

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

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA OBTENÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DAS FOLHAS DE *Echinodorus*
*macrophyllus***

LIZANA EMANUELE SILVA DE SOUZA

TOLEDO - PR – BRASIL

Setembro de 2021

LIZANA EMANUELE SILVA DE SOUZA

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA OBTENÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DAS FOLHAS DE *Echinodorus*
*macrophyllus***

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

Orientador: Prof. Dr. Edson da Silva
Co-orientadora: Dra. Katia Santos

TOLEDO - PR - BRASIL

Setembro de 2021

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Plantas Medicinais	14
3.2. <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Chapéu de couro)	15
3.2.1 Composição química do <i>Echinodorus macrophyllus</i>	16
3.2.2 Propriedades terapêuticas do <i>Echinodorus macrophyllus</i>	17
3.3 Propriedades das plantas medicinais	18
3.3.1 Efeito antioxidante	18
3.3.2 Efeito antimicrobiano	19
3.3.3 Efeito Anti-inflamatório	19
3.3.4 Esqualeno	20
3.4 Extração de compostos naturais	22
3.4.1 Extração convencional - Método Soxhlet	22
3.4.2 Extração assistida por ultrassom	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção e caracterização da amostra	27
4.1.1 Teor de clorofila e carotenoides	28
4.2 Obtenção dos extratos	29
4.2.1 Extração convencional - Método Soxhlet	29
4.2.2 Extração assistida por ultrassom	30
4.3 Caracterização química dos extratos	31
4.4 Determinação da atividade antioxidante dos extratos	32

4.4.1 Determinação pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	33
4.4.2 Quantificação dos compostos fenólicos	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1 Caracterização da amostra	37
5.1.1 Teor de clorofila e carotenóides	37
5.2 Extrações	39
5.2.1 Extração Convencional	39
5.2.2 Extração empregando ultrassom	40
5.3 Caracterização química dos extratos	48
5.4 Atividade Antioxidante	54
5.5 Atividade Antimicrobiana	62
5.6 Otimização dos resultados	64
6 CONCLUSÃO	65
7 REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Echinodorus Macrophyllus.....	15
Figura 2: Equipamento Soxhlet.	23
Figura 3: Extração Assistida por ultrassom.	25
Figura 4: Granulometria Echinodorus macrophyllus.	27
Figura 5: Curva de calibração para o padrão de Esqualeno.....	32
Figura 6: Curva padrão de Ácido Gálico. (Fonte: Autor).....	34
Figura 7: Curva de calibração de Ácido Gálico (Fonte: Autor).....	35
Figura 8: Cinética de extração assistida por ultrassom.	40
Figura 9: Extrações assistidas por ultrassom.	42
Figura 10: Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Razão Soluta/Solvente, Potência de Ultrassom e Temperatura no rendimento das extrações de Echinodorus Macrophyllus.....	43
Figura 11: Superfície de resposta para o rendimento da extração das folhas de Echinodorus macrophyllus em função das amplitudes e razões soluto/solvente empregadas.....	46
Figura 12: Superfície de resposta para o rendimento da extração das folhas de Echinodorus macrophyllus em função das amplitudes e temperaturas empregadas.	46
Figura 13: Superfície de resposta para o rendimento da extração das folhas de Echinodorus macrophyllus em função das razões soluto/solvente e temperaturas empregadas.	47
Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis razão Soluta/Solvente, potência de ultrassom e temperatura no teor de esqualeno das extrações de Echinodorus Macrophyllus.....	50
Figura 15: Superfície de resposta para o teor de esqualeno das folhas de Echinodorus macrophyllus em função das razões soluto/solvente e temperaturas empregadas.	52
Figura 16: Superfície de resposta para o teor de esqualeno das folhas de Echinodorus macrophyllus em função das razões soluto/solvente e potências empregadas.	53

Figura 17: Superfície de resposta para o teor de esqualeno das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> em função da potência e temperaturas empregadas.	53
Figura 18: Resultados das análises de teor de compostos fenólicos das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	55
Figura 19: Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis razão Soluto/Solvente, potência de ultrassom e temperatura no teor de compostos fenólicos das extrações de <i>Echinodorus Macrophyllus</i>	56
Figura 20: Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Razão Soluto/Solvente, Potência de Ultrassom e Temperatura na atividade antioxidante das extrações de <i>Echinodorus Macrophyllus</i>	57
Figura 21: Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> em função das razões soluto/solvente e temperaturas empregadas.	59
Figura 22: Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> em função das razões soluto/solvente e potência de ultrassom empregadas.	59
Figura 23: Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> em função da potência e temperaturas empregadas.	60
Figura 24: Superfície de resposta para a atividade antioxidante das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> em função das razões soluto/solvente e temperaturas empregadas.	60
Figura 25: Superfície de resposta para a atividade antioxidante das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> em função das razões soluto/solvente e potência de ultrassom empregadas.	61
Figura 26: Superfície de resposta para a atividade antioxidante das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> em função das temperaturas e potência de ultrassom empregadas.	61
Figura 27: Turbidez dos poços reservatórios (A: <i>Escherichia coli</i> ; B: <i>Staphylococcus aureus</i> e C: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>).	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Planejamento experimental empregando ultrassom.	31
Tabela 2: Curva padrão de Ácido Gálico.	34
Tabela 3: Teor de clorofila A e B e de carotenoides.	37
Tabela 4: Extração convencional - metodologia Soxhlet.....	39
Tabela 5: Avaliação das condições de extração empregando ultrassom.	42
Tabela 6: Análise de variância para predição do rendimento da extração das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> por meio da extração assistida por ultrassom.....	45
Tabela 7: Composição química dos extratos obtidos a partir das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	49
Tabela 8: Concentração de esqualeno nos extratos obtidos por ultrassom.	50
Tabela 9: Análise de variância para predição do teor de esqualeno da extração das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> por meio da extração assistida por ultrassom.....	52
Tabela 10: Atividade antioxidante e compostos fenólicos dos extratos das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> obtidos por extração assistida por ultrassom.....	54
Tabela 11: Análise de variância para predição do teor de compostos fenólicos das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> por meio da extração assistida por ultrassom.....	58
Tabela 12: Análise de variância para predição da atividade antioxidante da extração das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> por meio da extração assistida por ultrassom.....	58
Tabela 13: Concentração inibitória mínima (mg mL ⁻¹) frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
Tabela 14: Condições ótimas para obtenção do extrato de <i>Echinodorus macrophyllus</i> , de acordo com o estudo da desejabilidade.	64
Tabela 15: Resultados esperados nas condições ótimas para obtenção do extrato de <i>Echinodorus macrophyllus</i> , de acordo com o estudo da desejabilidade	64

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA OBTENÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DAS FOLHAS DE *Echinodorus
macrophyllus***

AUTOR: LIZANA EMANUELE SILVA DE SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON DA SILVA

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 03 de setembro de 2021.

RESUMO

As plantas medicinais têm provocado um grande interesse devido a presença de compostos com propriedades terapêuticas em sua composição. O chapéu de couro (*Echinodorus macrophyllus*) é uma planta medicinal comumente encontrada no Brasil e seus usos populares vão desde o tratamento de infecções até doenças como o reumatismo. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de extração das folhas de *Echinodorus macrophyllus*, observando a influência de fatores como temperatura, solvente, potência de ultrassom e razão soluto/solvente no rendimento final, no teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, bem como no teor de esqualeno e atividade antimicrobiana. Observou-se que a técnica de extração assistida por ultrassom apresentou diversas vantagens, principalmente pela redução no tempo de extração. O melhor rendimento de extração obtido foi de 10,93% com temperatura de 40°C, potência de ultrassom em 525 W e razão soluto/solvente de 30 mL por grama. Quanto a atividade antioxidante, o melhor extrato foi obtido nas condições de temperatura à 40°C, potência de ultrassom em 525 W e razão soluto/solvente de 10mL por grama, apresentando 52.95 mg EAG 100g⁻¹ de extrato e concentração de 0.555 mg mL⁻¹ necessária para inibir em 50% o radical DPPH. Todos os extratos apresentaram o composto químico esqualeno em sua composição química. A análise antimicrobiana mostrou que os extratos apresentaram

potencial fraco frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

EXTRACTION ASSISTED BY ULTRASOUND TO OBTAIN ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM THE LEAVES OF *Echinodorus macrophyllus*

AUTHOR: LIZANA EMANUELE SILVA DE SOUZA

SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON DA SILVA

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on september 3, 2021.

ABSTRACT

Medicinal plants have aroused great interest due to the presence of compounds with therapeutic properties in their composition. The “Chapéu de couro” (*Echinodorus macrophyllus*) is a medicinal plant commonly found in Brazil and its popular uses range from the treatment of infections to diseases such as rheumatism. Thus, the objective of this work was to evaluate the extraction process of *Echinodorus macrophyllus* leaves, observing the influence of factors such as temperature, solvent, ultrasound power and solute/solvent ratio on the final yield, phenolic compounds content and antioxidant activity, as well as in squalene content and antimicrobial activity. It was observed that the ultrasound-assisted extraction technique presented several advantages, mainly due to the reduction in extraction time. The best extraction yield obtained was 10.93% at a temperature of 40°C, ultrasound power of 525 W and a solute/solvent ratio of 30 mL per gram. As for antioxidant activity, the best extract was obtained under conditions of temperature at 40°C, ultrasound power at 525 W and solute/solvent ratio of 10mL per gram, presenting 52.95 mg EAG 100g⁻¹ extract and concentration of 0.555 mg mL⁻¹ required to inhibit the DPPH radical by 50%. All extracts had the chemical compound squalene in their chemical composition. The antimicrobial analysis showed that the extracts showed weak potential against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains.

