo de cada resposta pode ser obtida a partir da função desejabilidade (FIGURA 5.8) do Software Statistica. Essa função define a conveniência geral para todas as variáveis dependentes (desejabilidade global %) a partir da média geométrica da conveniência das funções individuais de cada resposta em função das variáveis independentes, dentro dos níveis adotados. Assim, a desejabilidade global foi estimada em 83% entre as variáveis respostas, para as condições operacionais de 43,3 °C, 56% de amplitude e 12,7 mL g<sup>-1</sup>.



**Figura 5.8.** Perfis para valores preditos e a desejabilidade global em função das variáveis independentes na extração assistida por ultrassom.

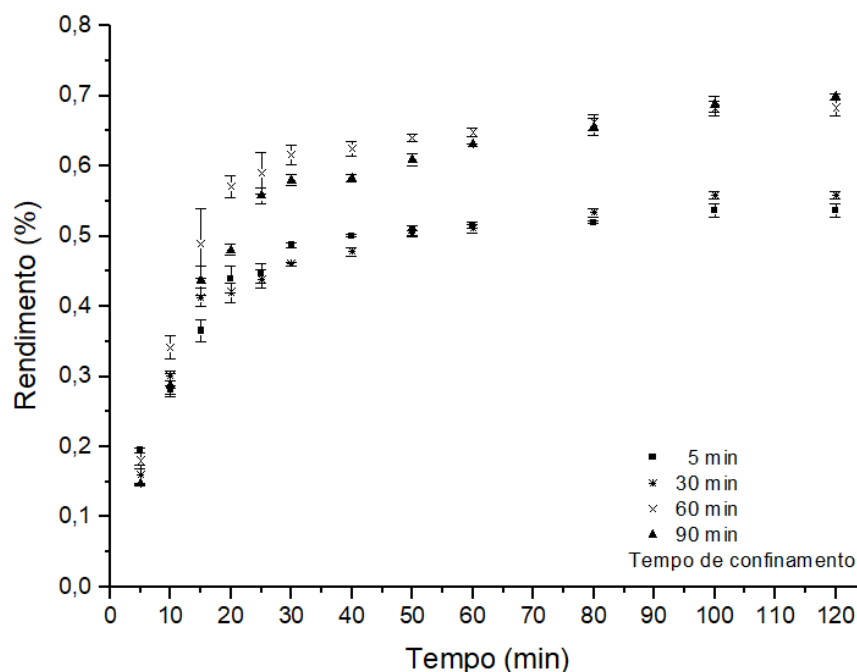
### 5.2.5 Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico

#### *Tempo de extração estática*

Inicialmente, foi averiguado a influência do tempo de extração estática (tempo de confinamento) no rendimento em extratos das folhas de *M. aquifolia*. A definição de um tempo ideal para a etapa inicial de extração estática tem por finalidade favorecer uma maior interação solvente/soluto, promovendo solubilização da fração de soluto mais suscetível, saturando o solvente contido no leite antes do início do período de extração dinâmica, no qual, o tempo de interação entre solvente e matriz é reduzido. As extrações foram conduzidas primeiramente nos tempos de 5, 30, 60 e 90 min de extração estática, seguido de extração dinâmica até que se observa-o equilíbrio na extração, realizadas nas condições do ponto central do planejamento (50 °C, 250 bar e 4 mL min<sup>-1</sup>).

As curvas cinéticas para as avaliações dos efeitos do tempo de confinamento são apresentadas na Figura 5.9. O comportamento cinético resultante, demonstrou que os rendimentos alcançados nos tempos de 5 e 30 min foram similares ente sí, o mesmo fato foi observado para os tempos de 60 e 90 min. Com base nesses resultados, o tempo de 60 min de extração estática foi definido como padrão para prosseguir com as demais extrações, visto que, os tempos de inferiores ( $t_{\text{estático}} < 60$  min) não foram suficientes para atingir uma maior solubilização e saturação do leite e, tempos superiores não proporcionaram maiores rendimentos.

No fluido supercrítico, a solubilidade pode ser equilibrada e então não aumenta, se o tempo selecionado for adequado. Segundo Ansari & Goodarznia (2012), o efeito do tempo estático fornecido a extração supercrítica tem como principais objetivos: o aumento do rendimento total da extração supercrítica e a redução do volume de fluido supercrítico consumido no processo. Entretanto, os autores não observaram a influência do tempo de extração estática (50 e 60 min) nas condições de extração supercrítica do óleo essencial de hortelã. Por outro lado, Rodriguez et al. (2018), observaram que o desempenho da extração estática de 120 min resultou em rendimentos maiores em extrato de raiz de bardana (6,51% em peso), superior às extrações realizadas em 60 min de confinamento (1,97% em peso).



**Figura 5.9.** Curvas cinéticas de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico para diferentes tempos de extração estática de 5, 30, 60 e 90 min.

Como constado, o tempo estático é uma das inúmeras variáveis que demonstram efeito singular no processo de extração supercrítica, sendo esse tempo específico para cada matéria-prima, considerando a complexidade da matriz vegetal. Mas, observa-se, que na maioria dos trabalhos publicados, os tempos de extração estática são bem reduzidos, isso quando abordado, sendo muitas vezes apenas visando a estabilização do fluido no vaso de extração. Contudo, a condição inicial de extração deve ser avaliada com cautela, ponderando os ganhos efetivos e os custos operacionais gerados (FORNARI *et al.*, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2018).

#### *Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico*

As condições experimentais da SFE, seguindo o planejamento Box-Behnken proposto, para investigar os efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento (%) em extrato das folhas de *M. aquifolia*, são apresentadas na Tabela 5.7, assim como, a densidade para o CO<sub>2</sub> em cada condição ( $\rho_s$  - NIST) e a solubilidade ( $Y_s$ ) do extrato no solvente supercrítico, calculada a partir dos dados iniciais das curvas cinética (massa de extrato versus massa de solvente) para cada condição de extração.

A partir dos ensaios realizados, observa-se que as associações entre as variáveis resultaram em rendimentos que variaram de 0,48 a 1,13% em massa, (corridas 9 e 12, respectivamente). Esses limites foram obtidos na temperatura de 50 °C, o maior rendimento na condição de maior pressão e vazão (300 bar e 6 mL min<sup>-1</sup>), e o menor rendimento na condição de menor pressão e vazão (200 bar e 2 mL min<sup>-1</sup>).

**Tabela 5.7.** Condições experimentais e rendimentos das SFE em extrato das folhas de *M. aquifolia* empregando CO<sub>2</sub>.

Ensaio	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub> (bar)	X <sub>3</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	ρ <sub>s</sub> <sup>a</sup> (g cm <sup>-3</sup> )	Y <sub>s</sub> <sup>b</sup> (g <sub>ext.</sub> g <sub>sol.</sub> <sup>-1</sup> )	Rendimento. (%)
1	40	200	4	0,840	2,1x10 <sup>-3</sup>	0,60
2	60	200	4	0,724	1,6x10 <sup>-3</sup>	0,59
3	40	300	4	0,910	1,6x10 <sup>-3</sup>	0,64
4	60	300	4	0,830	1,6x10 <sup>-3</sup>	0,94
5	40	250	2	0,879	4,6x10 <sup>-3</sup>	0,71
6	60	250	2	0,786	2,0x10 <sup>-3</sup>	0,62
7	40	250	6	0,879	1,5x10 <sup>-3</sup>	0,82
8	60	250	6	0,786	1,9x10 <sup>-3</sup>	0,88
9	50	200	2	0,784	1,3x10 <sup>-3</sup>	0,48
10	50	300	2	0,870	2,4x10 <sup>-3</sup>	0,70
11	50	200	6	0,784	1,3x10 <sup>-3</sup>	0,78
12	50	300	6	0,870	1,6x10 <sup>-3</sup>	1,13
13*	50	250	4	0,834	1,8x10 <sup>-3</sup>	0,70 ± 0,05*

\*Desvio padrão para a média da triplicata no ponto central; X<sub>1</sub> – Temperatura; X<sub>2</sub> – Amplitude; X<sub>3</sub> – Vazão volumétrica; <sup>a</sup>Densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico (NIST); <sup>b</sup>Solubilidade do extrato no solvente.

Os resultados obtidos no presente estudo foram ligeiramente superiores aos descritos por Minozzo et al. (2012) na extração supercrítica de extratos de folhas de *M. aquifolia*. Os autores operaram com CO<sub>2</sub> puro na faixa de 100 – 250 bar e 20 – 50 °C e obtiveram o maior rendimento (1,104%), usando 250 bar e 50 °C. Além disso, atribuem o aumento do rendimento ao poder do solvente, relacionado a sua densidade, próxima de 0,842 g cm<sup>-3</sup>. De forma similar, comparando as densidades nas condições operacionais dos ensaios 9 (0,798 g cm<sup>-3</sup>) e 12 (0,870 g cm<sup>-3</sup>),

também pode-se considerar a influência do poder do solvente, sendo que, nessas condições o extrato apresentou uma solubilidade de  $1,3 \times 10^{-3}$  e  $1,6 \times 10^{-3}$  g<sub>ext.</sub> g<sub>sol.</sub><sup>-1</sup>, respectivamente.

Contudo, um melhor entendimento dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento da SFE, pode ser alcançado a partir das análises estatísticas do planejamento proposto. A Tabela 5.8 apresenta a ANOVA para o conjunto de dados, a Equação 31 o modelo estabelecido a partir das variáveis significativas ( $p < 0,05$ ), Figura 5.10 exemplifica a estimativa dos efeitos principais das variáveis independentes, por fim a Figura 5.11 exibe adequação do modelo. As análises estatísticas foram realizadas considerando um intervalo de confiança de 95%.

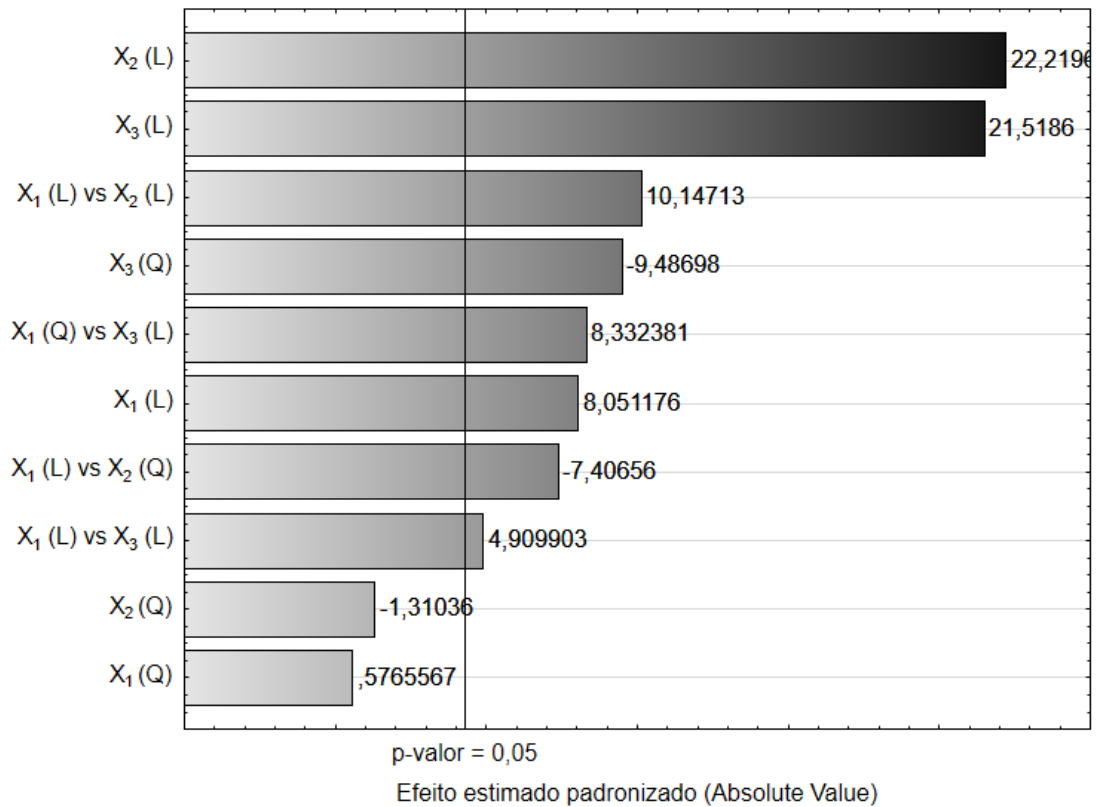
**Tabela 5.8.** ANOVA para o ajuste aos dados experimentais das SFE com CO<sub>2</sub>.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Modelo*	0,355	10	0,036	16,247	5,96 <sup>a</sup>
Falta de ajuste <sup>NS</sup>	0,009	2	0,004	17,732	
Erro puro	0,008	2	0,000		
Total SQ	0,364	14			
R <sup>2</sup>	0,976				
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	0,916				

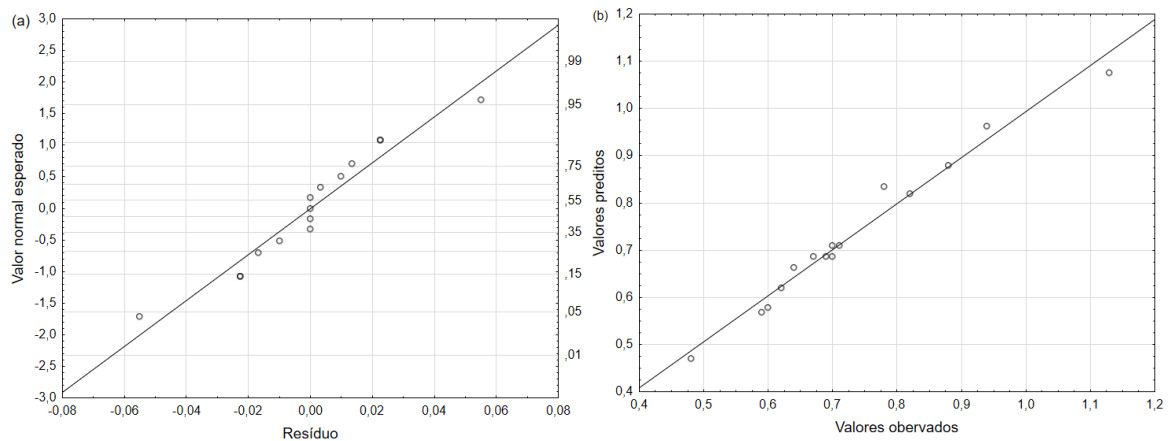
GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; QM: quadrado médio; F: estatística F; NS – não significativo ( $p > 0,05$ ); \*significante para  $p < 0,05$ ; <sup>a</sup>F<sub>tab</sub> (10;4;0,05).

$$\text{Rend.(\%)} = 0,74 + 0,06X_1 + 0,12X_2 + 0,12X_3 - 0,04X_3^2 + 0,08X_1X_2 + 0,04X_1X_2^2 + 0,04X_1X_3 + 0,04X_1^2X_3 \quad (31)$$

A análise de variância comprovou a adequação do modelo, visto que, a condição  $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$  foi satisfeita, portanto, os parâmetros do modelo se ajustam adequadamente aos dados experimentais. O ajuste é confirmado pelos coeficientes de determinação elevados ( $R^2$  e  $R^2_{\text{ajustado}}$ ), insignificância da falta de ajuste ( $p\text{-valor} > 0,05$ ) e pela significância da regressão ( $p\text{-valor} < 0,05$ ).