1 INTRODUÇÃO

O interesse por obter produtos biológicos com valor agregado a partir de recursos naturais, principalmente das plantas, vem aumentando nas últimas décadas. Diversas plantas, conhecidas popularmente como plantas medicinais, são amplamente utilizadas no dia a dia para os mais diversos fins, que vão desde para tratamento de sintomas como dores de cabeça até para doenças mais sérias como câncer e diabetes. Nesse sentido, o número de estudos e pesquisas sobre esse assunto têm se intensificado, com o objetivo de comprovar as propriedades terapêuticas desses compostos. No Brasil, há uma enorme procura na identificação e caracterização de plantas com potencial propriedades medicinais (MACIEL *et al.*, 2002).

Após identificadas, selecionadas e classificadas, muitas dessas plantas com potencial medicinal devem ser submetidas a processos de extração para isolar e caracterizar compostos orgânicos específicos para avaliação de suas propriedades antioxidantes, antibacterianas ou analgésicas, entre outras (RIBEIRO *et al.*, 2008). A etapa de extração é extremamente importante, pois permite o isolamento das substâncias de interesse para posterior entendimento dos mecanismos que proporcionam as propriedades terapêuticas das mesmas.

Contudo, os processos de isolamento e separação dos compostos orgânicos de interesse farmacológico requerem técnicas específicas que garantam qualidade aos processos com preservação do bioproduto e elevado rendimento (AZWANIDA, 2015). Entre as técnicas mais utilizadas, podem ser citadas as técnicas de extração com solventes orgânicos, extração com micro-ondas, extração empregando ultrassom, extração com líquido pressurizado e extração com fluido supercrítico (HUIE, 2002). Convém destacar que a extração com solventes orgânicos é uma das técnicas mais utilizadas em larga escala para a obtenção de compostos de interesse das plantas medicinais, sendo a metodologia Soxhlet e a maceração as mais comumente utilizadas (AZWANIDA, 2015).

Tendo em vista os critérios de preservação do extrato ao longo das etapas de separação e purificação, além da melhora do seu rendimento efetivo, há a necessidade de estudos dos parâmetros ou variáveis dos processos, como o tipo

de solvente, tempo de extração, temperatura e pressão, de maneira a tornar-se possível a obtenção da melhor condição de extração do produto.

A espécie *Echinodorus macrophyllus* (nome popular de Chapéu de Couro) caracteriza-se por ser uma planta pantanosa e aquática, nativa do Brasil e com grande incidência nas regiões sul e sudeste do país (SOBRINHO & SILVA, 2007). Seu uso popular refere-se a tratamento dos sintomas de doenças como artrite, reumatismo, sintomas gastrointestinais, problemas nos rins, fígado e bexiga, infecções urinárias, além de também ser utilizada contra sífilis (VEIGA, 2012). Já puderam ser comprovadas suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, diurética, além de sua eficiência no tratamento de problemas nos rins. De acordo com Tanus-Rangel *et al.* (2010), os extratos das folhas de *Echinodorus macrophyllus*, obtidos a partir da maceração com solventes orgânicos, apresentaram em sua composição triterpenóides, esteróides, flavonas, flavonóis e xantonas.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é analisar a extração convencional a partir da metodologia Soxhlet utilizando etanol, hexano e acetato de etila como solventes e a extração assistida por ultrassom, bem como estudar quais as melhores condições para obtenção do extrato da *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu de Couro), avaliando sua atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos, composição química e o teor de esqualeno.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do solvente, temperatura, potência de ultrassom, razão entre massa de amostra e volume de solvente na extração das folhas de chapéu de couro (*Echinodorus macrophyllus*), bem como comparar a composição química, atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom e pelo método Soxhlet.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos de *Echinodorus macrophyllus* por métodos convencionais (Soxhlet) e não-convencionais (extração assistida por ultrassom) de extração, a fim de avaliar a eficiência de cada método, bem como identificar qual é o solvente mais indicado para cada processo;
- Avaliar o efeito dos parâmetros utilizados em cada método de extração sobre o rendimento e teor de compostos fenólicos. Na extração com Soxhlet, avaliar o efeito do solvente. Na extração assistida por ultrassom, avaliar o efeito do tempo, temperatura, potência de sonicação e razão entre massa de amostra e volume de solvente;
- Otimizar as condições de extração a fim de obter um maior rendimento e teor de compostos fenólicos utilizando o ultrassom;
- Determinar a composição química do extrato das folhas de chapéu de couro obtidos pelos diferentes métodos de extração por Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrofotômetro de Massas (CG-EM);
- Quantificar o composto químico esqualeno nas diversas amostras de extrato obtidos;
- Avaliar a capacidade antioxidante bem como o teor de compostos fenólicos dos extratos obtidos em ambos os métodos de extração.
- Avaliar a capacidade antimicrobiana dos extratos obtidos frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas Medicinais

As plantas são uma das formas mais antigas utilizadas para tratamento, cura e prevenção de doenças, simbolizando muitas vezes a única opção terapêutica disponível para muitas comunidades afastadas e populações carentes que não tem acesso facilitado a medicamentos e centros médicos (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2015). Os efeitos terapêuticos das plantas medicinais, popularmente conhecidos e divulgados, contribuem para o aumento do consumo de tais produtos, despertando o interesse científico no estudo de suas propriedades e constituintes químicos (MACIEL *et al.*, 2002).

Atualmente, as plantas medicinais podem ser facilmente encontradas, sendo comercializadas em supermercados, farmácias e lojas de produtos naturais. Nesses lugares, além de plantas nativas nacionais, também podem ser encontradas plantas medicinais de outras culturas e regiões, como por exemplo plantas nativas asiáticas, europeias, africanas, dentre outras (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

A extração dos compostos ativos amplamente presentes nas plantas medicinais tem se tornado cada vez mais popular, sendo estes utilizados como matéria prima para a produção de medicamentos, tornando-se uma alternativa à produção sintética dos mesmos. Muitos antibióticos, anticoagulantes, antimaláricos, laxantes, anti-inflamatórios podem ser produzidos a partir de plantas medicinais (SING, 2015).

Além do seu uso terapêutico, as plantas medicinais também podem ser utilizadas em indústrias alimentícias, de cosméticos e indústrias químicas. Dentre as plantas popularmente medicinais, existe uma grande parcela que ainda não foi investigada quanto às suas propriedades fitoquímicas, biológicas e farmacológicas (VASHIST & JINDAL, 2012).

No Brasil existe uma imensa variedade de plantas medicinais distribuídas entre as regiões, gerando uma diversidade genética de cerca de 350 a 550 mil espécies, sendo 55 mil destas catalogadas (CARNEIRO *et al.*, 2014). No entanto, apesar da grande biodiversidade, apenas cerca de 25% dos

medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil vêm de espécies medicinais existentes na América do Sul (CARVALHO *et al.*, 2008). Nesse sentido, há um crescente interesse no estudo das plantas medicinais nativas.

Muitos estudos comprovaram a presença de compostos químicos de interesse provindos de várias partes de plantas medicinais, como folhas, raízes, flores, casca e frutos (AKTHAR *et al.*, 2014). Propriedades químicas combatentes a doenças como malária e diabetes e até mesmo o câncer já puderam ser comprovadas, porém, as propriedades mais comumente encontradas em plantas medicinais referem-se a atividades antimicrobianas, anti-inflamatória, analgésica e presença de compostos antioxidantes.

3.2. *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu de couro)

A espécie *Echinodorus macrophyllus* pertence à família Alismataceae e ao gênero *Echinodorus*. As plantas pertencentes a esse gênero são, em sua maioria, aquáticas e pantanosas e têm folhas e inflorescências emersas a água. Sua ocorrência é restrita ao ocidente, sendo observadas sua presença desde os Estados Unidos até a Argentina (HAYNES & HOLM-NIELSEN, 1986). A figura a seguir apresenta a espécie *Echinodorus macrophyllus*.



Figura 1: *Echinodorus Macrophyllus*.

(Fonte: SOBRINHO & SILVA, 2017)

A espécie *Echinodorus macrophyllus* é nativa do Brasil, ocorrendo nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Seu nome popular é chapéu de couro devido a suas folhas ovaladas e levemente sagitadas, que se assemelham chapéus usados no nordeste do Brasil. Outros nomes também utilizados para designar essa planta são: chá de mineiro, chá de campanha, congonha do brejo, erva de bugre e erva do pântano (SOBRINHO & SILVA, 2007).

Popularmente, a infusão das folhas é utilizada no tratamento de artrite, reumatismo, sintomas gastrointestinais, problemas nos rins, fígado e bexiga, infecções urinárias, além de também ser utilizada contra sífilis (VEIGA, 2012). Já foram comprovadas as ações depurativas, anti-inflamatória, antimicrobiana e diurética do chapéu de couro, sendo identificados em sua composição taninos, flavonoides, triterpenos, glicosídeos, entre outros, responsáveis por tais propriedades (SOBRINHO & SILVA, 2007).

Os principais estudos desenvolvidos com o objetivo de comprovar as propriedades terapêuticas do chapéu de couro serão discutidos a seguir.

3.2.1 Composição química do *Echinodorus macrophyllus*

Alguns estudos já foram realizados com o objetivo de identificar as propriedades terapêuticas e composição química das folhas de *Echinodorus macrophyllus*.

Silva *et al.* (2013), realizou um estudo onde comparou a composição química do extrato das folhas de chapéu de couro quando submetido a radiação gama. Do extrato bruto (sem aplicação de nenhum tipo de radiação), observou-se que o principal grupo funcional do qual o mesmo era constituído foi de éster carboxílico (79,7%) seguido de derivados de carotenoides (4,3%) e diversos tipos de terpenos. As doses de radiação gama aplicadas diminuíram a concentração dos compostos na maioria dos casos.

Um estudo realizado por Tanus-Rangel *et al.* (2010) identificou os seguintes compostos nas folhas de *Echinodorus macrophyllus*: triterpenóides, esteroides, flavonas, flavonóis e xantonas. Eles ainda puderam isolar dois tipos de flavonas, identificadas como isovitexina e vitexina, atribuindo às mesmas as propriedades anti-inflamatórias da planta.

Fernandes et al. (2012) analisou a composição química do óleo essencial obtido a partir das folhas de *Echinodorus macrophyllus*. Dentre os compostos ali presentes, estava o diapol, uma substância conhecida por suas propriedades inseticidas e sinergismo com outras substâncias. O óleo apresentou também 2-tridecanona, um metabólito que tem função de sobrevivência e defesa da espécie, como toxicidade e repelência. Além destes, em sua composição estava também o óxido de cariofileno, que apresenta propriedades anti-inflamatórias, analgésica e anti úlcera (FERNANDES *et al.*, 2012).

3.2.2 Propriedades terapêuticas do *Echinodorus macrophyllus*

Conhecendo a composição química dos extratos de *Echinodorus macrophyllus*, alguns pesquisadores estudaram suas propriedades anti inflamatórias, antioxidante e antimicrobiana.

Silva *et al.* (2012) obtiveram frações fenólicas dos extratos de *Echinodorus macrophyllus*, que por sua vez indicaram a presença de uma grande quantidade de compostos fenólicos. Tais frações foram testadas quanto a sua atividade antioxidante e antimicrobiana, mostrando resultados positivos para as duas propriedades. Outro estudo de Silva *et al.* (2016) concluiu que o extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* apresenta alta atividade anti-inflamatória, sendo atribuída a essa propriedade ao conteúdo de flavonoides presentes no extrato.

Além disso, também já puderam ser comprovadas as propriedades do extrato contra a dor. De acordo com Fernandes *et al.* (2012), o óleo essencial obtido a partir das folhas de *Echinodorus macrophyllus* apresentou atividade antinociceptiva comprovada por meio do modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético.

As propriedades do extrato de *Echinodorus macrophyllus* no tratamento de doenças e problemas renais já foi comprovado em estudos anteriores. Portella *et al.* (2012) verificou a atividade diurética e nefroprotetora dos extratos brutos e atestou sua eficácia para este tipo de tratamento. Por sua vez, Vaz *et al.* (2015) avaliou a atividade anti-hiperuricêmica do extrato de *Echinodorus macrophyllus*. Ratos hiperuricêmicos foram tratados com o extrato e foi

observado diminuição nos níveis de ácido úrico e aumento da eliminação renal do mesmo, comprovando dessa forma as propriedades anti-hiperuricêmica do extrato de *Echinodorus macrophyllus*. Além disso, os extratos testados não apresentaram genotoxicidade e mutagenicidade nas doses testadas.

3.3 Propriedades das plantas medicinais

3.3.1 Efeito antioxidante

Se tratando da atividade antioxidante, a mesma é importante para evitar danos às células oxidativas, reduzindo a presença de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, além de apresentar função na preservação de alimentos (QADIR *et al.*, 2017). Por isso, os compostos antioxidantes são amplamente utilizados, tanto pela indústria farmacêutica como de alimentos. Dentre os mais utilizados, estão o hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA), sendo estes antioxidantes sintéticos. No entanto, tem-se observado que o uso de antioxidantes sintéticos pode provocar diversos efeitos colaterais à saúde. Devido a isso, existe uma crescente busca por alternativas naturais em substituição a estes compostos sintéticos (KRISHNAIAH *et al.*, 2011).

Os polifenóis foram identificados como um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante. Isso acontece devido às suas propriedades redutoras e estrutura química, que neutralizam e sequestram os radicais livres que fazem parte do processo oxidativo (SOUSA *et al.*, 2007). Muitas plantas medicinais são ricas em compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos, cumarinas, lignanas e ligninas, apresentando então múltiplos efeitos ao organismo, como a atividade antioxidante (SHARMA *et al.*, 2013).

Estudos realizados por QADIR *et al.*, (2017) mostraram que a presença de compostos fenólicos produziu elevada atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica contra microrganismos patogênicos de plantas medicinais, sendo elas a cebola (*Allium cepa*), alho (*Allium sativum*), hortelã (*Mentha spicata*), tomilho (*Thymus vulgaris*), carvalho (*Quercus*), aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) e gengibre (*Zingiber officinale*), sugerindo a utilização das mesmas no tratamento de infecções.

3.3.2 Efeito antimicrobiano

Os medicamentos antimicrobianos sintéticos podem produzir microrganismos cada vez mais resistentes e difíceis de combater. Devido a isso, há uma crescente busca por novos compostos, de origem natural, como alternativa para o tratamento de infecções (SILVA & FERNANDES, 2010).

Também já é conhecida a eficiência de plantas medicinais na inibição de uma ampla gama de microrganismos. A atividade antimicrobiana de extratos naturais se deve principalmente à sua capacidade de sintetizar compostos aromáticos, como fenóis ou derivados (SAKKAS & PAPADOPULOU, 2017). A presença de compostos ativos como quinonas, fenóis, alcaloides, flavonoides, terpenóides, taninos, lignanas, glucosinolatos proporcionam tais propriedades (CHANDRA *et al.*, 2017). O efeito antimicrobiano de plantas medicinais depende de quais compostos estão presentes na mesma, e isso pode influenciar na gama de microrganismos que podem ser combatidos.

Gupta *et al.* (2015), avaliou o potencial antimicrobiano do extrato obtido a partir das raízes de *Curcuma longa*, e observou a capacidade do rizoma em inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. RADAELI *et al.* (2016), comprovou que os extratos de *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Origanum majorana* L. (manjerona), *Mentha piperita* L. (hortelã-pimenta), *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e *Pimpinella anisum* L. (anis) possuem potencial antibacteriano.

3.3.3 Efeito Anti-inflamatório

O efeito inflamatório está relacionado com uma resposta do organismo a traumas, infecções e substâncias estranhas. Da mesma forma que já foi descrito para os outros efeitos, têm se buscado alternativas para o tratamento de tais respostas, já que medicamentos tradicionais podem causar efeitos colaterais, além de apresentar certa toxicidade (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006).

As plantas medicinais possuem diversos compostos que podem proporcionar efeitos terapêuticos. Dentre os principais compostos naturais com

propriedades anti-inflamatórias estão os alcaloides, glicosídeos, taninos, compostos fenólicos, antocianinas, esteróis e terpenos, que podem ser encontrados em diversas partes de plantas (VIKRANT & ARYA, 2011).

O Brasil, devido a sua grande diversidade de plantas medicinais, apresenta uma imensa variedade de plantas com propriedades medicinais. VARGAS *et al.*, (2016), por exemplo, estudou e comprovou o efeito anti-inflamatório de plantas provenientes da região amazônica, entre elas *Ptychopetalum olacoides* e *Calycophyllum spruceanum*.

3.3.4 Esqualeno

O esqualeno é um triterpeno sintetizado por plantas, animais, bactérias e fungos. Sua principal ocorrência é no óleo de fígado de tubarão e em espécies aquáticas. Porém também pode ser encontrado em plantas como azeite de oliva, óleo de palma, óleo de amaranto e óleo do farelo de arroz (KELLY, 1999). Este composto apresenta diversas propriedades terapêuticas, sendo bastante empregado na indústria farmacêutica, de cosméticos, no ramo de alimentos e comercial (LOZANO-GRANDE *et al.*, 2018).

Ibrahim *et al.* (2020), fez um levantamento dos principais estudos já realizados sobre as propriedades do esqualeno. Foram relatadas sua atuação na síntese do colesterol, propriedades anticancerígenas preventivas e combatentes, atuação frente a radicais livre, atuando como antioxidante tanto em alimentos como para a indústria de cosméticos e propriedades na melhora na imunidade.

Dentre as principais propriedades conhecidas do esqualeno, está seu poder frente ao câncer, atuando de forma preventiva e até interrompendo tumores já existentes (REDDY & COUVREUR, 2009). Segundo estudos de Newmark (1997), ao diminuir os níveis de farnesil pirofosfato, o esqualeno atuou impedindo a proliferação de células cancerígenas.

Além disso, sugere-se que o esqualeno tenha boas propriedades antioxidantes, reduzindo radicais livres presentes na pele e também nos olhos, indicando que uma dieta rica em esqualeno poderia ser interessante diante da exposição à radiação ultravioleta (KELLY, 1999). Owen *et al.* (2000), observou que o potencial antioxidante do azeite de oliva se dá pela concentração de

esqualeno combinado com outros compostos como polifenóis, ligninas, vitamina E e secoroides. No entanto, ainda existem poucos estudos com relação às propriedades antioxidantes do esqualeno em matérias vegetais, como plantas.

3.4 Extração de compostos naturais

A extração é uma das operações unitárias que envolve a transferência de massas e é caracterizada pela presença de sólidos solúveis e solvente (VEGGI, 2006). O soluto, que pode estar na fase líquida ou sólida, é transferido para o solvente e posteriormente é feita a separação de ambos (MARTINEZ, 2019).

Tratando-se de plantas medicinais, a extração consiste em uma etapa importante para obtenção e purificação dos compostos químicos. Tais compostos podem proporcionar propriedades terapêuticas e farmacológicas, sendo interessante sua obtenção no estudo de novos produtos.

É importante o estudo das técnicas de extração para melhorar o rendimento e obter bioprodutos sem comprometimento dos compostos de interesse. As técnicas de maceração e extração Soxhlet são as mais comuns, porém métodos mais modernos vêm sendo utilizados, como a extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom, extração com líquido pressurizado e extração supercrítica (AZWANIDA, 2015).

Se tratando de plantas medicinais, vale ressaltar que a etapa de preparo de amostras é também crucial para obtenção dos compostos de interesse. É importante a utilização de métodos modernos que tenham um consumo reduzido de solventes orgânicos, que não provoquem a degradação da amostra, que tenham facilidade de preparação e recuperação (HUIE, 2002).

3.4.1 Extração convencional - Método Soxhlet

O método de extração utilizando o aparelho Soxhlet é um dos mais comumente utilizados para extração à nível de pesquisa. Caracteriza-se por um instrumento engenhoso criado em 1879 por Franz von Soxhlet, que tinha o objetivo inicial de extração de lipídeos de materiais sólidos (RODRIGUES, 2015).