**Figura 5.10.** Gráfico de Pareto demonstrando os efeitos das variáveis independente no rendimento da SFE: temperatura ( $X_1$ ), pressão ( $X_2$ ) e vazão ( $X_3$ ), onde (L) e (Q)– são referentes aos termos linear e quadrático do modelo.



**Figura 5.11.** Gráfico da probabilidade normal dos resíduos (a) e Gráfico dos resíduos versus valores preditos (b).

A Figura 5.11 apresenta os gráficos de adequação da regressão aos dados experimentais. A partir do gráfico dos resíduos versus o valor normal esperado (FIGURA 5.11a) é possível verificar que não há anormalidades na distribuição dos

resíduos, não se observando discrepâncias ou outliers. O gráfico dos valores preditos versus observados (FIGURA 5.11b) demonstra a adequabilidade do modelo, indicado pela relação linear entre os valores reais e os preditos pelo modelo, para o intervalo das condições operacionais investigadas.

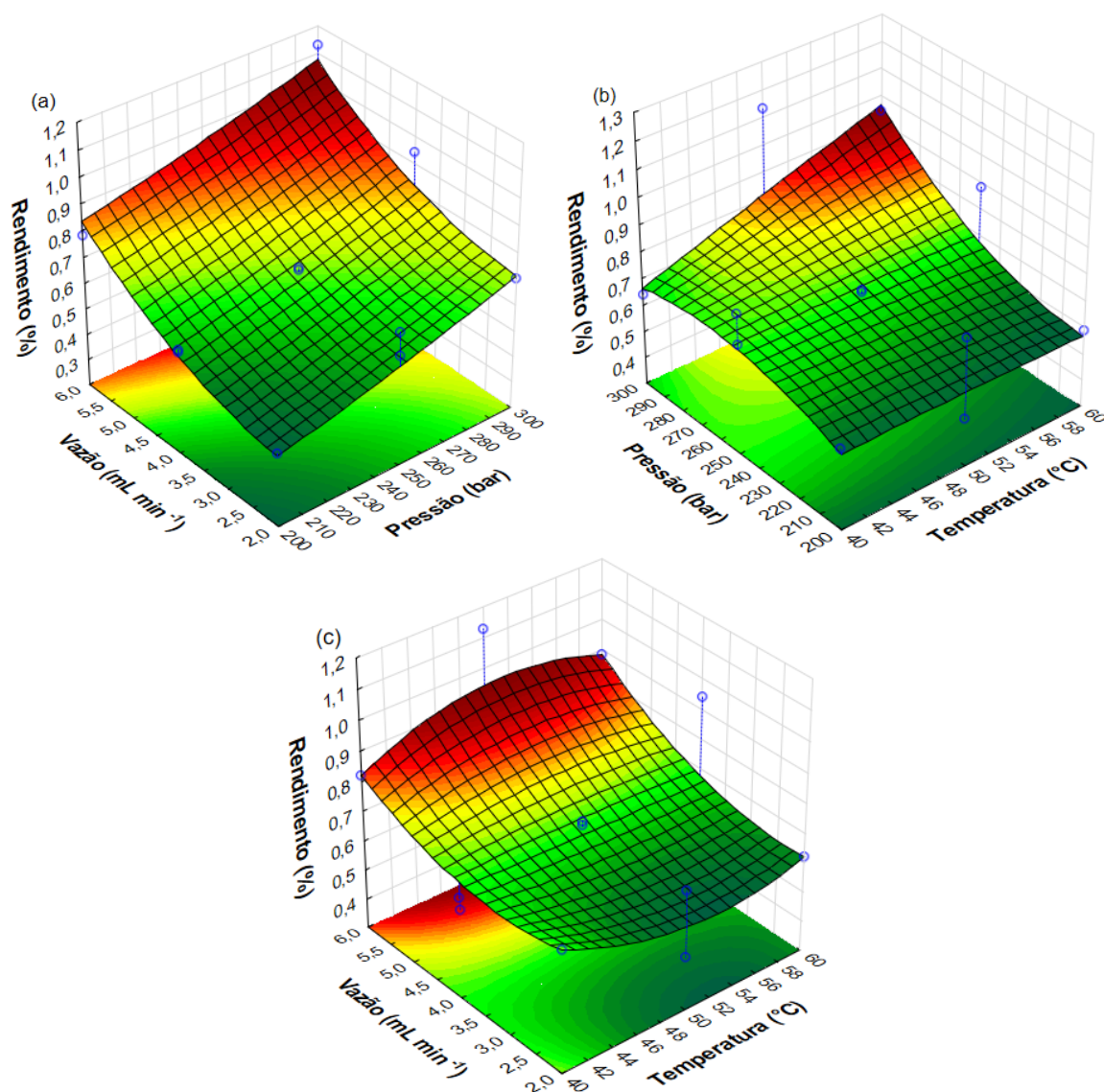
A Figura 5.12, ilustra as superfícies de respostas para o rendimento em função das variáveis independentes nas SFE, dentro da faixa experimental (40-60 °C, 200-300 bar e 2-6 mL min<sup>-1</sup>). Em conformidade com a Figura 5.10, a Figura 5.12 (a) exhibe o comportamento dos efeitos correlativos das variáveis pressão e vazão, sendo estes os mais significativos sobre a variável resposta. Efeitos semelhantes foram encontrados por Barzotto et al. (2019), na SFE das folhas de *Eugenia involucrata*, onde a pressão e vazão foram as variáveis mais significativas no processo, seguida da temperatura com efeito negativo.

A tendência plana da superfície (Figura 5.12a), é devido à maior significância dos efeitos lineares (L) da pressão e vazão. A maior significância dessas variáveis pode ser justificada pelo incremento na densidade do solvente supercrítico (CO<sub>2</sub>), ou seja, o poder do solvente foi melhorado pela elevação da pressão. Por outro lado, também é atribuído ao aumento do fluxo de solvente no leito, em razão da atenuação da resistência do filme externo a transferência de massa (MELO *et al.*, 2014). Embora, uma maior vazão de solvente colabore para uma maior capacidade de extração, é importante ressaltar a elevação dos custos operacionais, considerado o aumento de escala (PEREIRA & MEIRELES, 2010).

É de conhecimento comum que a densidade do solvente é reduzida com o aumento da temperatura em condições isobáricas. A Figura 5.12(b) ilustra os efeitos correlativos da pressão e temperatura, onde o rendimento também foi favorecido com o aumento dessas variáveis, para uma vazão fixa. Nas condições operacionais, observou-se a dupla influência da temperatura no processo, por um lado, reduziu a densidade do solvente, mas por outro, aumenta a pressão de vapor do soluto, aumentando sua solubilidade no solvente supercrítico (PEREIRA & MEIRELES, 2010; MELO *et al.*, 2014; RODRIGUEZ *et al.*, 2018).

Os efeitos correlativos da vazão e temperatura (FIGURA 5.12c), da mesma forma, contribuíram para o aumento no rendimento, porém, ligeiramente menor em

condição isobárica, evidenciando a pressão como o principal fator nas SFE e a proeminência da densidade do fluido supercrítico sobre a solubilidade.



**Figura 5.12.** Superfícies de resposta para o rendimento em extrato das folhas de *M. aquifolia*. Efeitos correlativos de vazão e pressão (a), pressão e temperatura (b) e vazão e temperatura (c).

#### *Extração com CO<sub>2</sub> e cossolventes*

A utilização de cossolventes no processo foi investigada após estabelecer a melhor condição de extração supercríticas com CO<sub>2</sub> e a elucidação dos efeitos das principais variáveis sobre o rendimento. Os solventes EtOH e AcEt foram testados, com a finalidade de melhorar a eficiência do processo de extração. Como ponderado anteriormente estes solventes atuam como modificadores da densidade



e polaridade do solvente supercrítico, considerados solventes seguros, altamente disponíveis e amplamente empregados como modificadores (FALCO & KIRAN, 2012; MELO *et al.*, 2014; BERMEJO *et al.*, 2015).

Os ensaios foram conduzidos na condição (50 °C, 300 bar e 6 mL min<sup>-1</sup>), onde se obteve o maior rendimento com CO<sub>2</sub> puro. A Tabela 5.9 apresenta os resultados obtidos para cada condição investigada (1, 3 e 5% V V<sup>-1</sup>), assim como, a densidade do solvente misto e a solubilidade do extrato no solvente. Ainda, a condição de maior rendimento com CO<sub>2</sub> puro, para fins de comparação e construção das curvas cinéticas, foi realizado uma réplica nesta condição.

**Tabela 5.9.** Condições experimentais e rendimentos das SFE com cossolventes.

Solvente	$\rho_s^a$ (g mL <sup>-1</sup> )	$Y_s^b$ (g <sub>ext.</sub> g <sub>sol.</sub> <sup>-1</sup> )	Rendimento (%) <sup>c</sup>
CO <sub>2</sub>	0,870	1,6x10 <sup>-3</sup>	1,13 ± 0,004 <sup>a</sup>
CO <sub>2</sub> + 1% EtOH	0,869	1,2x10 <sup>-3</sup>	0,75 ± 0,05 <sup>b</sup>
CO <sub>2</sub> + 3% EtOH	0,867	1,0x10 <sup>-3</sup>	0,95 ± 0,01 <sup>c</sup>
CO <sub>2</sub> + 5% EtOH	0,864	1,2x10 <sup>-3</sup>	1,13 ± 0,02 <sup>a</sup>
CO <sub>2</sub> + 1% AcEt	0,869	1,1x10 <sup>-3</sup>	0,78 ± 0,00 <sup>b</sup>
CO <sub>2</sub> + 3% AcEt	0,867	1,2x10 <sup>-3</sup>	0,82 ± 0,00 <sup>b</sup>
CO <sub>2</sub> + 5% AcEt	0,864	1,9x10 <sup>-3</sup>	1,06 ± 0,01 <sup>a</sup>

Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si (p<0,05); <sup>a</sup>Densidade do solvente misto (GREEN & PERRY, 2007); <sup>b</sup>Solubilidade do extrato no solvente; <sup>c</sup>Média e desvio padrão para duplicata.

Conforme observado na Tabela 5.9, o rendimento apresentou uma tendência de aumento com o uso de concentrações do cossolvente. Utilizando EtOH o rendimento variou de 0,75% (1% EtOH) a 1,13% (5% EtOH), e utilizando o AcEt o rendimento aumentou de 0,78 a 1,06%, para as concentrações de 1 e 5%, respectivamente. Esses resultados frustram as expectativas iniciais de ganhos significativos com a utilização de uma fração ínfima de modificador, na corrente de arraste. Efeito semelhante foram reportados por Kitzberger *et al.* (2007) e Michielin *et al.* (2009), na obtenção de extratos de shitake adicionando cossolventes nas proporções de 5, 10 e 15% p p<sup>-1</sup> e de *Cordia verbenácea* 2, 5 e 8% p p<sup>-1</sup>,

respectivamente. Para ambos, a redução no rendimento deve-se principalmente à redução da interação do soluto/ $\text{CO}_2$  e/ou aumento da interação cossolvente/soluto.

No presente estudo, podemos ainda acreditar que a concentração utilizada de cossolventes foi baixa, não sendo o suficiente para promover uma maior solubilização dos compostos polares presentes, em parte associado a redução da interação soluto/ $\text{CO}_2$  ou cossolvente/soluto, reduzindo o soluto arrastado pelo solvente misto. Este pressuposto, pode ter sido agravado pelo fluxo elevado de solvente utilizado ( $6 \text{ mL min}^{-1}$ ), em consequência da redução do tempo de residência do solvente orgânico no leito. Mas, considerando o perfil de aumento de rendimento com a concentração de cossolvente, novas abordagens se fazem necessárias com maiores concentrações, podendo estas conduzirem a resultados mais expressivos ou até mesmo aplicando solventes de maior polaridade, para confirmar os resultados obtidos.

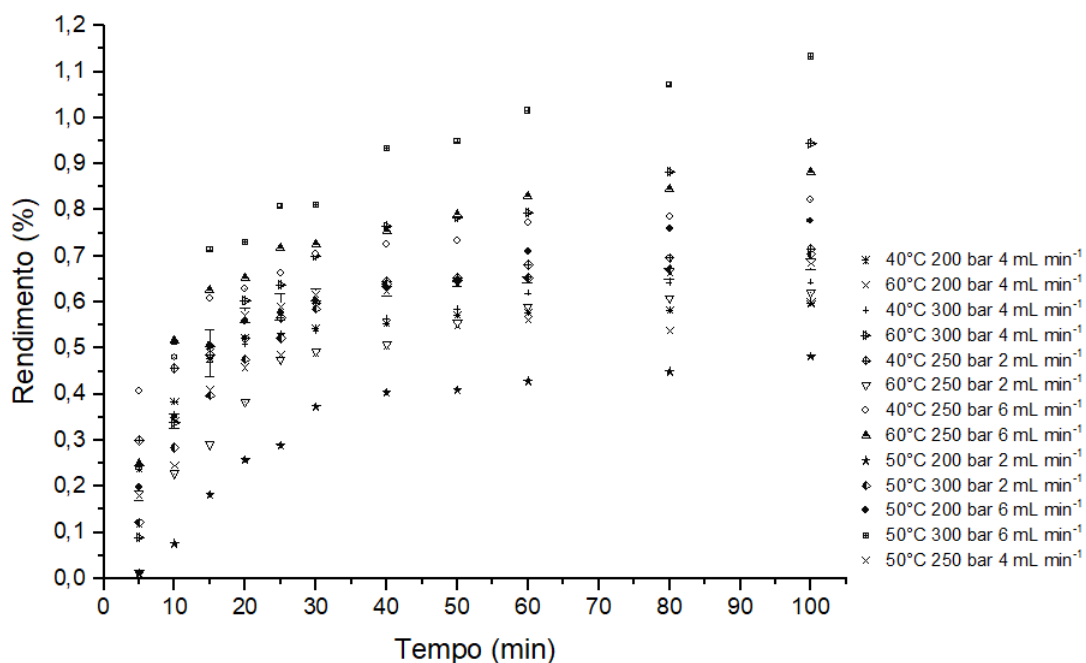
Entretanto, deve-se notar que a condição não favorável estabelecida depende da natureza da interação solvente/soluto, assim como, da geometria do extrator, temperatura, pressão e vazão, ou seja, variáveis do processo supercrítico. Estabelecendo, assim, que o comportamento é inerente a cada processo e matéria-prima em específico. Esta, afirmação é corroborada por outros trabalhos, em que a adição dos mesmos cossolventes utilizados, em pequenas quantidades foram benéficas ao processo, conforme os dados reportados por Santos et al. (2017), na obtenção do óleo da madeira de candeia conduzida com os cossolventes etanol e acetato de etila nas concentrações de 1, 3 e 5%  $\text{V V}^{-1}$ , que proporcionaram um aumento considerável em relação a extração com  $\text{CO}_2$  puro. Assim como Vargas et al. (2010), na obtenção de extratos de sementes de goiaba via extração supercrítica com cossolvente (10%  $\text{p p}^{-1}$ ), na qual, o rendimento total e em compostos fenólicos form diretamente proporcionais a polaridade do solvente utilizado  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}_2+\text{EtAc}$  e  $\text{CO}_2+\text{EtOH}$ , nesta ordem.