A extração Soxhlet é uma técnica padrão de extração sólido-líquido, que se baseia no fenômeno da transferência de massa entre o sistema, e, até hoje, serve de referência para o desenvolvimento de novos métodos.

A figura a seguir exemplifica o aparelho utilizado.

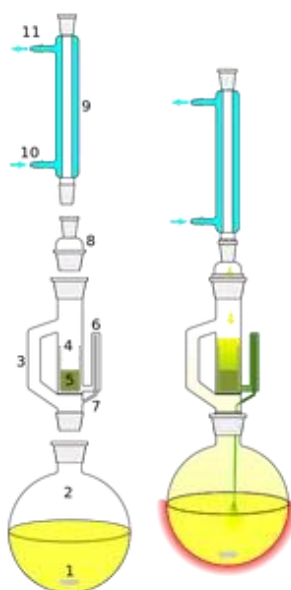


Figura 2: Equipamento Soxhlet.

(Fonte: RODRIGUES, J. <<https://www.fcencias.com/2015/01/15/soxhlet-laboratorio-online/>>, 2015)

Neste método, a amostra é inserida em um saco poroso, que é colocado no aparelho Soxhlet (5). O solvente de extração é aquecido em um balão de fundo chato (1) e quando atinge a temperatura de ebulição, ele é evaporado, passando pela tubulação lateral (3), sendo posteriormente condensado pela corrente de água fria contida no aparelho da parte superior (9). Com a condensação do solvente, o mesmo entra em contato com a amostra (4) extraindo os compostos de interesse. Esse contato acontece até que a mistura solvente/amostra ultrapasse a altura do sifão localizado no lado esquerdo do aparelho. Quando isto acontece, todo o volume de solvente condensado é transferido para o frasco destilador (SELLA, 2007).

Durante cada ciclo, uma porção de composto não-volátil dissolve-se no solvente. Após várias passagens do solvente pelo material sólido, o composto é concentrado no balão de destilação (AZWANIDA, 2015). Caracteriza-se por um processo contínuo que dura de 6 a 8 horas.

Com a amostra sendo colocada em contato com o solvente constantemente, o deslocamento da transferência de equilíbrio é facilitado. As altas temperaturas utilizadas para ebulição do solvente também proporcionam maior rendimento (DE CASTRO *et al.*, 2010).

Dentre as desvantagens deste método estão as altas temperaturas de operação necessárias, utilização de substâncias e solventes perigosos e com alto grau de pureza, que em seu descarte podem causar problemas ambientais e presença de resíduos orgânicos do solvente no extrato final. Também, é necessária uma etapa extra após a extração, que consiste na evaporação do solvente que restou em contato com a amostra (DE CASTRO *et al.*, 2010). Outro fator a se considerar é que a amostra deve apresentar-se como sólido seco, limitando sua utilização. Além disso, o tempo de extração é longo e as altas temperaturas podem provocar a degradação de compostos de interesse (AZWANIDA, 2015).

A extração utilizando o aparelho Soxhlet foi bastante útil para o desenvolvimento de melhoramentos em técnicas de extração, e recentemente essa técnica vem sendo combinada com outras, como por exemplo a extração por solvente assistida por micro-ondas, extração acelerada com solvente, extração ultrassônica, entre outras técnicas (SUBRAMANIAN *et al.*, 2016).

3.4.2 Extração assistida por ultrassom

Nos últimos anos vêm crescendo a utilização do ultrassom como método de extração, apesar de o mesmo já ser conhecido a muitas décadas. Os fenômenos base da técnica de extração por ultrassom são diferentes das técnicas convencionais. Este método geralmente proporciona maior produtividade, seletividade e rendimento, além de utilizar menor quantidade de solventes e diminuir o tempo de extração (CHEMAT *et al.*, 2011). Nesse sentido, podem-se destacar duas abordagens principais em sua utilização: frequência e poder de vibração ultrassônica (ESCLAPEZ, 2011).

Basicamente, dois tipos de equipamento ultrassom podem ser utilizados para extração. O primeiro deles refere-se aos banhos ultrassônicos, que são usados principalmente para limpeza, desgaseificação ou dispersão sólida em um solvente. O segundo método consiste na sonda ultrassônica, caracterizada por ser mais poderosa para o processo de extração devido a uma intensidade ultrassônica fornecida por uma superfície menor, resultando em uma entrega direta de ultrassom no meio reacional (ROMBAUT *et al.*, 2014).

A figura a seguir exemplifica os dois métodos de extração empregando o ultrassom.

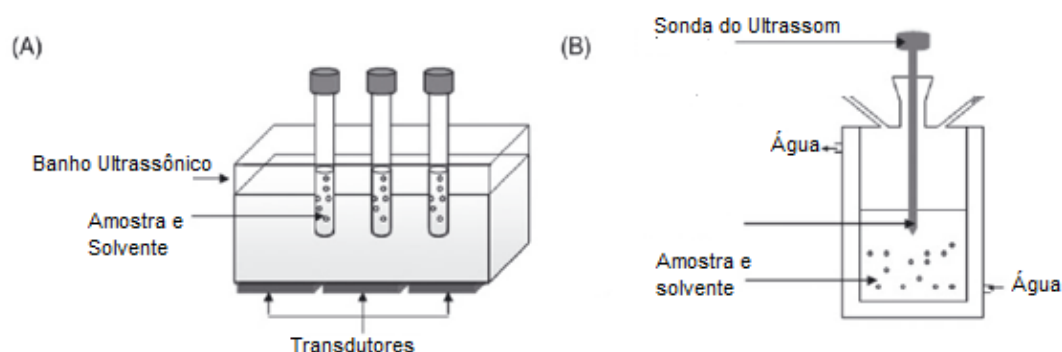


Figura 3: Extração Assistida por ultrassom.

A) Banho ultrassônico e B) Sonda ultrassônica.
(Fonte: ROMBAUT et al., 2014).

A fonte do ultrassom gera uma vibração, que por sua vez transfere energia para as partículas vizinhas. A potência do ultrassom pode ser entendida como o nível de energia com que as ondas de ultrassom se propagam através do meio. Essa técnica pode produzir efeitos que proporcionam a quebra da parede celular e exposição dos compostos de interesse (WEN *et al.*, 2018).

O sistema de extração de matéria vegetal empregando o ultrassom baseia-se no fato de que geralmente as células vegetais ocorrem na forma de grânulos com paredes muito finas e preenchidas com óleos, o que torna fácil sua destruição (HUIE, 2002). As ondas ultrassônicas provocam o inchaço da parede celular, que gera a quebra da mesma, facilitando o processo de extração (HUIE, 2002).

O ultrassom pode ser usado para extrair componentes bioativos como antioxidantes, óleo e corantes de produtos naturais (ROMBAUT *et al.*, 2014). Sua eficiência na extração de compostos bioativos, aliado ao menor consumo de solventes, baixos tempos de extração e alto rendimento classificam essa ferramenta como tecnologia verde, já que reduz impactos ao meio ambiente (MELLO, 2014).

Dentre os fatores que podem influenciar a extração por ultrassom, esta a potência ultrassônica. A potência escolhida determinará a intensidade da

cavitação no sistema, e deve ser analisada e otimizada de acordo com cada processo em particular (WEN *et al.*, 2018).

As ondas ultrassônicas podem alterar a temperatura do sistema, que por sua vez pode favorecer a solubilização dos compostos de interesse e economizar na quantidade de solventes utilizados. Além disso, a variação na pressão do sistema melhora a penetração do solvente na amostra e a cavitação da matriz sólida, reduzindo consideravelmente o tempo de extração quando comparado a outras técnicas (ESCLAPEZ *et al.*, 2011).

Outro parâmetro a ser considerado é o solvente utilizado, já que a cavitação do sistema pode ser influenciada pelas propriedades do mesmo. Deve-se considerar o tipo de solvente, quantidade, concentração e proporção entre o solvente e o soluto. Geralmente, utiliza-se a água, mas também podem ser utilizados etanol, metanol e hexano, além de outros solventes que podem melhorar o rendimento e extração (WEN *et al.*, 2018).

Nesse sentido, cada vez mais estudos vêm sendo realizados com o objetivo de extrair compostos de interesse de plantas medicinais, utilizando a tecnologia de extração assistida por ultrassom.

Carniel *et al.* (2018), realizou extrações assistidas por ultrassom utilizando o camapu (*Physalis angulata*) em diferentes condições para posterior análise do teor de compostos fenólicos, e pode ser observado o efeito da proporção soluto/solvente no sistema, além do efeito da temperatura nos resultados finais.

Maran *et al.* (2017), avaliou a extração de compostos bioativos do Rambutão (*Nephelium lappaceum*) observando o efeito da temperatura, potência do ultrassom, tempo e razão soluto/solvente. De acordo com essa técnica, puderam ser quantificados o teor de antocianinas, compostos fenólicos e flavonoides.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e caracterização da amostra

As folhas de *Echinodorus macrophyllus* foram obtidas por meio de uma empresa distribuidora de produtos naturais da cidade de Cascavel - Paraná. A matéria prima já se encontrava previamente seca e foi submetida ao processo de trituração e peneiramento a fim de diminuir o tamanho das partículas e aumentar a área de contato das mesmas com o solvente nas etapas posteriores. Para o trituramento da amostra, foi utilizado um liquidificador comum (Mondial - L-28).

Após triturada, foi realizada a análise granulométrica da amostra por meio do equipamento Produtest (TELASTEM). As partículas foram submetidas a agitação em peneiras, com variação de 12 até 60 mesh de abertura. A agitação das peneiras aconteceu durante cerca de 10 minutos. Após a agitação, a amostra retida em cada uma das peneiras foi pesada e o tamanho médio das partículas pode ser obtido. As frações de amostra retidas nas peneiras de 20, 24, 28 e 32 mesh foram selecionadas para serem utilizadas nas etapas posteriores de extração, já que apresentaram maior massa de amostra retida (82,2%).



Figura 4: Granulometria *Echinodorus macrophyllus*.

A amostra foi armazenada em sacos plásticos e mantida sob refrigeração para conservação de suas características até a realização das análises.

Após a trituração e peneiramento, 5 gramas de amostra, formada por partículas de pequeno diâmetro, foi distribuída uniformemente em placas de Petri cobertas com papel filtro para determinação de umidade. O conjunto foi colocado na estufa à 105°C (modelo TE-394/3 - TECNAL), sendo seu peso monitorado durante todo o tempo de secagem, até que fosse obtido peso constante. O procedimento foi realizado em triplicata.

O tempo de secagem foi de aproximadamente 24 horas, sendo que a perda de umidade pode ser calculada pela seguinte equação (1):

$$Perda (\%) = \frac{(P1-P2)}{P0} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

P0 = Peso da amostra

P1 = Papel filtro + Amostra inicial

P2 = Papel filtro + amostra final

Os procedimentos foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de perda $\pm$ desvio padrão.

4.1.1 Teor de clorofila e carotenoides

A quantificação do teor de clorofilas A e B, bem como do teor de carotenoides da amostra foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Wettstein (1959); Abou-Arab *et al* (2010) com modificações. Para tal, 5 gramas de amostra foi misturada com 30 mL de acetona 85% v/v e a solução foi guardada em frasco de vidro escuro e deixada em repouso, à temperatura ambiente (cerca de 25°C) por 15 horas. Passado esse tempo, a solução foi filtrada com lã de vidro em um balão volumétrico de 100 mL, sendo seu volume completado com acetona 85% v/v. Para a quantificação, realizou-se a leitura de

absorbância da solução final nas faixas de 440, 644 e 662 nm, por meio de um espectrofotômetro (UV-VIS Shimadzu 1800). Para a calibração, utilizou-se acetona 85% como branco.

O teor total de clorofilas A e B e de carotenoides, expressos em mg L⁻¹, foi calculado a partir das equações 2, 3 e 4 a seguir:

$$\text{Clorofila A} = (9,784 \times E_{662}) - (0,99 \times E_{644}) \quad (2)$$

$$\text{Clorofila B} = (21,426 \times E_{644}) - (4,65 \times E_{662}) \quad (3)$$

$$\text{Carotenóides} = (4,695 \times E_{440}) - 0,369 (\text{Clorofila A} + \text{Clorofila B}) \quad (4)$$

Onde:

E₆₆₂ = Absorbância da solução na faixa de 662nm.

E₆₄₄ = Absorbância da solução na faixa de 644nm.

E₄₄₀ = Absorbância da solução na faixa de 440nm.

Os resultados foram expressos em mg L⁻¹, sendo realizados em triplicata.

4.2 Obtenção dos extratos

4.2.1 Extração convencional - Método Soxhlet

Na primeira fase para obtenção dos extratos, realizou-se a extração convencional, com solventes orgânicos seguindo a metodologia Soxhlet. Foram realizadas extrações das folhas utilizando três solventes orgânicos, sendo eles acetato de etila, hexano e etanol.

Cerca de dez gramas (10 g) de folhas secas e trituradas de *Echinodorus macrophyllus* foram totalmente embrulhadas em papel filtro e colocada no aparelho Soxhlet. Além disso, 250 mL de solvente foram adicionados ao balão de fundo redondo para extração, que durou 6 horas. O tempo de extração foi definido para 6 horas uma vez que foi observado que tempos maiores de extração não provocaram aumentos significativos no rendimento. A extração aconteceu por meio da evaporação do solvente seguido da sua condensação e

gotejamento na amostra. A cada ciclo, uma certa quantidade de compostos de interesse presentes na amostra era solubilizada no solvente e extraída.

Após 6 horas de extração, a mistura de extrato e solvente foi transferida para uma placa de Petri e colocada em estufa à 65°C para evaporação do solvente e concentração do extrato de interesse.

O rendimento foi calculado de acordo com a seguinte equação (5):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

m1 = massa de amostra inserida;

m2 = massa de extrato obtido.

As extrações foram realizadas em duplicata e o rendimento foi descrito com média ± desvio padrão.

4.2.2 Extração assistida por ultrassom

Para a realização da extração não convencional empregando o ultrassom, utilizou-se o equipamento sonificador VCX 750 (SONICS), equipado com ponteira de titânio de 13 mm de diâmetro.

Inicialmente foram realizados testes de cinética de extração para a definição do tempo a ser utilizado nas etapas posteriores. Para isso, foram utilizadas as seguintes condições: etanol como solvente, temperatura de 50°C, razão massa de folha/volume de solvente de 1:20 e potência de ultrassom em 350 W. Além disso, realizou-se a cinética de extração nas mesmas condições, porém sem a presença da sonda ultrassônica. Foram realizadas extrações em triplicata nos tempos de 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos.

Após a definição do tempo de extração, avaliou-se o efeito das seguintes variáveis no rendimento: temperatura de extração, razão entre massa de folha e volume de solvente e potência de ultrassom. A temperatura durante o processo de extração foi controlada a partir da circulação de água, aquecida e bombeada

por um banho termostático modelo MA-184 (MARCONI) no reator encamisado. A tabela 1 a seguir apresenta as condições avaliadas durante a extração:

Tabela 1: Planejamento experimental empregando ultrassom.

Parâmetros	-1	0	1
Razão soluto/solvente (g mL)	1:10	1:20	1:30
Temperatura (°C)	40	50	60
Potência de ultrassom (W)	225	350	525

As condições avaliadas foram fixadas e definidas de acordo com trabalhos de extração similares. Foram realizados 8 ensaios em triplicata em um planejamento 2³, com ponto central, também em triplicata.

Após cada extração, o extrato líquido foi separado do resíduo sólido por filtração a vácuo. Em seguida, a mistura foi transferida para placas de Petri e colocada em estufa para evaporação do solvente, sendo que este processo ocorreu até obtenção de massa de extrato constante. Depois de determinada a massa de extrato obtida em cada extração, os extratos secos foram coletados e armazenados a temperaturas de -15°C.

4.3 Caracterização química dos extratos

A análise foi realizada em um cromatógrafo de gás (CG – EM QP2010 SE, Shimadzu) equipado com detector de ionização de chama. As amostras foram derivatizadas com bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida com trimetilclorossilano (BSTFA / TMCS) (Sigma-Aldrich) (60 °C e 30 min) e diluídas em etanol (Panreac) antes de serem injetadas em uma coluna NA-5 (Analítica, 5% de fenil – Metilsiloxano, 30 m × 0,25 mm id, 0,25 µm) usando amostrador automático (Shimadzu AOC – 20i). Em cada análise, a quantidade de amostra injetada foi de 2 µL com proporção de divisão de 40:1. A temperatura da coluna foi inicialmente programada para 150 °C, com aquecimento de 15 °C min⁻¹ a 280 °C onde permaneceu por 8 min. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas em 270 °C e 280 °C, respectivamente.

Para quantificar o conteúdo de esqualeno, foram construídas curvas de calibração do padrão cromatográfico deste composto (Sigma-Aldrich, > 98% de pureza) nas concentrações de 0,01 a 0,12 mg mL⁻¹, que apresentaram coeficiente de correlação (R^2) > 0,99, como pode ser observado na figura a seguir.

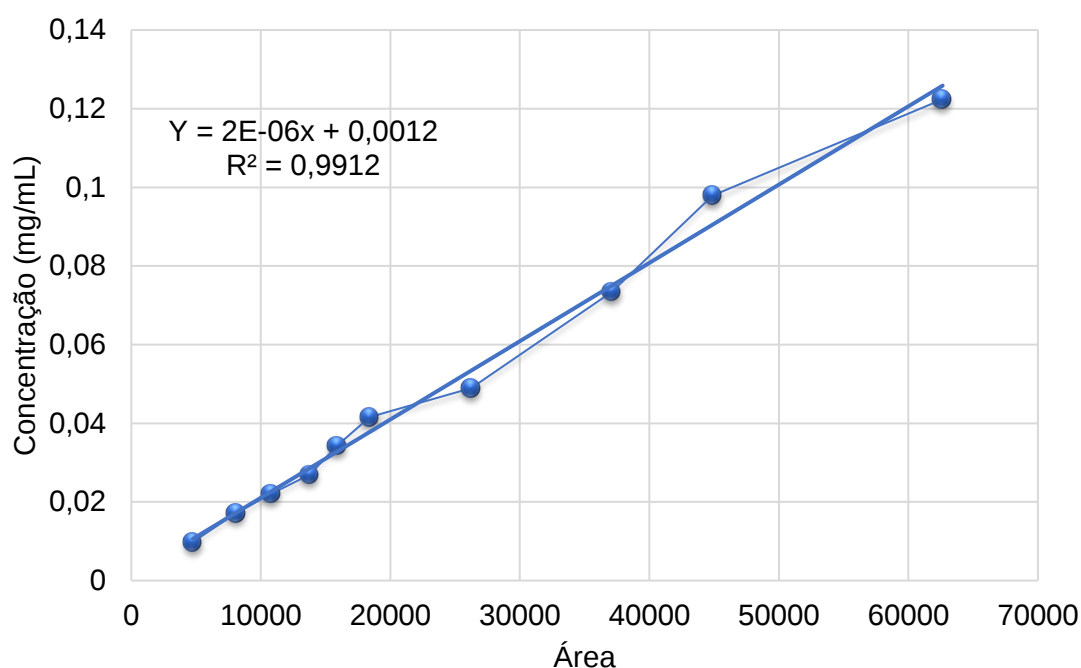


Figura 5: Curva de calibração para o padrão de Esqualeno.

4.4 Determinação da atividade antioxidante dos extratos

A atividade antioxidante dos extratos das folhas *Echinodorus macrophyllus*, obtidos por extração empregando ultrassom e extração por Soxhlet, foi determinada através do método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e também pelo método Folin-Ciocalteu, para determinação dos compostos fenólicos totais.