#### *Curvas cinéticas de extração com $\text{CO}_2$ e $\text{CO}_2$ +cossolvente*

Embora, as superfícies de respostas traduzam graficamente o comportamento do rendimento em função das variáveis adotadas no planejamento Box-Behnken, não é o bastante para uma avaliação aprofundada. Geralmente, o

entendimento do processo é complementado e melhor entendido através da avaliação gráfica das curvas globais de extração e sua modelagem, que permitem a compreensão das etapas do processo, auxiliam na definição do tempo de extração, volume de leito de extração, vazão requerida para uma taxa de extração pré-estabelecida, entre outros parâmetros.

As curvas cinéticas para as extrações supercríticas normalmente são representadas em um gráfico de massa extraída acumulada em função do tempo ou por massa de solvente. A Figura 5.13 apresenta as curvas cinéticas obtidas para cada condição do delineamento experimental utilizando CO<sub>2</sub> e as Figuras 5.14 e 5.15 para o conjunto de ensaios realizados para avaliar a influência dos cossolventes.

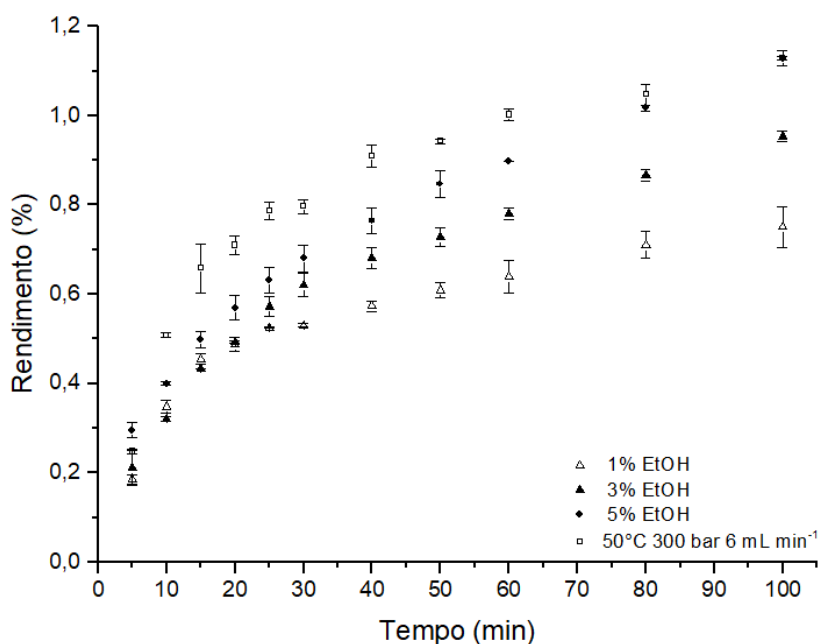


**Figura 5.13.** Cinética experimental para extração de folhas de *M. aquifolia* com CO<sub>2</sub> supercrítico (condições experimentais Tabela 5.7).

Do mesmo modo que as superfícies, observa-se que o rendimento é favorecido pelo aumento da temperatura, até certo ponto, onde os efeitos da pressão e vazão passam a ser os fatores mais significativos, de forma oposta, em condições mais brandas de pressão e vazão, resulta em menores rendimentos.

Os três estágios característicos das curvas cinéticas do processo supercrítico podem ser visualizados na Figuras 5.13, 5.14 e 5.15: extração

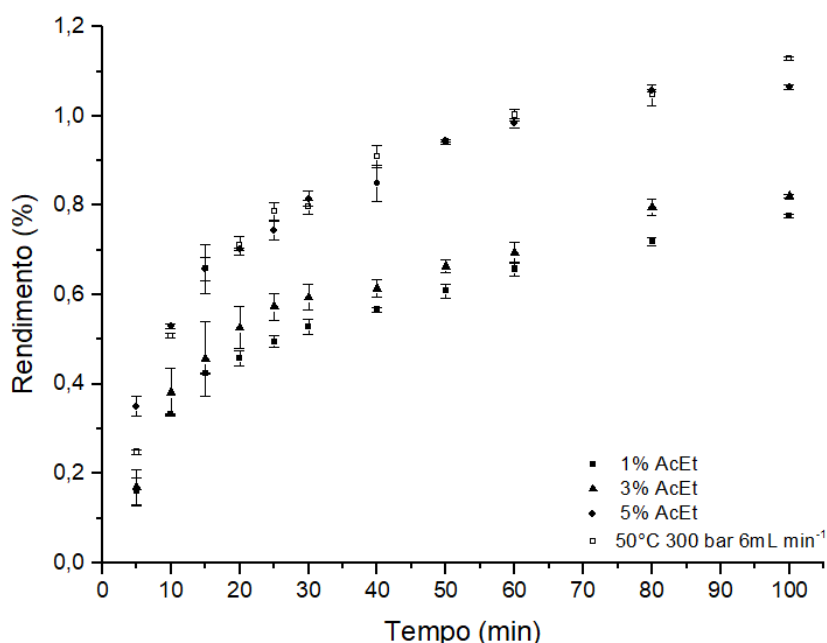
constante (CER), descendente (FER) e difusional (DC). As curvas apresentam uma inclinação pouco acentuada no início do processo, indicando a resistência a transferência de massa. Embora imprecisa, visualmente a etapa CER ocorre rapidamente no início do processo ( $t < 15$  min), em que o soluto mais solúvel é removido por mecanismo convectivo, correspondendo neste caso a extração de aproximadamente 50% do material extraível total. Na sequência, a etapa FER ( $t > t_{CER}$ ) é o momento em que o soluto na superfície começa a se esgotar e o processo de difusão intrapartícula atua em conjunto com o mecanismo convectivo. E por fim, a etapa difusional (DC) onde a quantidade de soluto extraível é mínima, se aproximando do valor teórico de extrato passível de ser extraído. No caso das folhas de *M. aquifolia*, aparentemente a extração ocorreu predominantemente no segundo período (FER).



**Figura 5.14.** Cinética experimental para extração de folhas de *M. aquifolia* com CO<sub>2</sub> supercrítico e o cossolvente EtOH.

As curvas cinéticas para o rendimento das extrações conduzidas com cossolventes (FIGURAS 5.14 e 5.15), não divergiram do comportamento exibido nas extrações CO<sub>2</sub> puro, visto que, a densidade do solvente misto não apresentou grandes mudanças, conforme estimado. Contudo, a solubilidade do soluto neste solvente misto foi reduzida, facilmente visualizada pela menor inclinação nos

pontos iniciais da etapa CER, em comparação a condição de maior rendimento (ensaio 12). Conforme discutido anteriormente, isso pode estar relacionado com a competição entre os solventes para interagir com o soluto, ou ainda, devido ao tempo de permanência do solvente no extrator ser reduzido em fluxo elevado, prejudicando a interação entre as fases e desviando do ponto de saturação do solvente (KAVOURA *et al.*, 2019). O fluxo elevado também pode contribuir para que o solvente tenha a propensão em percolar o leito ao invés de difundir pela matéria-prima.



**Figura 5.15.** Cinética experimental para extração de folhas de *M. aquifolia* com CO<sub>2</sub> supercrítico e o cossolvente AcEt.

Entretanto, é importante refletir que o rendimento não é único fator a ser considerado nas extrações, sejam elas supercríticas, assistidas por ultrassom ou clássicas, quando se trata de um produto de origem natural a qualidade do extrato, ou seja, sua composição química é um fator de relevância (KITZBERGER *et al.*, 2007; VEGGI *et al.*, 2014). Desta forma, a investigação da composição determinará se o método de extração com cossolvente é viável e seletivo para condições investigadas. Neste sentido, os resultados reportados por Vasconcelos *et al.* (2000) na obtenção dos extratos das folhas de *M. aquifolia* via tecnologia supercrítica, estão de acordo com essa premissa. Os autores dissertam que, a utilização de

etanol como modificador não conduzido para maiores rendimentos, contudo, resultou em um extrato com maior concentração de triterpenos friedelanos (friedelina e friedelan-3-ol), substâncias essas com diversas propriedades biológicas de interesse.

#### *Modelagem das curvas cinéticas de extração*

Para modelagem dos dados experimentais, as curvas cinéticas foram expressas em termos de massa de extrato em função do tempo de extração. Na sequência, a Tabelas 5.10 apresenta os valores dos parâmetros ajustados e os resultados estatísticos para o modelo de Sovová ( $R^2$  e DMA), para todas as condições supercríticas experimentais. Por sua vez, as Figuras 5.16 a 5.20 apresentam as curvas cinéticas experimentais e o ajuste do modelo matemático de Sovová (1994). Para efeito de comparação e melhor visualização, as curvas foram divididas e apresentadas juntamente com a curva cinética que demonstra o maior percentual de massa de extrato obtida (ensaio 12/duplicata).

Os parâmetros iniciais utilizados para a modelagem das curvas cinéticas foram: concentração inicial de soluto no sólido ( $X_o = 0,01146 \text{ g}_{\text{extrato}} \text{ g}_{\text{sólido}}^{-1}$ ) que determina a condição de maior rendimento; densidade dos solventes (Tabelas 5.7 e 5.9); massa de inerte ( $m_s = 17,3267 \text{ g}$ ); densidade do leito ( $\rho_a = 0,3707 \text{ g cm}^{-3}$ ); densidade real da amostra ( $\rho_r = 1,3572 \text{ g cm}^{-3}$ ); porosidade do leito ( $\varepsilon = 0,7267$ ). Os valores dos parâmetros  $\rho_a$ ,  $\varepsilon$  e  $m_s$ , foram obtidos a partir da média dos valores determinados em cada ensaio, em decorrência de uma pequena variação da massa de folha utilizada para preencher o extrator ( $\pm 17,5$ ).

Conforme, mencionado anteriormente o parâmetro  $r_k$  recebe conotação física, não subordinado as condições de extração, sendo considerado um fator volumétrico entre as células rompidas e intactas, assim, seu valor foi considerado constante ( $r_k = 0,5709$ ), uma vez que, o procedimento inicial de preparo da matéria-prima foi único e uniforme para a fração utilizada. Os Parâmetros Z e W, embora adimensionais, apresentam relação direta com os coeficientes de transferência de massa da fase fluida ( $K_F a$ ) e sólida  $K_S a$ , respectivamente (BARTOZZO *et al.*, 2019).

**Tabela 5.10.** Parâmetros ajustados para o modelo de Sovová (1994), para as extrações supercríticas com CO<sub>2</sub> e cossolventes.

<b>X<sub>1</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>X<sub>2</sub></b> <b>(bar)</b>	<b>X<sub>3</sub></b> <b>(mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Z</b> <b>Adimensional</b>	<b>W</b>	<b>t<sub>CER</sub></b> <b>(min)</b>	<b>t<sub>FER</sub></b> <b>(min)</b>	<b>K<sub>Fa</sub></b> <b>(min<sup>-1</sup>)</b>	<b>K<sub>sa</sub></b> <b>(min<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b> <b>-</b>	<b>DMA</b> <b>(%)</b>
40	200	4	2,729	0,019	4,950	19,175	0,331	0,0015	0,991	2,886
60	200	4	4,044	0,050	4,066	23,215	0,485	0,0038	0,986	5,557
40	300	4	4,329	0,083	3,146	19,886	0,522	0,0064	0,960	7,832
60	300	4	2,180	0,022	6,750	22,438	0,265	0,0017	0,980	5,444
40	250	2	3,904	0,029	3,482	18,173	0,473	0,0023	0,990	3,539
60	250	2	13,851	0,099	0,625	10,782	1,666	0,0076	0,985	3,756
40	250	6	27,972	0,038	0,391	12,234	3,545	0,0031	0,625	10,678
60	250	6	27,863	0,055	0,347	10,941	3,524	0,0040	0,920	6,296
50	200	2	2,569	0,002	15,936	57,098	0,113	0,0001	0,927	45,450
50	300	2	7,827	0,052	2,332	21,892	0,376	0,0016	0,972	9,197
50	200	6	27,417	0,029	0,516	15,680	3,477	0,0021	0,991	3,928
50	300	6	27,476	0,125	0,366	13,018	3,580	0,0105	0,986	3,367
50	250	4	1,695	0,029	3,161	8,630	0,143	0,0016	0,917	6,523
	CO <sub>2</sub> + 1% EtOH		2,791	0,019	4,808	18,947	0,363	0,0016	0,992	3,363
	CO <sub>2</sub> + 3% EtOH		4,054	0,050	4,047	23,163	0,520	0,0041	0,986	5,585
	CO <sub>2</sub> + 5% EtOH		4,329	0,083	3,146	19,884	0,559	0,0068	0,960	7,833
	CO <sub>2</sub> + 1% AcEt		2,163	0,022	6,781	22,427	0,281	0,0019	0,981	5,406
	CO <sub>2</sub> + 3% AcEt		3,899	0,030	3,471	18,114	0,505	0,0025	0,990	3,531
	CO <sub>2</sub> + 5% AcEt		13,193	0,100	0,654	10,798	1,697	0,0082	0,985	3,742

O período de extração constante ( $t_{CER}$ ) caracterizado pelo modelo, ocorre rapidamente em  $t \leq 6,75$  min, inferior ao tempo estimado anteriormente ( $t < 15$  min) de forma rudimentar, ressalva da condição de maior desvio (DMA). Neste período o transporte de massa ocorre predominantemente por mecanismo convectivo, os valores estimados para o coeficiente  $K_F a$  variou entre 0,113 a 3,580  $\text{min}^{-1}$ . Por conseguinte, a etapa decrescente, como já esperado, exibe um tempo de extração maior  $t_{CER} < 23,215$  ( $t_{CER} < t \leq t_{FER}$ ), devido ao início do mecanismo de difusão intrapartícula operando em conjunto com o convectivo. Os valores para o coeficiente  $K_S a$  são bem reduzidos (0,0001 a 0,0105  $\text{min}^{-1}$ ), explicando a resistência a transferência de massa na fração sólida.

Em um  $t > t_{FER}$ , etapa DC, é considerada uma etapa limitante para o processo de extração supercrítica, caracterizada pela dificuldade em extrair o soluto contido no interior das células intactas, onde os maiores rendimentos são obtidos nos ensaios que apresentam valores  $K_S a$  mais elevados, nesse período de transferência de massa intrapartícula é considerada dominante no processo (BERMEJO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017; BARTOZZO *et al.*, 2019).

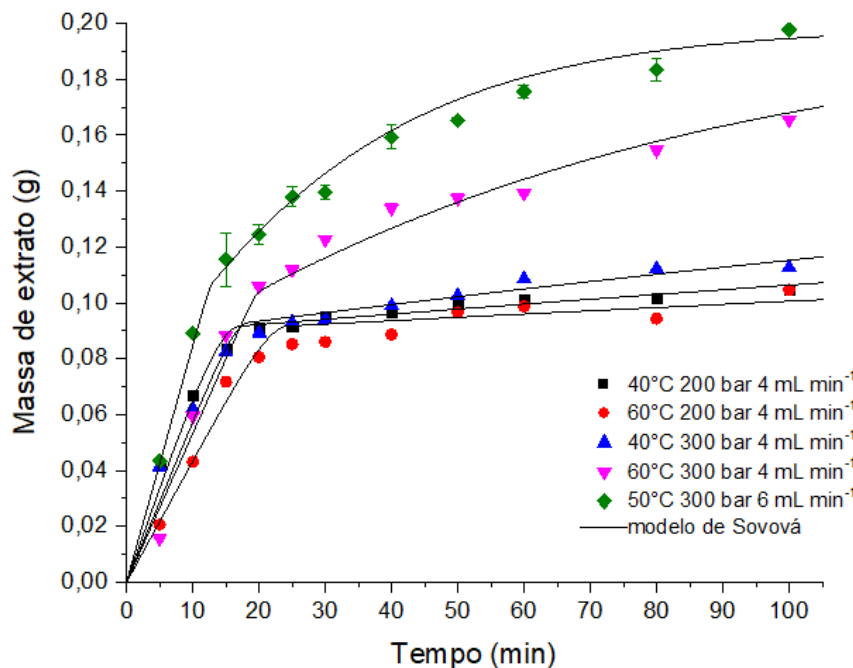
Tempos muito superiores para as etapas CER e FER foram reportados Minozzo *et al.* (2012), na modelagem das curvas de extração supercríticas das folhas de *M. aquifolia* utilizando o modelo de Sovová. O período de extração constate variou de 60 a 240 minutos e período decrescente de 90 a 120 minutos. Contudo, pode se considerar que esses longos tempos CER e FER, ocorreram em decorrência da construção das curvas com pouquíssimos pontos iniciais, senso estes, coletados no intervalo de 30 minutos, para um tempo total de 240 min. Como resultado, impossibilitou a visualização dos efeitos iniciais da pressão e a temperatura na solubilização do soluto na etapa CER, acarretando em um declínio acentuado da curva de extração, conseqüentemente, levando a uma caracterização e modelagem inconsistente com a realidade, sendo esses dados extremamente divergente do presente estudo.

Os coeficientes de  $K_F a$  e  $K_S a$  conforme podem ser observados, foram aprimorados com o aumento das variáveis investigadas, sendo os efeitos da pressão e vazão do solvente os mais pronunciados, conforme pode ser constatado na Tabela 5.10. Efeitos semelhantes foram relatados por Barzotto *et al.* (2019), em

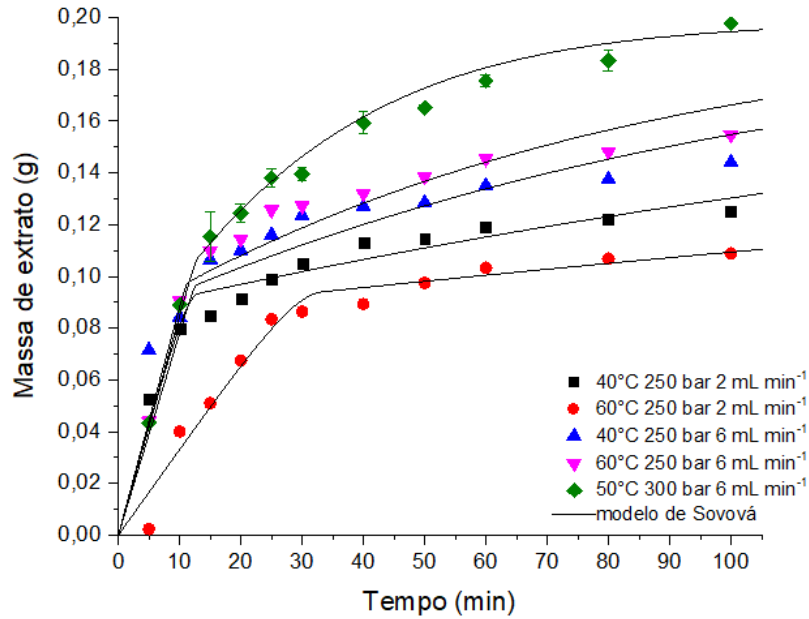


que os valores dos coeficientes  $K_F a$  e  $K_S a$  foram aumentados, decorrentes do rompimento das paredes celulares (efeito da pressão) e aumento da convecção, promovida pela redução da resistência à transferência de massa (efeito da vazão). O efeito menos expressivo da elevação da temperatura está relacionado a redução da densidade do solvente, sendo este o fator predominante que afeta o coeficiente  $K_F a$ , mesmo a temperatura melhorando a mobilidade e a penetração do solvente no sólido (PALSIKOWSKI *et al.*, 2019).

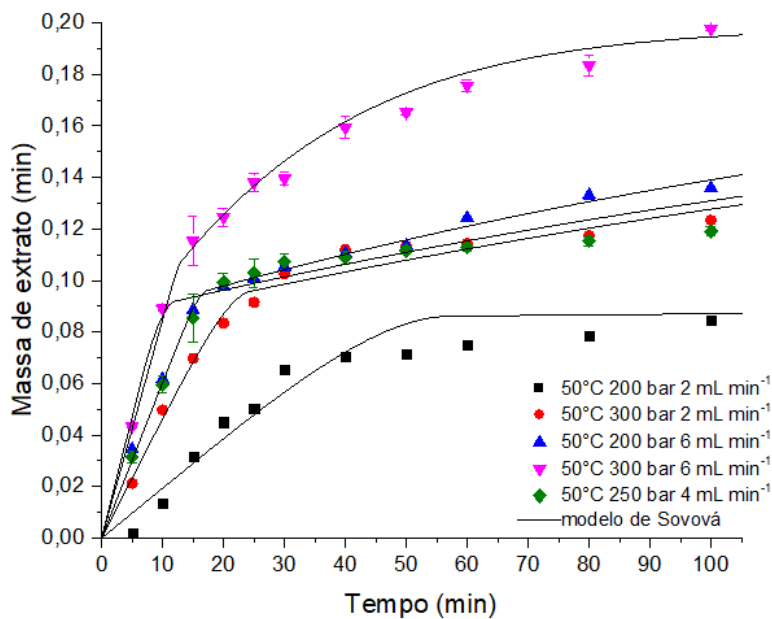
No presente estudo os valores de  $K_F a > K_S a$  estão correlacionados ao conceito do soluto no interior do sólido leva um maior tempo para cruzar a interface sólido-fluido, em comparação ao soluto adsorvido na superfície do sólido em contato com solvente livre, ainda, o tempo total estimado para extração do soluto de fácil acesso ( $t_{FER}$ ) variou de 8,630 a 57,098 min.



**Figura 5.16.** Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de *M. aquifolia* via extração supercrítica com CO<sub>2</sub> puro: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová.



**Figura 5.17.** Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de *M. aquifolia* via extração supercrítica com CO<sub>2</sub> puro: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová.

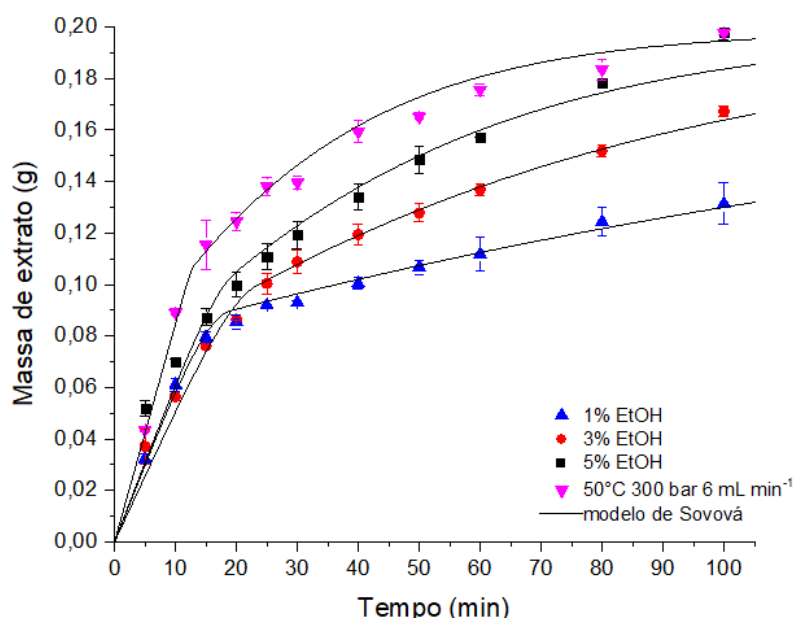


**Figura 5.18.** Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de *M. aquifolia* via extração supercrítica com CO<sub>2</sub> puro: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová.

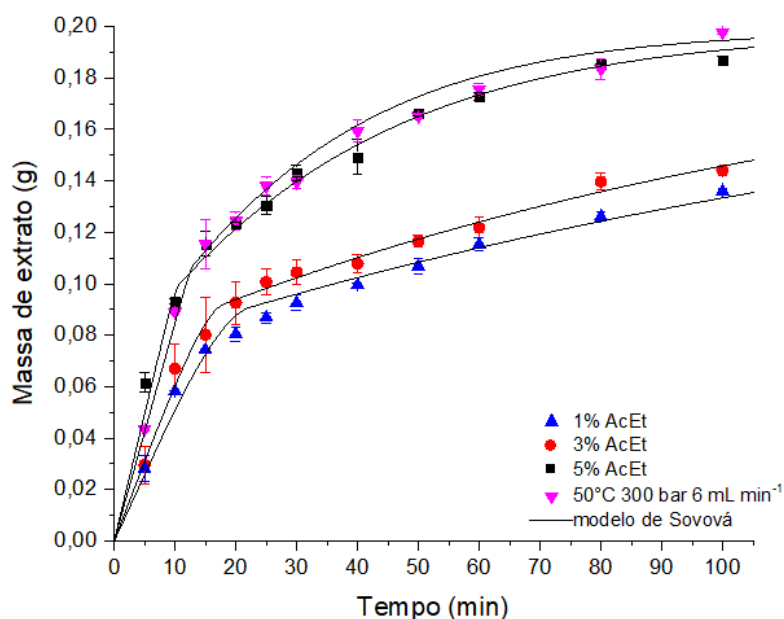
Nas extrações realizadas com cossolvente os períodos CER e FER foram maiores em relação a condição de referência (ensaio 12), conseqüentemente os coeficientes de  $K_{Fa}$  e  $K_{Sa}$  foram inferiores, ou seja, a concentração de solutos no

solvente é função da solubilidade e resistência e da transferência de massa, conforme apresentado pela Tabela 5.10. Efeito oposto foi observado por Bermejo et al. (2017), nas extrações supercríticas de cafeína das folhas de chá verde, onde a adição de cossolventes (AcEt, EtOH e lactato de etila) modificaram o comportamento das curvas, aumentando a taxa inicial de extração (CER) e os valores do  $K_{Fa}$ , acelerando o início da etapa de extração decrescente. Além disso, os valores de  $K_{Sa}$  foram semelhantes para todos os cossolventes, demonstrando que o soluto está fortemente ligado a matriz vegetal e o transporte de massa na fase sólida, por sua vez dominou a extração na maior parte do processo.

A partir da determinação dos coeficientes de transferência de massa ( $K_{Fa} > K_{Sa}$ ), caracterização dos períodos de extração ( $t_{FER} > t_{CER}$ ) obtidas pelo modelo de Sovová e perfil cinético das curvas da SFE com cossolventes, pode-se considerar que, uma parcela significativa do soluto das folhas de *M. aquifolia* estão concentradas na parte interna das partículas com forte afinidade pelo sólido, em regiões em que o solvente e soluto encontram resistência a difusão, como resultado uma baixa solubilidade é exibida nos solventes testados e um conteúdo total extraível muito baixo, nos procedimentos avaliados.



**Figura 5.19.** Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de *M. aquifolia* via extração supercrítica com CO<sub>2</sub>+EtOH: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová.



**Figura 5.20.** Curvas cinéticas para os extratos obtidos a partir das folhas de *M. aquifolia* via extração supercrítica com CO<sub>2</sub>+AcEt: Condições investigadas e ajustes do modelo de Sovová.

Generalizando, o modelo de Sovová (1994), se ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais das extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico puro, com um grau de acurácia alto, traduzidos pelos coeficientes R<sup>2</sup> de 0,941 e DMA de 8,8%. Os ajustes aos dados experimentais das extrações realizadas com cossolvente foram mais acurados, com valores para os coeficientes R<sup>2</sup> de 0,982 e DMA 4,9%. Ao que tudo indica, o processo quando operado com cossolvente ocorre de forma mais homogênea, apresentando melhores ajustes e menores desvios.

#### 5.2.6 CFT, AA<sub>DPPH</sub> e AA<sub>FRAP</sub> para as SFE-CO<sub>2</sub> e cossolventes

Os resultados do CFT e AA<sub>DPPH</sub> e AA<sub>FRAP</sub> para as extrações supercríticas com CO<sub>2</sub> e com cossolventes são apresentados na Tabela 5.11 e 5.12. Conforme o caráter polar dos compostos fenólicos e o princípio do “semelhante dissolve o semelhante”, o poder de solubilização do CO<sub>2</sub> supercrítico frente os compostos fenólicos presentes nas folhas de *M. aquifolia* foi reduzido. Os valores obtidos foram muito semelhantes entre si, sendo o maior CFT (16,27 mg GAE g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>) observado na condição de maior rendimento em extrato. A adição de cossolventes no

processo para superar limitação de solvência do CO<sub>2</sub> e aumentar o rendimento em analitos polares, não resultou grandes efeitos. Os maiores valores de CFT foram de 18,21 e 16,27 mg GAE g<sub>ext</sub><sup>-1</sup> para EtOH e AcEt, respectivamente.