4.4.1 Determinação pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Nas análises realizadas utilizando o método DPPH, foi avaliada a capacidade de captura dos radicais livres pelo extrato obtido das folhas de *Echinodorus macrophyllus*, segundo metodologia descrita por Choi et al., (2002) com modificações.

Soluções dos extratos foram preparadas em concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em etanol. Para a reação, adicionou-se 3,9 mL da solução de DPPH 0,3 mM e 0,1 mL da solução amostra de cada diluição. Além disso, preparou-se uma solução controle, com 3,9 mL da solução de DPPH 0,3 mM e 0,1 mL de água destilada. Aguardou-se cerca de 45 minutos para que ocorresse a reação, e em seguida foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro (UV-VIS Shimadzu 1800) a 515 nm.

O procedimento foi realizado em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada segundo a equação 6:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = a absorbância da amostra

$\text{Abs}_{\text{controle}}$ = a absorbância da solução controle

Desse modo, construiu-se um gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração de extrato para cada condição de extração, com a finalidade de determinar o índice de IC_{50} (concentração necessária para inibir 50% do DPPH).

4.4.2 Quantificação dos compostos fenólicos

O teor dos compostos fenólicos total foi determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, seguindo metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965) com modificações. O procedimento foi feito em triplicata.

Para a quantificação total de fenóis de cada extrato, foi inicialmente preparada uma curva padrão com ácido gálico com concentrações variando de

5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como pode ser observado na tabela. A partir desta curva (Figura), foi possível obter sua equação e calculou-se o coeficiente de correlação (R^2). Os extratos foram dissolvidos em etanol, a fim de obter uma concentração de 1,0 mg mL^{-1} .

Tabela 2: Curva padrão de Ácido Gálico.

Concentração de Ácido Gálico ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 1)	Absorbância Média
5	0,0285
10	0,0595
20	0,1070
40	0,2565
60	0,3470
80	0,5215
100	0,5885

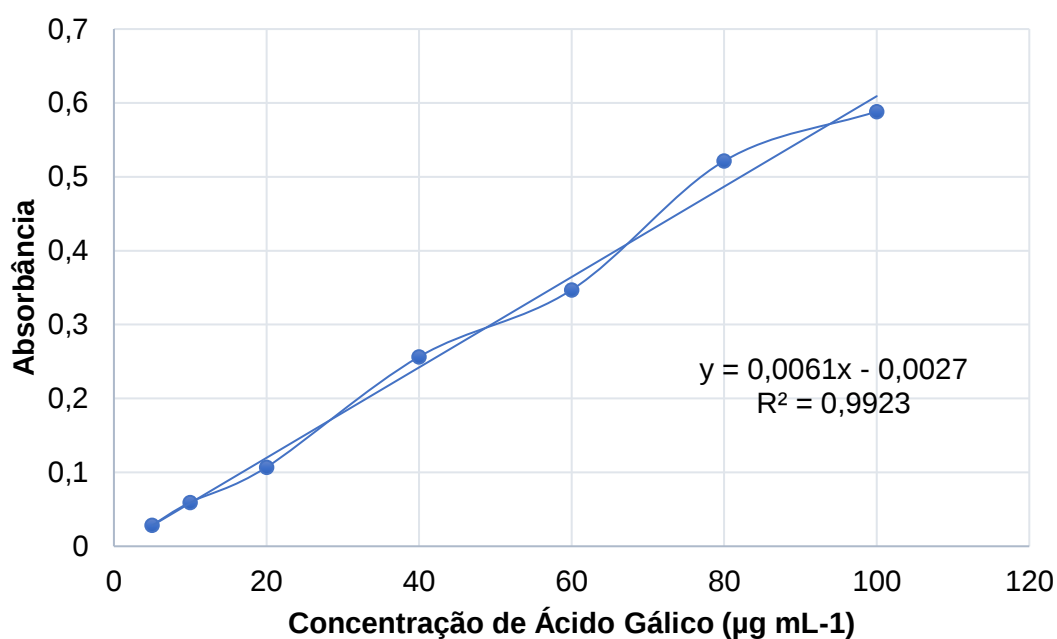


Figura 6: Curva padrão de Ácido Gálico. (Fonte: Autor).



Figura 7: Curva de calibração de Ácido Gálico (Fonte: Autor)

Para a reação, uma alíquota de 0,3 mL da solução etanólica de extrato foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 10 minutos em banho-maria (BIOPAR) a 50 °C. Posteriormente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV-VIS Shimadzu 1800) em 760 nm. O branco foi obtido substituindo-se o volume de amostra por água, mantendo-se as mesmas quantidades de reagente de Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio. Os resultados foram expressos em μg equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de amostra.

4.5 Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos

A atividade antimicrobiana dos extratos foi analisada a partir da metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM foi estabelecida através da técnica de diluição seriada em microplacas de 96 poços reservatórios, em triplicata, seguindo metodologia previamente descrita. Para o ensaio foram

utilizados os microrganismos: *Staphylococcus aureus* (NEWP 0023), *Escherichia coli* (ATTC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC 27853).

Acrescentou-se aos orifícios das microplacas 90 µL de caldo nutriente. A partir da segunda coluna, adicionou-se também 90 µL dos extratos preparados em concentração de 500 mg/mL. Em seguida, o mesmo foi uniformizado por três vezes, transferindo-se então, 90 µL para a terceira coluna e assim continuamente, até a décima primeira coluna.

Por fim, acrescentou-se aos orifícios da microplaca, da primeira à décima primeira coluna, 10 µL da suspensão de bactéria em água estéril na escala 0,5 de McFarland. Na presente pesquisa, como controle positivo, usou-se a primeira coluna (contendo caldo + bactéria) e como controle negativo foi utilizado a décima segunda coluna, que continha apenas caldo e o veículo de solubilização do extrato.

Seguidamente, ocorreu a incubação das microplacas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C. Ao final da incubação, o aparecimento de turvação indicou onde ocorreu a multiplicação bacteriana, enquanto que aqueles poços que permaneceram translúcidos demonstraram a ausência de multiplicação.

4.6 Análise estatística

As diferenças significativas entre as médias dos resultados experimentais, $p < 0,05$, de rendimento, teor de esqualeno, atividade antioxidante, e teor de compostos fenólicos totais foram analisadas pelo teste Tukey, empregando programa computacional Statistica 10.0 (STATSOFT, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização da amostra

As folhas de *Echinodorus macrophyllus* apresentaram umidade de $7,75 \pm 0,4\%$ e o diâmetro médio das partículas, calculado a partir das amostras retidas nas peneiras após a granulometria, foi de 0,661mm.

O teor de umidade da amostra pode influenciar no rendimento final da extração de compostos de interesse da mesma. Nagy & Simandi (2004) observaram que o teor de umidade entre 7 e 18% tem efeito insignificante na extração, sendo que umidades acima de 18% diminuem a eficiência geral do processo de extração. Também demonstraram que o tamanho de partícula tem uma grande influência sobre o rendimento da extração, sendo que partículas entre 0,1 e 0,7mm apresentam maior facilidade de remoção dos compostos de interesse. De acordo com esse estudo, o tamanho de partícula influencia na cinética de transferência de massa e acesso do solvente aos compostos solúveis da amostra.

5.1.1 Teor de clorofila e carotenóides

As folhas de *Echinodorus macrophyllus*, já recebidas secas do fornecedor e posteriormente trituradas, foram submetidas à análise para determinação do teor de clorofila A e B e de carotenoides, e os resultados podem ser observados na tabela a seguir.

Tabela 3: Teor de clorofila A e B e de carotenoides.

Composto	Concentração (mg L ⁻¹)
Clorofila A	$20,46 \pm 0,24$
Clorofila B	$9,05 \pm 0,40$
Carotenoides	$2,28 \pm 0,26$

*média $\pm$ desvio padrão

Outros autores aplicaram uma metodologia semelhante a essa para determinação de clorofila e carotenoides das folhas de stevia (*Stevia rebaudiana*). Abou-arab *et al.* (2010), observaram que o teor das clorofilas foi reduzido em quase 50% comparando-se folhas frescas e folhas secas, enquanto que o teor de carotenoides chegou a quase 75% de redução com a secagem.

Rajalakshmi & Banu (2013) avaliaram o teor de clorofila de diversas espécies vegetais antes da secagem, sendo que o maior teor de clorofila encontrado foi na espécie *Mimosa pudica* (39,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorofila A e 43,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorofila B), dentre todas as plantas por eles estudadas. Nesse mesmo estudo, o teor de carotenóides apresentado pelas plantas estudadas variou de 59,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ até 82,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, dependendo da espécie.

Kamble *et al.* (2015), avaliaram a diferença no teor de clorofila entre diversas espécies de plantas jovens e adultas da mesma espécie e puderam observar que a quantidade de clorofila tende a aumentar com a idade das plantas. Neste estudo, as folhas adultas de *Ficus benjamina* apresentaram um teor de 38,65 mg L^{-1} de clorofila total (A+B), enquanto que as folhas de *Polyalthia longifolia* apresentam um teor total de apenas 2,57 mg L^{-1} .

5.2 Extrações

5.2.1 Extração Convencional

As extrações das folhas de *Echinodorus macrophyllus* utilizando a metodologia Soxhlet foram realizadas em triplicata e avaliado o efeito do solvente no rendimento final. A tabela a seguir apresenta os resultados de rendimento obtidos:

Tabela 4: Extração convencional - metodologia Soxhlet.

Ensaio	Solvente	Índice de polaridade	Rendimento (%) *
1	Acetato de Etila	4,3	5,51 ± 0,02
2	Etanol	5,2	18,01 ± 0,84
3	Hexano	0,0	2,78 ± 0,11

*Valor médio ± desvio padrão.

Como pode ser observado na tabela acima, o solvente que apresentou melhor rendimento foi o etanol (18,01%). Isso pode ser justificado por sua alta polaridade, que possibilita uma maior solubilidade dos compostos orgânicos presentes no extrato. O hexano foi o solvente que apresentou menor rendimento (2,78%), devido principalmente por suas características apolares.