**Tabela 5.11.** CFT e AA<sub>DPPH</sub> e AA<sub>FRAP</sub> dos extratos obtidos nas SFE com CO<sub>2</sub> puro.

Ensaio	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub> (bar)	X <sub>3</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	CFT (mg GAE g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )	DPPH (µmol TEQ g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )	FRAP (µmol Fe <sup>2+</sup> g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )
1	40	200	4	8,92	142,69	2407,95
2	60	200	4	6,22	139,18	2539,37
3	40	300	4	7,38	132,51	2615,46
4	60	300	4	11,63	131,10	2477,12
5	40	250	2	9,70	136,72	2571,65
6	60	250	2	10,47	135,67	2532,46
7	40	250	6	8,92	143,39	2919,82
8	60	250	6	15,50	114,60	2357,22
9	50	200	2	13,57	124,43	2686,94
10	50	300	2	13,53	147,60	2797,62
11	50	200	6	12,79	128,30	2587,79
12	50	300	6	16,27	138,83	2855,26
13	50	250	4	15,50 ± 2,38*	140,58 ± 6,20*	2327,34 ± 98,21*

\*Desvio padrão para a média da triplicata no ponto central; X<sub>1</sub> – Temperatura; X<sub>2</sub> – Pressão; X<sub>3</sub> – Vazão

**Tabela 5.12.** CFT e AA<sub>DPPH</sub> e AA<sub>FRAP</sub> dos extratos obtidos nas SFE com cossolventes.

Solvente		CFT (mg EAG g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )	AA <sub>DPPH</sub> (µmol TEQ g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )	AA <sub>FRAP</sub> (µmol Fe <sup>2+</sup> g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )
CO <sub>2</sub> +EtOH	1%	16,47 ± 0,58 <sup>a</sup>	99,33 ± 2,28 <sup>bc</sup>	1971,01 ± 10,38 <sup>c</sup>
	3%	14,34 ± 0,39 <sup>a</sup>	91,61 ± 1,58 <sup>ab</sup>	1374,98 ± 13,93 <sup>b</sup>
	5%	18,21 ± 1,16 <sup>a</sup>	106,18 ± 1,40 <sup>c</sup>	2418,32 ± 8,07 <sup>a</sup>
CO <sub>2</sub> +AcEt	1%	16,27 ± 4,64 <sup>a</sup>	90,38 ± 0,70 <sup>a</sup>	1466,06 ± 21,90 <sup>b</sup>
	3%	15,11 ± 0,00 <sup>a</sup>	91,26 ± 0,18 <sup>a</sup>	2321,48 ± 35,74 <sup>a</sup>
	5%	11,63 ± 0,77 <sup>a</sup>	96,70 ± 1,40 <sup>ab</sup>	2305,34 ± 28,82 <sup>a</sup>

Médias que apresentam a mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, no intervalo de confiança de 95%.

Os extratos obtidos via tecnologia supercrítica também exibiram uma atividade antioxidante bastante reduzida frente ao radical DPPH. Esse fato está de acordo com a polaridade do solvente (CO<sub>2</sub>) utilizado para obtenção dos extratos, sendo pouco eficiente na solubilização dos compostos fenólicos (polares). Esses compostos são responsáveis por uma parcela considerável da atividade antioxidante de extratos naturais, conforme constatado anteriormente nos extratos obtidos com EtOH nos métodos SOX, PLE e UAE, onde a presença de uma maior concentração de compostos fenólicos, contribui para uma maior atividade antioxidante frente ao radical DPPH.

A quantidade de compostos fenólicos extraídos no processo supercrítico não superou as obtidas nos demais métodos avaliados. Provavelmente isto também pode estar relacionado à dificuldade de acesso do solvente aos compostos profundamente enraizados na matriz das folhas (ZULKAFI *et al.*, 2014), fato esse agravado, pela competição entre os solventes (CO<sub>2</sub> e cossolvente) e a taxa de fluxo elevada, como já discutido anteriormente. Desta forma, com a redução da concentração desses compostos nos extratos supercríticos, pode-se considerar que a atividade antioxidante é função do perfil químico, que por sua vez, é dependente da técnica e do conjunto de parâmetros controlados no processo. Como também observado por Barzotto *et al.* (2019), onde as variáveis do processo pressão, temperatura e vazão tiveram um efeito positivo na atividade antioxidante dos extratos supercríticos, bem como na concentração de  $\alpha$ -tocoferol das folhas de *Eugenia involucrata*.

Entretanto, os extratos naturais apresentam uma complexa gama de compostos, com ampla faixa de polaridade e atividade antioxidante, sendo difícil, considerar apenas um único método capaz de caracterizar a atividade antioxidante total do extrato. Assim, a abordagem pelo método FRAP, expõe outra perspectiva, explicando que a composição fenólica não é a única responsável pela propriedade antioxidante dos extratos, considerado que, estabilização do radical DPPH ocorre prioritariamente pela doação de átomos de hidrogênio dos compostos fenólicos. Segundo Kraujalis *et al.* (2013), a atividade antioxidante dos extratos supercríticos (amaranto) não depende exclusivamente de composto polares. Em seus estudos a concentração de esqualeno e tocoferóis foram responsáveis em parte pela

atividade antioxidante, compostos esses isolados em pressões elevada, 350 e 550 bar, respectivamente. Da mesma forma, Palsikowski et al. (2019), concluíram que a atividade antioxidante dos extratos obtidos por extração com fluido supercrítico das folhas de *Bauhinia forficata* é atribuída principalmente a presença de tocoferóis.

Nas estimativas realizadas pelo método FRAP, os extratos apresentaram atividades antioxidantes substanciais, que variaram de 2357,22 e 2919,82  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}_{\text{ext}}^{-1}$ , resultados esses relativamente mais elevados que os obtidos nos métodos SOX e PLE. Resultados semelhantes foram obtidos nas extrações com cossolventes, os maiores valores foram de 2418,32 e 2321,48  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}_{\text{ext}}^{-1}$ , EtOH (5%) e AcEt (3%), respectivamente. Contudo, a comparação da atividade antioxidante estimadas pelo método DPPH e FRAP com outros dados reportados na literatura, torna-se de certa forma abstrato, visto que, o os métodos utilizados para estas finalidades apresentam muitas variações (RODRIGUEZ *et al.*, 2019).

### 5.3 Composição química dos extratos SOX, PLE, UAE e SFE

Foram determinados os perfis químicos apenas dos extratos com os maiores rendimentos, obtidos nas extrações SOX, PLE. Nas UAE foram analisadas as réplicas, no ponto central do delineamento Box-Behnken. Os resultados da constituição química volátil dos extratos são apresentados na Tabela 5.11, com o valor da área relativa (%) e o número específico de registro CAS. As análises dos extratos demonstraram a existência de vários compostos com potencial bioativo, alguns já relatados em estudos anteriores como constituintes químicos da espécie *M. aquifolia* (PEREIRA *et al.*, 1995; CORDEIRO *et al.*, 1999; CORSINO *et al.*, 2000; YARIWAKE *et al.*, 2005).

Os principais compostos identificados nos extratos, considerando o percentual da área relativa (%), foram esqualeno (1,8 - 43,73%), vitamina E (12,11 - 19,14%), friedelanol (5,88 - 68,97%) e friedelina (3,63 – 22,20%). Dentre esses, optou-se por quantificar friedelina e vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), em razão das diversas ações benéficas a saúde humana agindo como antioxidante, anti-inflamatório, antipirético, analgésico e gastroprotetor, além de prevenir doenças cardíacas e

alguns tipos de cânceres (ANTONISAMY *et al.*, 2011; SUNIL *et al.*, 2013; SUBASH-BABU *et al.*, 2013; BARZOTTO *et al.*, 2019).

**Tabela 5.13.** Composição química dos extratos SOX, PLE e UAE.

Composto	N° CAS	SOX			PLE			UAE
		EtOH	AcEt	Hex	EtOH	AcEt	Hex	EtOH
		Área relativa (%)						
Ácido palmítico	57-10-3	4,26	0,35	n.d.	5,94	4,10	n.d.	6,04
Palmitato de etilo	628-97-7	n.d.	1,22	2,72	n.d.	n.d.	1,24	n.d.
Ácido palmítico, TMS	55520-89-3	4,35	1,78	2,04	n.d.	n.d.	n.d.	2,52
Fitol	150-86-7	3,83	6,74	4,29	n.d.	3,55	n.d.	2,35
Ácido linoleico	60-33-3	1,39	0,52	0,73	2,04	1,36	n.d.	2,10
Ácido linolênico	463-40-1	3,54	n.d.	n.d.	6,70	n.d.	n.d.	5,95
Linolenato de etil	1191-41-9	0,65	1,02	1,65	1,19	4,25	0,55	0,73
Ácido $\alpha$ -linolênico	97844-13-8	3,26	1,23	0,86	n.d.	n.d.	n.d.	3,18
Esqualeno	7683-64-9	33,66	43,73	43,37	19,19	40,39	1,80	36,46
Vitamina E	59-02-9	15,24	19,14	16,34	12,11	17,89	n.d.	15,91
Tetratetracontano	7098-22-8	2,24	1,53	1,98	n.d.	2,75	n.d.	n.d.
Lupenona	1617-70-5	n.d.	0,52	0,70	n.d.	0,79	3,34	0,62
Friedelanol	5085-72-3	18,70	10,81	5,88	40,53	17,17	68,97	15,09
Friedelina	559-74-0	5,56	4,37	4,45	11,59	7,75	22,20	3,63
Geranilgeraniol	24034-73-9	n.d.	0,74	0,78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Outros		3,32	4,82	10,85	0,71	n.d.	1,90	8,60

n.d: não detectado

A quantificação da vitamina E, foi realizada considerando apenas seu isômero “ $\alpha$ ” visto que, a vitamina E é constituída por 8 compostos lipossolúveis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tocoferol e  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ - tocotrienol). O  $\alpha$ -tocoferol é o composto que exibe a maior atividade antioxidante, além de estar presente em maior quantidade e é o único absorvido de forma eficiente pelo organismo humano (RACCHI, 2013).

A CG/MS também foi empregada para a quantificação da friedelina e  $\alpha$ -tocoferol nos extratos obtidos pelos métodos SOX, PLE e UAE. Para isso, foram elaboradas curvas analíticas com os respectivos padrões. Os resultados são apresentados na Tabela 5.12.



**Tabela 5.14.** Concentração de friedelina e  $\alpha$ -tocoferol nos extratos SOX, PLE e UAE.

Método	Solvente	Temp. (°C)	g $\alpha$ -Tocoferol kg ext <sup>-1</sup>	g Friedelina kg ext <sup>-1</sup>
PLE	EtOH	40	7,18 ± 0,20 <sup>ab</sup>	13,07 ± 3,31 <sup>a</sup>
		50	6,66 ± 0,38 <sup>ab</sup>	8,79 ± 0,76 <sup>ab</sup>
		60	6,13 ± 0,33 <sup>b</sup>	11,81 ± 1,50 <sup>a</sup>
SOX		±78	6,83 ± 0,05 <sup>ab</sup>	5,35 ± 0,87 <sup>b</sup>
UAE		50*	7,60 ± 0,58 <sup>a</sup>	3,35 ± 0,40 <sup>b</sup>
PLE	AcEt	40	12,31 ± 0,28 <sup>a</sup>	8,53 ± 1,17 <sup>b</sup>
		50	11,06 ± 0,77 <sup>a</sup>	16,75 ± 2,08 <sup>a</sup>
		60	11,49 ± 1,73 <sup>a</sup>	11,37 ± 2,40 <sup>ab</sup>
SOX		±77	13,36 ± 2,10 <sup>a</sup>	6,56 ± 0,14 <sup>b</sup>
PLE	Hex	40	2,53 ± 0,05 <sup>b</sup>	9,98 ± 0,37 <sup>ab</sup>
		50	2,01 ± 0,35 <sup>b</sup>	10,92 ± 0,28 <sup>ab</sup>
		60	2,11 ± 0,64 <sup>b</sup>	14,87 ± 3,72 <sup>a</sup>
SOX		±68	7,94 ± 0,93 <sup>a</sup>	5,96 ± 0,71 <sup>b</sup>

Médias que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes entre si no intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

Na Tabela 5.12, as concentrações mais relevantes de  $\alpha$ -tocoferol e friedelina foram encontradas nos extratos obtidos com EtAc, nas extrações SOX e PLE a 50 °C, que correspondem a massa de 13,36 g  $\alpha$ -tocoferol kg ext<sup>-1</sup> e 16,75 g Friedelina kg ext<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses resultados evidenciam o EtAc como um bom solvente na extração dos compostos em estudo, ainda que, um solvente aprótico polar, o que o impede de formar fortes ligações de hidrogênio (BERMEJO et al., 2016).

A extração SOX com EtAc contribuiu para um maior teor de  $\alpha$ -tocoferol, em comparação com a PLE, teoricamente em consequência da exaustiva recirculação do solvente no sistema à temperatura de ebulição, favorecendo assim a dissolução.

A concentração de friedelina nos demais extratos obtidos nas extrações SOX e UAE foram inferiores a PLE, e em alguns casos a extração SOX e PLE foram estatisticamente semelhantes. Por outro lado, os extratos etanólicos não apresentaram diferenças significativas relevantes na concentração de  $\alpha$ -tocoferol, assim como, os extratos hexânicos obtidos na PLE.

#### 5.4 Comparação entre os métodos de extração

A Tabela 5.15, apresenta os resultados de rendimento, CFT e a atividade antioxidante obtida a partir das diferentes técnicas aplicadas na investigação da extração dos extratos das folhas de *Monteverdia aquifolia*.

**Tabela 5.15.** Maiores valores de rendimento, CFT e atividade antioxidantes das extrações investigadas.

Técnica/ Solvente	Rend. (%)	CFT (mg GAE g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )	AA <sub>DPPH</sub> (µmol TEQ g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )	AA <sub>FRAP</sub> (µmol Fe <sup>2+</sup> g <sub>ext</sub> <sup>-1</sup> )
SOX/EtOH	8,30	237,40 ± 1,35	727,78 ± 13,39	2529,52 ± 10,35
SOXAcEt	3,79	112,40 ± 1,48	250,22 ± 13,39	1175,48 ± 2,07
SOX/Hex	2,71	64,94 ± 0,27	56,82 ± 9,92	567,82 ± 13,46
PLE/EtOH	5,29	325,52 ± 2,43	1014,01 ± 23,9	2590,60 ± 315,74
PLE/AcEt	3,12	99,16 ± 2,43	180,89 ± 20,83	957,05 ± 27,95
PLE/Hex	2,05	66,82 ± 0,54	48,49 ± 14,38	547,11 ± 3,11
UAE/EtOH	6,57	402,33	702,48	4237,60
SFE/CO <sub>2</sub>	1,13	16,27	147,60	2919,82
SFE/CO <sub>2</sub> +EtOH	1,13	18,21 ± 1,16	106,18 ± 1,40	2418,32 ± 8,07
SFE/CO <sub>2</sub> +AcEt	1,06	16,27 ± 4,64	96,70 ± 1,40	2321,48 ± 35,7

Em geral, pode-se afirmar que as técnicas de extração e condições de operação avaliadas influenciaram substancialmente na obtenção dos extratos. As extrações SOX, UAE e PLE, nesta ordem, foram as técnicas que apresentaram os maiores rendimentos em extrato, por outro lado, a solubilização dos compostos fenólicos foram maiores nas extrações UAE e PLE, conforme era esperado, os stress provocados na parede das células vegetais pelos efeitos do ultrassom e a lavagem constante da matéria-prima na PLE, permitiram uma maior liberação e solubilização desses compostos. Ainda, a extração SOX, executada em um período de tempo (360 min) bem superior as técnicas não convencionais, se mostrou mais eficiente na obtenção de maiores rendimentos em extratos, contudo, com seu conteúdo fenólico prejudicado.

O maior potencial de obtenção dos extratos e solubilização dos compostos fenólicos foi visualizado nas extrações com EtOH, indicando a presença de uma parcela significativa de compostos com características polares nas folhas. Entretanto, avaliando a determinação da concentração de vitamina E e friedelina nos extratos, quantificados até o momento, esses compostos estão presente em maior concentração nos extratos obtidos com AcEt na técnica PLE, provavelmente a temperatura elevada e a lavagem contínua das folhas contribuíram para uma maior recuperação.

A atividade antioxidante determinada pelo método de eliminação do radical DPPH foi maior nos extratos PLE, seguido SOX e UAE, enquanto, para o método FRAP os resultados mostraram que UAE > SFE-CO<sub>2</sub> > PLE-EtOH > SOX-EtOH. Conforme relatado anteriormente, sugerem que a atividade antioxidante dos extratos não dependem exclusivamente do CFT, mas também de outros constituintes químicos. Em avaliações preliminares os extratos supercríticos apresentaram em sua composição uma concentração maior de esqualeno e vitamina E (dados não mostrados), explicando em parte sua maior atividade antioxidante quando comparado aos extratos etanólicos PLE e SOX, ou seja, a composição química dos extratos acarreta em variações significativas na atividade antioxidante dos extratos.

Generalizando, dentre as técnicas avaliadas neste estudo. podemos considerar a UAE e PLE são as técnicas mais viáveis na obtenção dos extratos das folhas de *M. aquifolia*, ponderando CFT e atividade antioxidantes, pois requerem menos tempo, menor quantidade de solvente em comparação a extração SOX. Entretanto, se o propósito for obter extratos ricos em vitamina E, friedelina e esqualeno, as técnicas que operam em elevada pressão mostraram-se alternativas mais viáveis, sustentáveis e seletivas do que as técnicas SOX e UAE.

## 6 CONCLUSÕES

Em comparação ao método extração convencional por Soxhlet, as técnicas de extração assistidas por ultrassom e líquido pressurizado têm um potencial mais elevado para extrair níveis mais elevados de metabólitos bioativos das folhas de *Monteverdia aquifolia*. Os resultados obtidos indicam que essas técnicas foram capazes de aumentar os rendimentos e a qualidade dos extratos, com conteúdo fenólico e um nível significativamente mais elevado de atividade antioxidantes, utilizando etanol como solvente.

No quesito rendimentos a temperatura de 60 °C foi a mais favorável para a extração com o etanol pressurizado, entretanto, a maior qualidade foi exibida pelos extratos obtidos a 40 °C. Nas extrações assistidas por ultrassom a melhor condição de extração foi a 50 °C, 80% de amplitude e  $20 \text{ mL}_{EtOH} \text{ g}_{folha}^{-1}$ . Essas técnicas foram mais vantajosas necessitando de um menor tempo, temperatura e quantidade de solvente quando comparados a técnica convencional Soxhlet, evidenciando os benefícios da sua utilização para a obtenção de extratos de matrizes vegetais.

O delineamento Box-Behnken foi adequado para avaliar a influência das variáveis independentes no processo de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico. Os dados demonstraram que o rendimento aumentou principalmente pelos efeitos do aumento da pressão e vazão, enquanto, o efeito da temperatura dependeu da pressão de extração. Os rendimentos obtidos nas extrações supercríticas (CO<sub>2</sub>) foram os mais baixos entre as técnicas avaliadas, entretanto, é uma técnica mais limpa, opera em temperatura e tempos inferiores a técnica convencional, evitando a utilização de processos posteriores para remoção do solvente nos extratos. Nas extrações supercríticas com os cossolventes EtOH e AcEt não apresentaram os efeitos antevisto na literatura, de aumento do rendimento em extrato e aprimoramento da qualidade. O conteúdo fenólico e atividade antioxidante foram inferiores ao processo conduzido com CO<sub>2</sub> puro.

As curvas globais de extração supercríticas foram descritas de forma satisfatória pelo modelo de Sovová, o que pode fornecer informações úteis para o aumento de escala a compreensão das etapas do processo de extração.

As análises da composição química revelaram a presença de substâncias de alto poder biológico (esqualeno, vitamina E, friedelina). As análises de atividade antioxidantes indicaram uma melhora significativa nesse quesito nos extratos obtidos pelos métodos não convencionais. Assim, considerando que os extrato de espinheira santa já é uma realidade na indústria de fitoterápicos e de produtos naturais, os dados aqui reportados podem contribuir para diversificação, desenvolvimento e potencialização dos efeitos dos extratos das folhas de *Monteverdia aquifolia*, podendo esses extratos serem utilizados para a geração de outros produtos com valor agregado.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Quantificar a composição de taninos e flavonoides nos extratos;
- Comparar composição química e atividade antioxidante dos extratos obtidos pelos métodos não convencionais com os extratos secos e etanólicos disponíveis no mercado;
- Investigar maiores concentrações de cossolventes nas extrações supercríticas;
- Investigar a extração supercrítica com cossolventes em modo estático;
- Efetuar a modelagem das curvas cinéticas de extração supercríticas (cossolvente em modo estático);
- Aplicar novos modelos para descrever a cinética de extração;
- Avaliar o efeito do tamanho de partícula nas extrações supercríticas;
- Investigar o efeito do pulso na extração assistida por ultrassom;
- Investigar a extração estática nas extrações com líquido pressurizado;
- Avaliar e comparar com extratos secos padronizados já comercializados
- Investigar o efeito gastroprotetor dos extratos obtidos por métodos não convencionais de extração *in vivo* em ratos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAHARI, P.; JUG, M.; RADIĆ, K.; JURMANOVIĆ, S.; BRNČIĆ, M.; BRNČIĆ, S. R.; ČEPO, D. V. **Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction.** *Food Science Technology*, v.92, p.22-31, 2018.

AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. M. **Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.34, p.206-213, 2017.

ALLAIN, C. P.; MAHOMOODALLY, M. F.; GUNES AK, ZENGİN, G. **Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective.** *Current Opinion in Food Science*, v.40, p.144-156, 2021.

ALMEIDA, C.; BARBIERI, R. L.; RIBEIRO, M. V.; LOPES, C. V.; HECK, R. M. **Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.): saber de erveiros e feirantes em Pelotas (RS).** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.17, n°4, p.722-729, 2015.

ALMEIDA, R. N.; NETO, R. G.; BARROS, F. M. C.; CASSEL, E.; VON POSER, G. L.; VARGAS, R. M. F. **Supercritical extraction of *Hypericum caprifoliatum* using carbon dioxide and ethanol + water as cosolvent.** *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v.70, p.95-102, 2013.

ALVARENGA, N. & FERRO, E. A. **Bioactive triterpenes and related compounds from celastraceae.** *Studies in Natural Products Chemistry*, v.33, Part M, p.239-307, 2006.

ALVES, T. B.; MOREIRA, T. M. S.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. **Friedelin in *Maytenus ilicifolia* Is Produced by Friedelin Synthase Isoforms.** *Moléculas*, v.23, n°3, p.700, 2018.

ANDREU, V. & PICÓ, Y. **Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples.** *Trends in Analytical Chemistry*, v.118, p.709-721, 2019.

ANSARI, K. & GOODARZANIA, I. **Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using Taguchi methodology.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.67, p.123-130, 2012.

ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; ARAVINTHAN, A.; AL-DHABI, N. A.; IGNACIMUTHU, S.; CHOI, C. K.; KIM, J. **Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms.** *European Journal of Pharmacology*, v.750, p.167-175, 2015.

ANTUNES, E. R. M.; DUARTE, R. S.; MORITZ, T.; SAWAYA, A. C. H. F. **Differentiation of two *Maytenus* species and their hybrid via untargeted metabolomics.** *Industrial Crops and Products*, V.158, 113014, 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos: Farmacopeia Brasileira. 2° edição, Brasília, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-cap2.pdf>>. Acesso em: 16 de maio de 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Memento Fitoterápico: Farmacopeia Brasileira. 1º edição, Brasília, 2016. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/english/pharmacopeia/arquivos/memento-fitoterapico.pdf/view>>. Acesso em: 16 de maio de 2021.

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

ASSAMI, K.; PINGRET, D.; CHEMAT, S.; MEKLATI, B. Y.; CHEMAT, F. **Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds.** *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v.62, p.99-105, 2012.

AYBASTIER, Ö; IŞIK, E.; ŞAHİN, S.; DEMİR, C. **Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology.** *Industrial Crops and Products*, v.44, p.558-565, 2013.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. **Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review.** *Journal of Food Engineering*, v.117, n°4, p.426-436, 2013.

BABUJANARTHANAM, R.; KAVITHA, P.; RAO, US.M.; PANDIAN, M. R. **Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin: induced diabetic rat tissues.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.358, p.121-129, 2011.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, S. S.; OTOFUJI, G. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A. M.; VELA, M. S. **Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity and formation of nitric oxide.** *Journal of Ethnopharmacology*, v.113, p.433-440, 2007.

BARZOTTO, I. L. M.; SANTOS, K. A.; SILVA, E. A.; SENE, A. C.; SILVA, N. S.; VIEIRA, L. **Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and  $\alpha$ -tocopherol content.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.143, Pages 55-63, 2019.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos.** 2ª Ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1996, 299p.

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.

BERMEJO, D. V.; IBÁÑEZ, E.; REGLERO, G.; FORNARI, T. **Effect of cosolvents (ethyl lactate, ethyl acetate and ethanol) on the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of caffeine from green tea.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.107, p.507-512, 2016.

BERMEJO, D. V.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E.; REGLERO, G.; FORNARI, T. **Pressurized liquid extraction of caffeine and catechins from green tea leaves using ethyl lactate, water and ethyl lactate + water mixtures.** *Food and Bioproducts Processing*, v.96, p.106-112, 2015.



- BERNAL, J.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. **Advanced analysis of nutraceuticals.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.55, n°4, p.758-774, 2011.
- BIRAL, L.; SIMMONS, M. P.; SMIDT, E. C.; TEMBROCK, L. R.; BOLSON, M.; ARCHER, R. H.; LOMBARDI, J. A. **Systematics of new world *Maytenus* (Celastraceae) and a new delimitation of the genus.** *Sytematic Botany*, V.42, n°4, p.1-14, 2017.
- BOTH, S.; CHEMAT, F.; STRUBE, J. **Extraction of polyphenols from black tea - Conventional and ultrasound assisted extraction.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.21, n°3, p.1030-1034, 2014.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building.** Nova York: Editora Wiley, 1978.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde departamento de atenção básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Série A. Normas e Manuais Técnicos/ Cadernos de Atenção Básica; n°31. Brasília, 2012, 156 p.
- BRUNNER, G. **Gás Extraction. An Introduction to fundamentals of supercritical fluids and the applications to separation processes.** 1. ed. Darstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994. 387p.
- BRUNNER, G. **Supercritical fluids: Technology and application to food processing.** *Journal of Food Engineering*, v.67, n°1-2, p.21-33, 2005.
- BUSQUETS, A.; KEIM, V.; CLOSA, M.; DEL ARCO, A.; BORONAT, A.; ARRÓ, M.; FERRER, A. ***Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase.** *Plant Molecular Biology*, v.67, p.25-36, 2008.
- CALOU, I. B. F.; LIMA, L. A. R.; FERREIRA, J. A. N.; CERQUEIRA, G. S. **A atividade gastroprotetora da *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*.** *Revista saúde e ciência*, v.3, n°2, p.33-42, 2014.
- CALVO, E. T.; MORALES, D.; MARCO, P.; SÁNCHEZ, S.; BARREDA, S. G.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M.; VILLALVA, M.; SANTOYO, S.; RIVAS, C. S. **Screening of bioactive compounds in truffles and evaluation of pressurized liquid extractions (PLE) to obtain fractions with biological activities.** *Food Research International*, v.132, ID-109054, 2020.
- CAMPONE, L.; CELANO, R.; PICCINELLI, A. L.; PAGANO, I.; CARABETTA, S.; DI SANZO, R.; RUSSO, M. T.; IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; RASTRELLI, L. **Response surface methodology to optimize supercritical carbon dioxide/cosolvent extraction of brown onion skin by-product as source of nutraceutical compounds.** *Food Chemistry*, v.269, p.495-502, 2018.
- CANSIAN, R. L.; KUBIAK, G. B.; BORSATTI, L.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; ROMAN, S. S.; PAROUL, N.; SCHWANZ, M.; MANFREDINI, V.; MOSSI, A. J. **ANTIOXIDANT and genotoxic properties of *Maytenus dasyclada*: a comparative study in relation to *Maytenus* reference species.** *Brazilian Journal of Biology*, v.75, n°2, p.471-476, 2015.

- CENTENO, M. R. G.; KNOERZER, K.; SABAREZ, H.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C.; FEMENIA, A. **Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – a response surface approach.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.21, p.2176-2184, 2014.
- CHANG, F. R.; YEN, C. T.; EI-SHAZLY, M.; LIN, W. H.; YEN, M. H.; LIN, K. H.; WU, Y. C. **Anti-human coronavirus (anti-HCoV) triterpenoids from the leaves of *Euphorbia neriifolia*.** *Natural Product Communications*, v.7, n°11, 1415-1417, 2012.
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; MEULLEMIESTRE, A.; TURK, M.; PERINO, S.; TIXIER, A. S. F.; ABERT-VIAN, M. **Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.41, p.357-377, 2017a.
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRES, N. G.; MEULLEMIESTRE, A.; TIXIER, A. S. F.; VIAN, M. A. **Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.34, p.540-560, 2017b.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. **Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.18, n°4, p.813-835, 2011.
- CHIAPETTI, T. P.; MALAVASI, U. C.; BRAGA, G. C.; MALAVASI, M. M. **Effects of the extraction method and chromatographic separation solvent in the antioxidant activity of different species of “espinheira-santa”.** *Journal of Food Science and Technology*, v.56, p.5056–5062, 2019.
- CHIOU, K. H.; PHOON, M. C.; PUTTI, T.; TAN, B. K. H.; CHOW, V. T. **Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection.** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.9, n°, p.1-7, 2016.
- CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. **Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*.** *Carbohydrate Polymers*, v.78, n°2, p.361-363, 2009.
- CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. **HRGC-MS Analysis of Terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* (“Espinheira Santa”).** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.10, n°6, p.523-526, 1999.
- CORSINO, J.; ALÉCIO, A. C.; RIBEIRO, M. L.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; DUARTE, I. B.; FRANÇA, S. C. **Quantitative determination of maitenin and 22 $\beta$ -hydroxymaitenin in callus of *Maytenus aquifolium* (celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography.** *Phytochemical Analysis*, v.9, n°5, p.245-247, 1998.
- CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F.; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. **Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*.** *Phytochemistry*, v.55, n°7, p.741-748, 2000.

CORSINO, J.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, F. **Antioxidant Flavan-3-ols and Flavonol Glycosides from *Maytenus aquifolium***. *Phytotherapy Research*, v.17, p.913–916, 2003.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. **Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells**. *Toxicology in Vitro*, v.22, n°4, p.854-863, 2008.

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

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

DAS, P. R. & EUN, J. B. **A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract**. *Food Chemistry*, v.253, p.22-29, 2018.