Kumoro *et al.* (2009), também observou que a polaridade do solvente utilizado na extração Soxhlet tem grande influência no rendimento final do extrato. Em seus estudos pode ser observado que, mesmo entre solventes de alta polaridade, como o metanol, etanol e água, há uma diferença no rendimento final, atribuída a características moleculares dos solventes.

Dessa forma, o solvente escolhido para as etapas posteriores de extração foi o etanol, devido ao seu alto rendimento obtido nas extrações convencionais utilizando a metodologia Soxhlet.

5.2.2 Extração empregando ultrassom

5.2.2.1 Cinética de extração

Para o estudo da influência do tempo na extração das folhas de *Echinodorus macrophyllus*, as condições utilizadas foram: temperatura de 50°C, razão soluto/solvente de 1:20 e potência de ultrassom em 350 W. A figura a seguir apresenta os resultados de cinética obtidos, com e sem a presença da sonda ultrassônica:

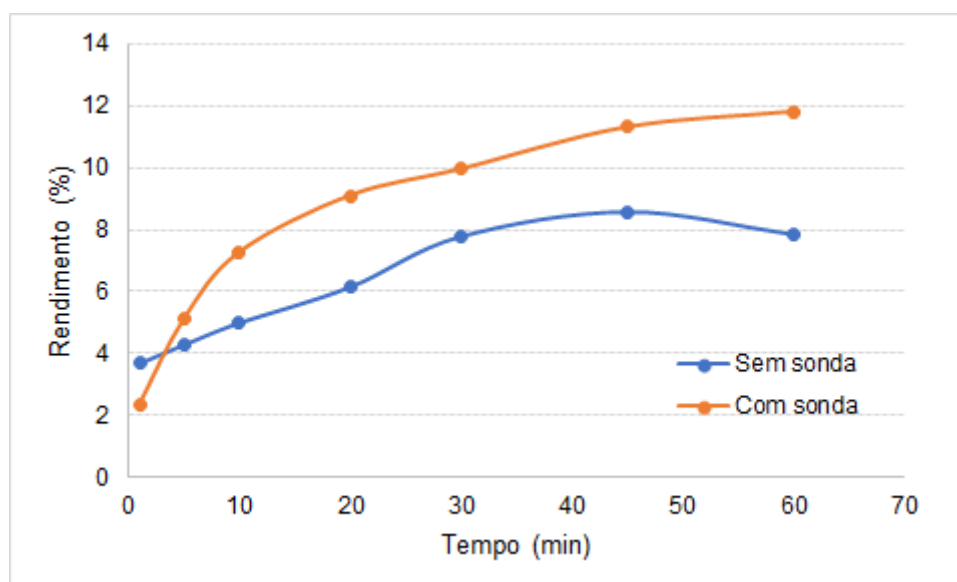


Figura 8: Cinética de extração assistida por ultrassom.

Observando a figura, nota-se que a presença da sonda ultrassônica aumenta significativamente o rendimento das extrações. O rendimento máximo obtido com o uso do ultrassom foi de 11,80%, no tempo de 60 minutos. Nesse mesmo tempo, sem a utilização da sonda, o rendimento foi de quase 8%. Quando comparamos à extração convencional utilizando a metodologia Soxhlet, o rendimento final obtido foi de 18,01%, depois de 360 minutos de extração. Além de o tempo para a obtenção do extrato ser muito maior, para essa técnica, faz-se necessária uma maior quantidade de solventes orgânicos.

Nos primeiros minutos de estudo da cinética de extração assistida por ultrassom, há uma elevada taxa de extração, que vai diminuindo em função do

tempo, até sua constância, sendo este comportamento observado em outros estudos de cinética de extração assistida por ultrassom já realizados. Lazar *et al.* (2016), variaram tempos de extração da casca do abeto (*Picea abies*) de 5 a 75 minutos, observando duas etapas de extração: uma etapa rápida, que ocorreu nos primeiros 20 minutos seguida de uma etapa de extração lenta, que chegou a uma concentração de equilíbrio no tempo de 40 minutos. Vetel *et al.* (2013), observaram o mesmo comportamento na extração de ácido ursólico do *Ocimum sanctum*. Para este caso, a taxa de extração teve grande aumento até os 4 minutos sendo alcançado o equilíbrio após 12 minutos de extração.

É de suma importância a realização do estudo do efeito “tempo” nesta etapa. Além do comportamento cinético já mencionado, os compostos de interesse presentes na amostra podem vir a ser degradados à medida que se aumenta o tempo de extração empregando ultrassom, sendo que, muitas vezes, o rendimento alcançado em um tempo maior de extração não compensa os custos operacionais de energia e processamento (ESCALPEZ *et al.*, 2011).

O esqualeno é um dos compostos de interesse presentes nas folhas de *Echinodorus macrophyllus*. Estudos realizados por Farjaminezhad & Garoosi (2020) concluíram que o conteúdo de esqualeno na cultura de suspensão de células de *Azadirachta indica* diminuiu com o aumento do tempo de exposição ao ultrassom, sendo o tempo ótimo obtido de 10 minutos.

Assim sendo, baseando-se na cinética de extração realizada e nos estudos anteriormente mencionados, o tempo de extração escolhido para dar seguimento às próximas etapas de extração foi de 10 minutos. Para esse tempo, a extração com sonda ultrassônica apresentou um rendimento 2,3% maior do que sem a presença da sonda, indicando que a potência de ultrassom apresenta resultados positivos na obtenção dos extratos.

5.2.2.2 Planejamento experimental

Para a avaliação de cada fator (razão soluto/solvente, temperatura e amplitude de ultrassom) no rendimento das extrações assistidas por ultrassom, realizou-se análise estatística a fim de concluir qual dos parâmetros possibilitou melhores resultados.



Figura 9: Extrações assistidas por ultrassom.

A tabela abaixo apresenta o rendimento obtido em cada um dos ensaios do planejamento experimental realizado:

Tabela 5: Avaliação das condições de extração empregando ultrassom.

Ensaio	Razão soluto/solvente (g mL ⁻¹)	Temperatura (°C)	Potência de ultrassom (W)	Rendimento (%)*
1	1:10	60	225	5,50 ± 0,26
2	1:10	60	525	6,42 ± 0,10
3	1:30	60	225	10,42 ± 0,38
4	1:30	60	525	10,84 ± 0,13
5	1:10	40	225	4,78 ± 0,31
6	1:10	40	525	6,42 ± 0,15
7	1:30	40	225	8,77 ± 0,51
8	1:30	40	525	10,93 ± 0,61
9	1:20	50	350	8,84 ± 0,06

*valor médio ± desvio padrão

Conforme observa-se na tabela, o maior rendimento de extração foi de 10,93%, obtido pelo ensaio 8, nas condições: 1 g de soluto para 30 ml de solvente, temperatura de 40°C e potência de ultrassom de 525 W. Por sua vez, o ensaio 5 apresentou o menor rendimento (4,78%), obtido utilizando-se a potência de ultrassom menor (225 W), maior concentração de amostra (1 grama de soluto para 10 mL de solvente) e menor temperatura 40°C.

Utilizou-se o programa Statistica 10.0 para a análise estatística dos efeitos, considerando o modelo linear e um intervalo de 95 % de confiança. Na figura a seguir, utilizando-se do Gráfico de Pareto, são apresentados os efeitos de cada variável estudada no rendimento global de extração das folhas de *Echinodorus macrophyllus*.

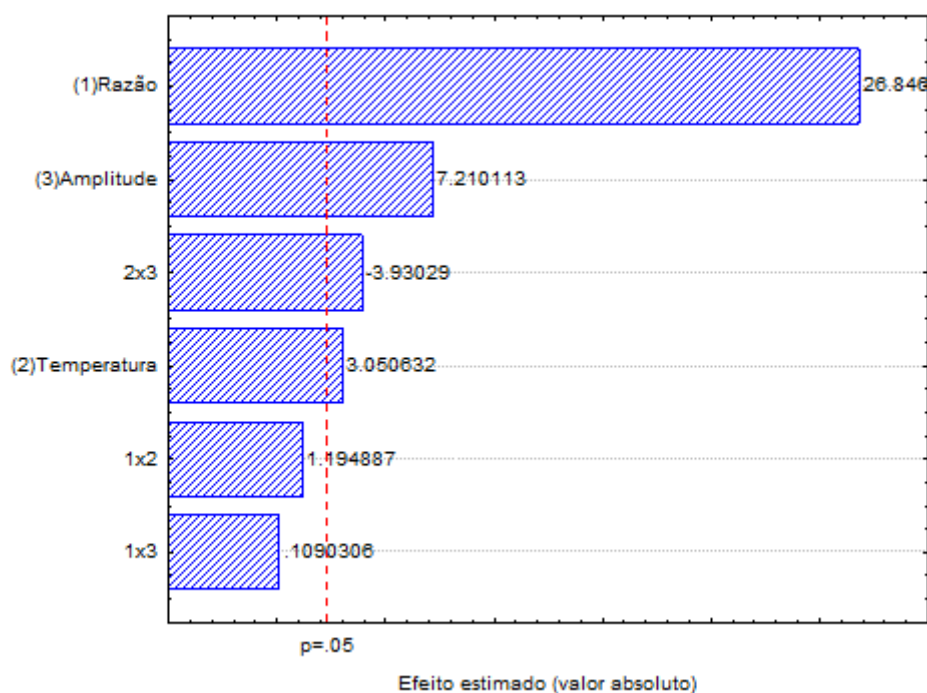


Figura 10: Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Razão Solute/Solvente, Potência de Ultrassom e Temperatura no rendimento das extrações de *Echinodorus Macrophyllus*.

Observa-se que as variáveis estudadas (razão soluto/solvente, potência de ultrassom e temperatura) apresentaram efeitos significativos sobre o rendimento, assim como a interação entre a temperatura e a potência de ultrassom ($p < 0,05$).