DAVIES, K. M. & SCHWINN, K. E. Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis. In: ANDERSEN, Ø. M. & MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. 1 ed. CRC Press, 2006. Cap.3, p.143-201. Boca Raton/ Flórida.

DHAR, R. S.; KHAN, S.; KHAJURIA, R. K.; BEDI, Y. S. **Dynamics of squalene content in different tissues of Ashwagandha (*Withania somnifera* L. Dunal) during its growth phases**. *Industrial Crops and Products*, v.84, p.375-380, 2016.

DI STASI, L. C. & LIMA, C. A. H. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2° edição. São Paulo: UNESP 605 p. 2002.

DIAGONE, C. A.; COLOMBO, R.; LANÇAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. **CZE/PAD and HPLC-UV/PAD Profile of Flavonoids from *Maytenus aquifolium* and *Maytenus ilicifolia* “espinheira santa” Leaves Extracts**. *Chromatography Research International*, v.2012, ID 691509, p.1-7, 2012.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. **Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives**. *Pharmacological Research, Review*, v.112, p.4–29, 2016.

EL ASBAHANI, A., MILADI, K., BADRI, W., SALA, M., AÏT ADDI, E.H., CASABIANCA, H., EL MOUSADIK, A., HARTMANN, D., JILALE, A., RENAUD, F.N.R., ELAISSARI, A. **Essential oils: From extraction to encapsulation**. *International Journal of Pharmaceutics*, v.483, p.220-243, 2015.

EMATER – Instituto Paranaense de Assistência Técnica e extensão Rural. **Projeto Plantas Potenciais, Medicinais e Aromáticas**, 2015. Disponível em: <<http://www.emater.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=53>>. Acesso em: 19 de agosto de 2018.

ERKEY, C. Supercritical Fluids and Organometallic Compounds: From recovery of trace metals to synthesis of nanostructured materials. In: **Fundamental Aspects of Supercritical Fluids**. Oxford/ Inglaterra: Elsevier Science, 2011, p.11-19.

- FERARSA, S.; ZHANG, W.; MOULAI-MOSTEFA, N.; DING, L.; JAFFRIN, M. Y.; GRIMI, N. **Recovery of anthocyanins and other phenolic compounds from purple eggplant peels and pulps using ultrasonic-assisted extraction.** *Food and Bioproducts Processing*, v.109, p.19-28, 2018.
- FORMIGONI, M.; L. O. S.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. **Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals.** *Journal of Ethnopharmacology*, v.34, n°1, p.21-27, 1991.
- FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. **Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction.** *Journal of Chromatography A*, v.1250, p.34– 48, 2012.
- GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.; MIRA, L. CORVO, M. L. **Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids.** *Current Medicinal Chemistry*, v.15, p.1586-1605, 2008.
- GOMIDE, R. “Operações com sistemas sólidos granulares” Operações Unitárias, São Paulo 1983, p. 27.
- GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPPL, E. J.; DI STASI, L. C. **Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v.77, n°1, p.41-47, 2001.
- Green, D.W. & Perry, R.H., 2007. Perry's Chemical Engineers' Handbook, 8th ed. McGraw-Hill, New York.
- GUIMARÃES, L. D.; AMARAL, F. M.; SANTOS, N. B.; JOFFILY, A.; ANHOLETI, M. C. **A chemophenetic study of the genus *Maytenus* s.l. (Celastraceae): contribution to the rational search of its bioactive metabolites.** *Rodriguésia*, v.71, p.1-7, 2020.
- HAIDA, K. S.; HAAS, J.; LIMA, D. S.; HAIDA, K. Y.; SILVA, F. J.; LIMANA, S.; RODRIGUES, R. T. **Anti-oxidant activity and phenolic compounds of *Maytenus ilicifolia* and *maytenus aquifolium*.** *Revista Saúde e Pesquisa*, v.5, n°2, p.360-368, 2012.
- 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, Part B, p.1054-1063, 2016.
- HERREIRO, M.; PUYANA, M. C.; MENDIOLA, J. A.; IBAÑEZ. **Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds.** *Trends in Analytical Chemistry*, v.43, p.67-83, 2013.
- HOLNIK, P. R.; HUSSEIN, A. A.; SOUZA, B. M. C.; COLDEBELLA, P. F.; SHIMABUKU, R. S.; LEITE, N. K. **Comparação do teor de taninos entre duas espécies de espinheira-santa (*Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) cultivadas no Horto Medicinal do Refúgio Biológico Bela Vista - RBBV da Itaipu Binacional – Foz do Iguaçu, PR – Brasil.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.17, n°3, p.385-391, 2015.
- HUANG, Q.; LIU, X.; ZHAO, G.; HU, T.; WANG, Y. **Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production.** *Animal Nutrition*, v.4, n°2, p.137-150, 2018.

- J. A. MENDIOLA, M. HERRERO, A. CIFUENTES, E. IBAÑEZ. **Use of compressed fluids for sample preparation.** *Journal Chromatography A*, v.1142, n°1-2, p.234-246, 2007.
- JADHAV, D.; REKHA, B. N.; GOGATE, P. R.; RATHOD, V. K. **Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction.** *Journal of Food Engineering*, v.93, n°4, p.421-426, 2009.
- JIMÉNEZ, F. J. L.; SÁNCHEZ, J. L.; LINARES, I. O.; ROMÁN, D. A.; CARRETERO, A. S. **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.
- JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. **Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v.94, n°1, p.93-100, 2004.
- KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; FREITAS, G. B. L. **Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.15, n°2, p.280-286, 2013.
- KAVOURA, D.; KYRIAKOPOULOU, K.; PAPAEFSTATHIOU, G.; SPANIDI, E.; GARDIKIS, K.; LOULI, V.; ALIGIANNIS, N.; KROKIDA, M.; MAGOULAS. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.146, p.159-164, 2019.
- KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. **Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds.** *Molecules*, v.18, n°2, p.2328-2375, 2013.
- KIM, K. H. & HONG, J. **Equilibrium solubilities of spearmint oil components in supercritical carbon dioxide.** *Fluid Phase Equilibria*, v.164, n°1, p.107-115, 1999.
- KIMBARIS, A. C.; SIATIS, N. G.; DAFERERA, D. J.; TARANTILIS, P. A.; PAPPAS, C. S.; POLISSIOU, M. G. **Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*).** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.13, n°1, p.54-60, 2006.
- KIMURA, E.; ALBIERO, A. L. M.; CUMAN, R. K. N.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; OGA, S.; BERSANI-AMADO, C. A. **Effect of *Maytenus aquifolium* extract on the pharmacokinetic and anti-inflammatory effectiveness of piroxicam in rats.** *Phytomedicine*, v.7, n°2, p.117-121, 2000.
- KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNIA-JR, A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. **Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids.** *Journal of Food Engineering*, v.80, n°2, p.631-638, 2007
- KIYAMA, R. **Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications.** *European Journal of Pharmacology*, v.815, p.405-415, 2017.
- KLEIN, E. J.; SANTOS, K. A; PALÚ, F.; VIEIRA, M. G. A.; SILVA, E. A. **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, Pages 1-8, 2018.

- KOPCAK, U. & MOHAMED, R. S. **Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.34, n°2, p.209-214, 2005.
- KUMAR, N.; GUPTA, G.; ANILKUMAR, K.; FATIMA, N.; KARNATI, R.; REDDY, G. V.; GIRI, P. V.; REDDANNA, P. **15-Lipoxygenase metabolites of  $\alpha$ -linolenic acid, [13-(S)-HPOTrE and 13-(S)-HOTrE], mediate anti-inflammatory effects by inactivating NLRP3 inflammasome.** *Scientific Reports*, v.6, p.1 - 14, 2016.
- LANÇAS, F. M.; VILEGAS, J. H. Y.; VASCONCELOS, E. C.; CELEGHINI, R. M. S. **Novas aplicações de sistemas sfe "home made". Plantas medicinais brasileiras.** *Food Science and Technology*, v.14, n°4, 1997.
- LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. **Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n°8, p.3796-3801, 2001.
- LIMA, R. N.; RIBEIRO, A. S.; CARDOZO-FILHO, L.; VEDDOY, D.; ALVES, P. B. **Extraction from Leaves of *Piper klotzschianum* using Supercritical Carbon Dioxide and Cossolvents.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.147, p.205-212, 2019.
- LORENZÍ, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** São Paulo, SP: Instituto Plantarum, 642 p. 2002.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. **Flavonóides e seu potencial terapêutico.** *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, v.27, n°1-2, p.33-39, 2008.
- MADHAN, B.; SUBRAMANIAN, V.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. **Stabilization of collagen using plant polyphenol: role of catechin.** *Internacional Journal of Biological Macromolecules*, v.37, n°1-2, p.47-53, 2005.
- MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO<sub>2</sub> supercrítico: Desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos.** Campinas: UNICAMP, 2005. 190p. Tese (Doutorado).
- MARTINS, F. M. M. **Estudo da influência de fatores ambientais na composição química e atividades biológicas de *Xylopiá sericea* st. Hiii.** São Mateus: Universidade Federal do Espírito Santo, 2012, 88 p. Mestrado (Dissertação).
- MARTUCCIELLO, S.; BALESTRIERI, L. M.; FELICE, F.; ESTEVAM, C. S.; SANT'ANA, A. E. G.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. **Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation.** *Chemico-Biological Interactions*, v.183, n°3, p.450-454, 2010.
- MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. **Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.92, p.115-176, 2014.

- MELO; M. M. R.; MARTINS, P. F.; SILVESTRE, A. J. D.; SARMENTO, P.; SILVA, C. M. **Measurement and modeling of supercritical fluid extraction curves of *Eichhornia crassipes* for enhanced stigmasterol production: Mechanistic insights of the process.** *Separation and Purification Technology*, v.163, p.189-198, 2016.
- MENDOZA, M. P. G.; PRADO, F. A. E.; BASEGGIO, A. M.; BARBERO, G. F.; JUNIOR, M. R. M.; ROSTANGO, M. A.; MARTINEZ, J. **Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.119, p.9-16, 2017.
- MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA-JR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. **Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods.** *Bioresource Technology*, v.100, n°24, p.6615-6623, 2009.
- MINOZZO, M.; POPIOLSKI, A.; DAL PRÁ, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; MOSSI, A. J.; MAZUTTI, M. A. **Modeling of the overall kinetic extraction from *Maytenus aquifolia* using compressed Co<sub>2</sub>.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.29, n°4, p.835-843, 2012.
- MMA. Ministério do Meio Ambiente. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul. Brasília, 2011. Disponível em: <[https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora/Regiao\\_Sul.pdf](https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora/Regiao_Sul.pdf)>. Acesso em: 16 de maio de 2021.
- MOKRANI, A. & MADANI, K. **Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit.** *Separation and Purification Technology*, v.162, p.68-76, 2016.
- MOREIRA, T. M. S.; ALVES, T. B.; PINHEIRO, K. A.; FELIPPE, L. G.; LIMA, G. M. A.; WATANABE, T. F.; BARBOSA, C. C.; SANTOS, V. A. F. F. M.; LOPES, N. P.; VALENTINI, S. R.; GUIDO, R. V. C.; FURLAN, M.; ZANELLI, C. F. **Friedelin Synthase from *Maytenus ilicifolia*: Leucine 482 Plays an Essential Role in the Production of the Most Rearranged Pentacyclic Triterpene.** *Scientific Reports*, n°6: ID-36858, 2016.
- MOSCATO, E. M. & MACHIN, J. E. **Mother natural: Motivations and associations for consuming natural foods.** *Appetite*, v.121, p.18-28, 2018.
- MOSSI, A. J.; MAZUTTI, M.; PAROUL, N.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. **Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.** *Brazilian Journal Biology*, v.69, n°2, p.339-345, 2009.
- MOSSI; A. J.; MAZUTTI, M. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRAI, D.; OLIVEIRA, J. V.; DALLAGO, R.; ORLOV, O. L.; TREICHEL, H.; ECHEVERRIGARAYI, S.; NASCIMENTO-FILHO, I. **Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*.** *Química Nova*, v.33, n°5, p.1067-1070, 2010.
- MOUAHID, A.; DUFOUR, C.; BADENS, E. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction from endemic Corsican plants; comparison of oil composition and extraction yield with hydrodistillation method.** *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, v.20, p.263-273, 2017.

- MURADE, V.; WAGHMARE, A.; PAKHARE, D.; DICHAYAL, S.; PATIL, R.; WANJARI, M.; GURAV, S.; HASE, D. **A plausible involvement of GABAA/benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect of ethyl acetate fraction and quercetin isolated from *Ricinus communis* Linn. leaves in mice.** *Phytomedicine Plus*, v.1, n°3, ID-100041, 2021.
- NETO, L. G. & LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** *Química Nova*, v.30, n°2, p.374-381, 2007.
- NIERO, R.; ANDRADE, S. F.; FILHO, V. C. **A Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Plants of the Maytenus Genus.** *Current Pharmaceutical Design*, v.17, p.1851-1871, 2011.
- NOSSACK, A. C.; CELEGHINI, R. M. S.; LANÇAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. **HPLC-UV and LC-MS analysis of quinonemethides triterpenes in hydroalcoholic extracts of "espíneira santa" (*Maytenus aquifolium* Martius, Celastraceae) leaves.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.15, n°4, p.582-586, 2004.
- ODEH, I. C.; TOR-ANYIIN, T. A.; IGOLI, J. O.; ANYAM, J. V. **In vitro antimicrobial properties of friedelan-3-one from *Pterocarpus santalinoides* L'Herit, ex Dc.** *African Journal of Biotechnology*, v.15, n°14, p.531-538, 2016.
- OKANO, R. M. C. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol emend. Mol. (celastraceae) do Brasil extra-amazônico.** Campinas: UNICAMP, 1992. 253p. Tese (Doutorado).
- PALSIKOWSKI, P. A. **Avaliação de métodos de extração de compostos bioativos das folhas de pata de vaca (*Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*).** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2020, 153 p. Tese (Doutorado).
- 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*, v.98, n°10, p.2214-2226, 2020.
- 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, 2019.
- PAN, Z.; QU, W.; MA, H.; ATUNGULU, G. G.; MCHUGH, T. H. **Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.19, n°2, p.365-372, 2012.
- PANDEY, R. & SHRIVASTAVA, S. L. **Comparative evaluation of rice bran oil obtained with two-step microwave assisted extraction and conventional solvent extraction.** *Journal of Food Engineering*, v.218, p.106-114, 2018.
- PARK, H. S.; LEE, H. J.; HIN, M. H.; LEE, KW.; LEE, H.; KIM, YS.; KIM, K, O.; KIM, K. H. **Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide.** *Food Chemistry*, v.105, n°3, p.1011-1017, 2007.
- PAZ, T. A.; SANTOS, V. A. F. F. M.; INÁCIO, M. C.; DIAS, N. B.; PALMA, M. S.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. **Proteome profiling reveals insights into secondary metabolism**



in *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) cell cultures producing quinonemethide triterpenes. *Jornal de Biotecnologia Vegetal*, v.130, n°2, p.405-416, 2017.

PEDERSSETTI, M. M.; PALÚ, F.; SILVA, E. A.; ROHLING, J. H.; CARDOZO-FILHO, L.; DARIVA, C. **Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide.** *Journal of Food Engineering*, v.102, n°2, p.189-196, 2011.

PEREIRA, A. M. S.; JANUÁRIO, A. H.; QUEIROZ, M. E. E.; BIONDO, R.; FRANÇA, S. C. **Evaluation of *Maytenus aquifolia* Mart. and *Maytenus ilicifolia* Mart. chemotypes for tannins, total phenols and triterpenes.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.8, n°1, p.13-17, 2005.

PEREIRA, C. G. & MEIRELES, M. A. A. **Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives.** *Food Bioprocess Technolgy*, v.3, p.340–372, 2010.

PETIGNY, L.; ISSARTIER, S. P.; WAJSMAN, J.; CHEMAT, F. **Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.).** *International Journal of Molecular Sciences*, v.14, p.5750-5764, 2013.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; QUEIROZ, F.; BARBOSA, L. C. A.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L.; ANDRADE, M. A.; ZACARONI, L. M.; PIMENTEL, S. M. P. **Extracts from the leaves of *Piper piscatorum* (Trel. Yunc.) obtained by supercritical extraction of with CO<sub>2</sub>, employing ethanol and methanol as co-solvents.** *Industrial Crops and Products*, v.43, p.490-495, 2013.

PULLEN, C.; SCHMITZ, P.; MEURER, K.; BAMBERG, D. D.; LOHMAN, S.; FRANCA, S. C.; SCHLEGEL, B.; GROTH, I.; MÖLLMANN, U.; GOLLMICK, F.; GRÄFE, U.; LEISTNER, E. **New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae.** *Planta*, v.216, n°1, 162-167, 2002.

RACCHI, M. L. **Antioxidant defenses in plants with attention to *Prunus* and *Citrus* spp:** Review. *Antioxidants*, v.2, n°4, p.340-369, 2013.

RAFFA, D.; MAGGIO, B.; RAIMONDI, M. V.; PLESCIA, F.; DAIDONE, G. **Recent discoveries of anticancer flavonoids.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.142, p.213-228, 2017.

REIS, M, S. & SILVA, S. R. **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa.** 1ª edição. Brasília: IBAMA. 203 p. 2004.

REIS, P. M. C. L.; DARIVA, C.; VIEIRA, G. A. 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, 2016.

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. O. **Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil.** *Journal of Ethnopharmacology*, v.205, p.69-102, 2017.

RODRIGUEZ, J. M. F.; SOUZA, A. R. C; 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 cossolvent.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.135, p.25-33, 2018.

- SÁ, R. R.; MATOS, R. A.; SILVA, V. C.; CALDAS, J. C.; SAUTHIER, M. C. A.; SANTOS, W. N. L.; MAGALHÃES, H. L. F.; SANTOS-JÚNIOR, A. F. **Determination of bioactive phenolics in herbal medicines containing *Cynara scolymus*, *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss and *Ptychopetalum uncinatum* by HPLC-DAD.** *Microchemical Journal*, v.135, p.10-15, 2017.
- SAMARAM, S.; MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; GHAZALI, H. M.; BORDBAR, S.; SERJOUIE, A. **Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability.** *Food Chemistry*, v.172, p.7-17, 2015.
- SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. **Glicosídeo flavonóide de *maytenus aquifolium*.** *Phytochemistry*, v.49, n°1, p.237-239, 1998.
- SANTOS, K. A. **Estudo dos processos de extração do óleo de candeia (*Eremanthus erythropappus*) com fluidos pressurizados e solvente assistido por ultrassom.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2018, 120 p. Tese (Doutorado).
- 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.; KLEIN, E. J.; SILVA, C.; SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L. **Extraction of vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) root oil by supercritical CO<sub>2</sub>, pressurized-liquid, and ultrasound-assisted methods and modeling of supercritical extraction kinetics.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.150, p.30-39, 2019.
- SANTOS, P. H.; KAMMERS, J. C.; SILVA, A. P.; OLIVEIRAS, J. V.; HENSE, H. **Antioxidant and antibacterial compounds from feijoa leaf extracts obtained by pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction.** *Food Chemistry*, v.344, ID-128620, 2021.
- SANTOS, V. A. F. M.; SANTOS, D. P.; GAMBOA, I. C.; ZANONI, M. V. B.; FURLAN, M. **Evaluation of Antioxidant Capacity and Synergistic Associations of Quinonemethide Triterpenes and Phenolic Substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae).** *Molecules*, v.15, p. 6956 – 6973, 2010.
- SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, L. Y. **Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts.** *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, v.8, n°1, p.1-10, 2011.
- SERESHTI, H.; HEIDARI, R.; SAMADI, S. **Determination of volatile components of saffron by optimised ultrasound-assisted extraction in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry.** *Food Chemistry*, v.143, p.499-505, 2014.
- SHAN, W. G.; ZHANG, L. W.; XIANG, J. G.; ZHAN, Z. J. **Natural Friedelanes.** *Chemistry & Biodiversity*, v.10, n°8, p.1392-1434, 2013.

- SICAIRE, A. G.; VIAN, M. A.; FINE, F.; CARRÉ, P.; TOSTAIN, S.; CHEMAT, F. **Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.31, p.319-329, 2016.
- SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. C.; MAGALHÃES, P. P. **The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase.** *Experimental Parasitology*, v.130, n°3, p.183-188, 2012.
- SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. **Supercritical fluid extraction of bioactive compounds.** *Trends in Analytical Chemistry*, v.76, p.40-51, 2016.
- SINGLETON, V. L.; & ROSSI J. A. JR. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents.** *American Journal Enology Viticulture*, v.16, p.144-158, 1965.
- SOUSA, G. F.; AGUILAR, M. G.; DIAS, D. F.; TAKAHASHI, J. A.; MOREIRA, M. E. C.; VIEIRA-FILHO, S. A.; SILVA, G. D. F.; RODRIGUES, S. B. V.; MESSIAS, M. C. T. B.; DUARTE, L. P. **Anti-inflammatory, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of friedelanones from *Maytenus robusta* branches and isolation of further triterpenoids.** *Phytochemistry Letters*, v.21, p.61-65, 2017.
- SOUSA, G. F.; DUARTE, L. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; SILVA, G. D. F.; VIEIRA-FILHO, S. A.; SILCA, R. R.; OLIVEIRA, D. M.; TAKAHASHI, J. A. **New Triterpenes from *Maytenus robusta*: Structural Elucidation Based on NMR Experimental Data and Theoretical Calculations.** *Molecules*, v.17, n°11, p.13439-13456, 2012.
- SOUSA, G. F.; SOARES, D. C. F.; MUSSE, W. N.; POMPEU, N. F. L.; SILVA, G. D. F. F.; VIEIRAFILHO, S. A.; DUARTE, L. P. **Pentacyclic triterpenes from branches of *Maytenus robusta* and in vitro cytotoxic property against 4T1 cancer cells.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.25, n°8, p.1338-1345, 2014.
- SOUZA, M. C.; SILVA, L. C.; CHAVES, J. O.; SALVADOR, M. P.; SANCHES, V. L.; CUNHA, D. T.; CARNEIRO, T. F.; ROSTANO, M. A. **Simultaneous extraction and separation of compounds from mate (*Ilex paraguariensis*) leaves by pressurized liquid extraction coupled with solid-phase extraction and in-line UV detection.** *Food Chemistry: Molecular Sciences*, v.2, ID-100008, 2021.
- SOVOVÁ, H. **Broken-and-intact cell model for supercritical fluid extraction: Its origin and limits.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.129, p.3-8, 2017.
- SOVOVÁ, H. **Modeling the supercritical fluid extraction of essential oils from plant materials.** *Journal of Chromatography A*, v.1250, p.27-33, 2012.
- 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.
- SOXHLET, F. **Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes.** *Dinglers Polytechnisches Journal*, v.232, p.461-465, 1879.
- SUBASH-BABU, P.; LI, D. K.; ALSHATWI, A. A. **In vitro cytotoxic potential of friedelin in human MCF-7 breast cancer cell: Regulate early expression of Cdkn2a and pRb1, neutralize mdm2-p53 amalgamation and functional stabilization of p53.** *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.69, n°8, p.630-636, 2017.

- SUNIL, C.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A. **Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. Leaves.** *Food Chemistry*, v.139, n°1-4, p.860-865, 2013.
- SUO, J.; TONG, K.; WU, J.; DING, M.; CHEN, W.; YANG, Y.; LOU, H.; HU, W.; YU, W.; CANÇÃO, L. **Comparative transcriptome analysis reveals key genes in the regulation of squalene and  $\beta$ -sitosterol biosynthesis in *Torreya grandis*.** *Industrial Crops and Products*, v.131, p.182-193, 2019.
- TAVARES, G. R.; MASSA, T. B.; GONÇALVES, J. E.; SILVA, C.; SANTOS, W. D. **Assessment of ultrasound-assisted extraction of crambe seed oil for biodiesel synthesis by in situ interesterification.** *Renewable Energy*, v.111, p.659-665, 2017.
- TENA, M. T. **Pressurized Liquid Extraction.** In: Encyclopedia of Analytical Science – 3ed. Oxford: Elsevier, 2019.
- THIRUPATHI, A.; SILVEIRA, P. C.; NESI, R. T.; PINHO, R. A.  **$\beta$ -Amyrin, a pentacyclic triterpene, exhibits anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects on dimethyl nitrosamine-induced hepatic fibrosis in male rats (Article).** *Human and Experimental Toxicology*, v.36, n°2, p.113-122, 2017.
- TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. **Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis.** *Journal of Chromatography B*, v.846, n°1–2, p378-384, 2007.
- TIWARI, B. K. **Ultrasound: a clean, green extraction technology.** *Trends in Analytical Chemistry*, v.71, p.100-109, 2015.
- TONGNUANCHAN, P. & BENJAKUL, S. **Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation.** *Journal of Food Science*, v.79, p.1231-1249, 2014.
- VARGAS, H. I. C.; VARELA, L. I. R.; FERREIRA, S. R. S.; ALFONSO, F. P. **Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and cossolvents.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.51, n°3, p.319-324, 2010.
- VASCONCELOS, E. C.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. **Comparison of extraction and clean-up methods for the analysis of friedelan-3-ol and friedelin from leaves of *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae).** *Phytochemical Analysis*, v.11, p.247-250, 2000.
- VEGGI, P. C.; PRADO, J. M.; BATAGLION, J. A.; EBERLIN, M. N.; MEIRELES, M. A. A. **Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.89, p.68-77, 2014.
- VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. **Ultrasound assisted maceration: na original procedure for direct aromatization of olive oil with basil.** *Food Chemistry*, v.123, p. 905-911, 2010.
- VELLOSA, J. C. R.; BARBOSAI, V. F.; KHALIL, N. M.; SANTOS, V. A. F. M.; FURLAN, M.; BRUNETTII, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. **Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n°3, p.447-453, 2007.

- VELOSO, C. C.; SOARES, G. L.; PEREZ, A. C.; RODRIGUES, V. G.; SILVA, F. C. **Pharmacological potential of *Maytenus* species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.27, n°4, p-533-540, 2017.
- VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; CERVI, A. C. **High resolution gas chromatography analysis of 'espinheira santa' (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): Analysis of crude drug adulterations.** *Phytotherapy Research*, v.8, n°4, p.241-244, 1994.
- VILEGAS, W.; SANOMMIYA, M.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. **Isolation and Structure Elucidation of Two New Flavonoid Glycosides from the Infusion of *Maytenus aquifolium* Leaves. Evaluation of the Antiulcer Activity of the Infusion.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, n°2, p.403-406, 1999.
- VINATORU, M.; MASON, T. J.; CALINESCU, I. **Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials.** *Trends in Analytical Chemistry*, v.97, p.159-178, 2017.
- WANG, T.; GUO, N.; WANG, SX.; KOU, P.; ZHAO, CJ.; FU, YJ. **Ultrasound-negative pressure cavitation extraction of phenolic compounds from blueberry leaves and evaluation of its DPPH radical scavenging activity.** *Food and Bioproducts Processing*, v.108, p.69-80,2018.
- WEBER, L. D. **Composição química, atividade microbiana e atividade antioxidante de óleo essencial e diferentes extratos vegetais de *Prunus myrtifolia* (L) Urb.** Cascavel: Universidade do Oeste do Paraná, 2012, 56 p. Mestrado (Dissertação).
- WEN; C.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; DZAH, C. D.; ZANDILE, M.; DUAN, Y.; HAILE, M.; LUO, X. **Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.48, p.538-549, 2018.
- WONFOR, R.; NATOLI, M.; PARVEEN, I.; BECKMAN, M.; NASH, R.; NASH, D. **Anti-inflammatory properties of an extract of *M. ilicifolia* in the human intestinal epithelial Caco-2 cell line.** *Journal of Ethnopharmacology*, v.209, p.283-287, 2017.
- XU, B. J. & CHANG, S.K. C. **A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents.** *Journal. Food Science.* v,72, p.159–166, 2007.
- XU, G. B.; XIAO, Y. H.; ZHANG, Q. Y.; ZHOU, M.; LIAO, S. G. **Hepatoprotective natural triterpenoids.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.145, p.691-716, 2018.
- YAN, X. J.; GONG, L.H.; ZHENG, F. Y.; CHENG, K. J.; CHEN, Z. S.; SHI, Z. **Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment.** *Drug Discovery Today*, v.19, n°4, 2014.
- YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E. C.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C. **Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonoides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, n°2, p.162-168, 2005.
- ZABOT, G. L.; MORAES, M. N.; MEIRELES, A. A. **Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from botanic matrices: experimental data, process parameters and economic evaluation.** *Recent Patents on Engineering*, v.6, n°3, p.182-206, 2012.

ZHANG, L.; LIU, Z.; SUN, Y.; WANG, X.; LI, L. **Effect of  $\alpha$ -tocopherol antioxidant on rheological and physicochemical properties of chitosan/zein edible films.** *LWT - Food Science and Technology*, v.188, ID-108799, 2020.

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

ZYGLER, A.; SLOMIŃSKA, M.; NAMIEŚNIK, J. Theory of Extraction Techniques: Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec. *In: Pawliszyn, J. Comprehensive Sampling and Sample Preparation Analytical Techniques for Scientists.* Waterloo/Canada: Elsevier Science, 2012. p.65-82.

## ANEXOS – ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

Os artigos publicados que reportam o conteúdo desta tese foram:

ALVES, T. P.; TRIQUES, C. C.; PALSIKOWSKI, P. L.; SILVA, C.; FIORESE, M. L.; SILVA, E. A.; FAGUNDES-KLEN, M. R. **Improved extraction of bioactive compounds from *Monteverdia aquifolia* leaves by pressurized-liquid and ultrasound-assisted extraction: yield and chemical composition.** *The Journal of Supercritical Fluids*.

ALVES, T. P.; JOHAN, G.; TRIQUES, C. C.; SILVA, E. A.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; SUZAK, P. Y. R. **Mathematical modeling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Monteverdia aquifolia* Mart. Biral leaves: simple models approaching.** *Chemical Engineering Communications*.