O aumento na quantidade de solvente de 1:10 até 1:30 provocou um maior efeito no rendimento final, como podemos observar comparando-se os ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7 e 6 e 8. Por exemplo, o ensaio 3, que tinha uma concentração menor de amostra (1:30) possibilitou melhores resultados no rendimento (10,42%) do que o ensaio 1 (5,50%) que tinha mais amostra (1:10), nas mesmas condições de temperatura e potência de ultrassom. Esse efeito pode ser explicado uma vez que quanto maior a quantidade de solvente, maior tende a ser a taxa de extração, devido ao alto gradiente de concentração entre o interior das células da planta e o exterior com solvente. Porém, essa situação aplica-se até certo ponto, já que se a solução estiver muito diluída, um aumento na quantidade de solvente não teria a capacidade de alterar significativamente a força motriz de extração, limitando o aumento do rendimento (SHIRSATH *et al.*, 2017).

O aumento da potência de ultrassom também apresenta efeito significativo positivo sobre o rendimento dos extratos finais. Uma vez que uma quantidade maior de energia ultrassônica é aplicada, maior é a cavitação do meio e consequentemente melhor será a penetração do solvente na matriz sólida. Esse processo facilita no transporte dos compostos de interesse para a solução (AHMAD-QSEM *et al.*, 2013). Sivacumar *et al.* (2007), também puderam observar um aumento em até 5 vezes no rendimento de extração de *Terminalia chebula* após aumentar a potência de ultrassom de 20 W para 100 W.

Por fim, a variável temperatura também apresentou efeito positivo no rendimento final das extrações, ainda que em menor escala. Essa característica já foi reportada por outros autores. Ma *et al.* (2008), estudando o processo de extração de flavonoides da casca de *Citrus reticulata*, observou que temperaturas maiores aumentaram o rendimento das extrações, porém, também propiciaram a evaporação do solvente utilizado. González-Centeno *et al.* (2015), observaram uma grande influência da temperatura no conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante do bagaço da uva, fator atribuído à melhor solubilidade dos analitos no solvente e melhores taxas de difusão na matriz sólida.

A validade do modelo foi verificada pela análise do teste F, mediante dados da análise de variância. O modelo é validado, ou seja, se ajusta aos dados experimentais, quando $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. O modelo obtido pela regressão linear

explicou 97,6 % das variações entre os valores experimentais e os previstos pelo mesmo, indicando uma boa concordância. A análise da estatística “F” é apresentada na Tabela a seguir e o modelo é dado pela Equação 7.

Tabela 6: Análise de variância para predição do rendimento da extração das folhas de *Echinodorus macrophyllus* por meio da extração assistida por ultrassom.

Causa de variação	Soma quadrática	GL ^a	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	90,762	6	15,127	103,610	3,37 ^b
Resíduo	1,315	9	0,146		
Falta de ajuste	0,406	1	0,406	3,561	5,32 ^c
Erro puro	0,909	8	0,114		
Total	92,077	15			
R ²	0,986		R ² ajustado	0,976	

^aGraus de liberdade;

^b F_{tabelado}(6;9;0,05);

^c F_{tabelado}(1;8;0,05).

$$Rend (\%) = -2,271 + 0,174R + 0,088T + 0,112A + 0,001RT + 0,00005RA - 0,002TA \quad (7)$$

Onde:

R = razão soluto/solvente (g mL⁻¹);

T = temperatura (°C);

A = potência de ultrassom (W).

Nas figuras a seguir são apresentados os efeitos da temperatura, amplitude de ultrassom e razão soluto/solvente no rendimento das extrações das folhas de *Echinodorus macrophyllus* a partir de superfícies resposta.

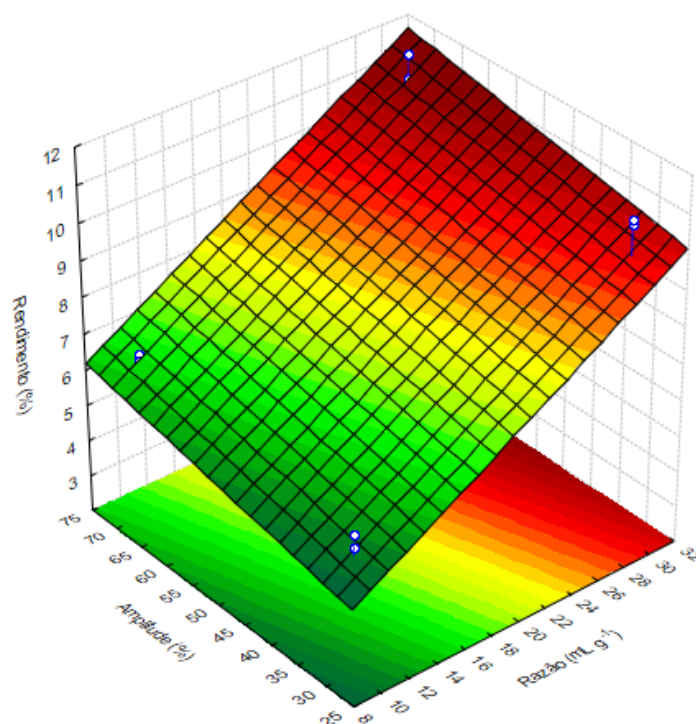


Figura 11: Superfície de resposta para o rendimento da extração das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das amplitudes e razões soluto/solvente empregadas.

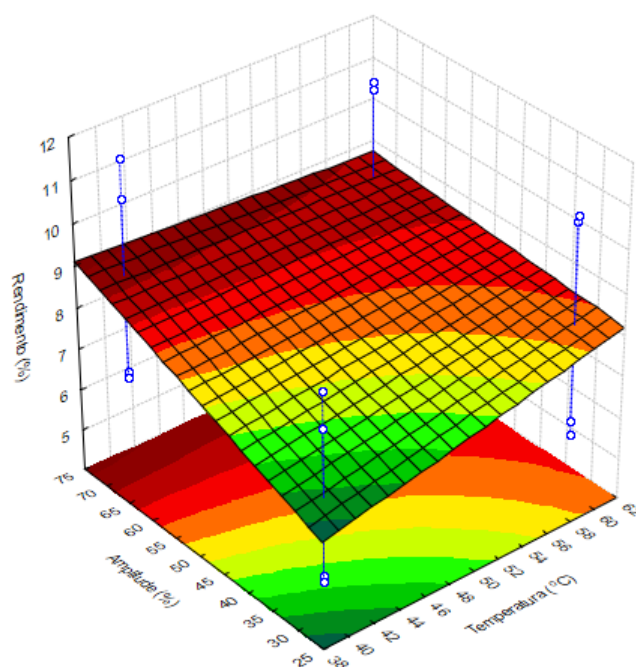


Figura 12: Superfície de resposta para o rendimento da extração das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das amplitudes e temperaturas empregadas.

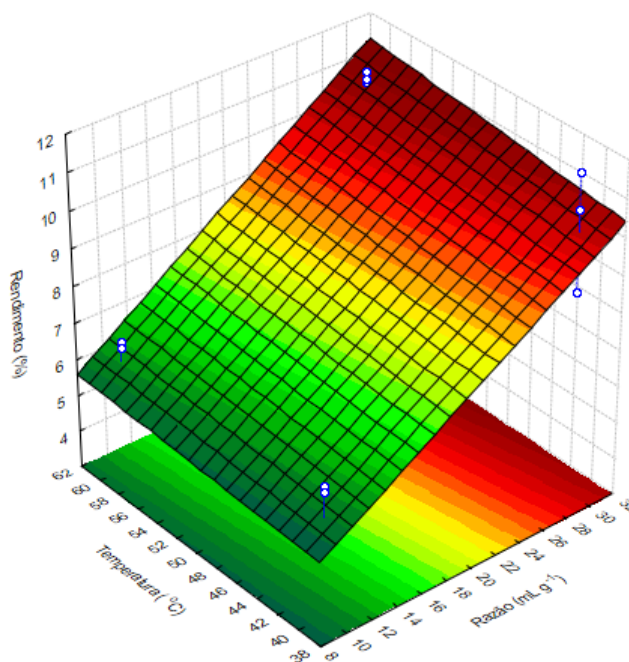


Figura 13: Superfície de resposta para o rendimento da extração das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das razões soluto/solvente e temperaturas empregadas.

Como puderam ser observadas nas figuras anteriores, os melhores resultados de rendimento foram obtidos quando utilizadas amplitudes de ultrassom maiores, bem como maiores temperaturas e concentrações de solvente, sendo que a variável razão soluto/solvente exerceu maior efeito no rendimento, conforme comprovado pela análise estatística apresentada anteriormente.

5.3 Caracterização química dos extratos

A composição química dos extratos foi obtida por meio de cromatografia gasosa, e pode ser observada na tabela 6.

Flor *et al.* (2010), ao estudar os grupos químicos presentes nos extratos de *Echinodorus macrophyllus* encontraram traços de alcaloides terciários, polifenóis, significativa presença de flavonas, cumarinas e derivados. Silva *et al.* (2013), encontraram nos extratos de *Echinodorus macrophyllus* alta quantidade de compostos derivados de éster carboxílicos e derivados de carotenoides. Observa-se que para cada tipo de extração realizada, diferentes compostos puderam ser extraídos, sendo que o esqualeno foi o composto presente em todos os ensaios realizados, variando sua concentração. Dessa forma, realizou-se a quantificação do composto químico esqualeno em cada extrato, como mostra a tabela 7.

Como podemos notar pela tabela 7, os ensaios 5 e 6 apresentaram uma concentração maior de esqualeno quando comparados aos outros. O ensaio 8, que apresentou o maior rendimento entre todas as condições, possuiu a concentração de 0,26 gramas de esqualeno a cada 100 gramas de extrato.

O esqualeno é um composto amplamente encontrado no fígado de animais marinhos, como o tubarão, onde a quantidade de esqualeno pode chegar até 79% do óleo total. As principais fontes vegetais do esqualeno são azeite de oliva, com quantidades de cerca de 564 miligramas de esqualeno a cada 100 gramas, óleo de soja (9,9 mg / 100 g), arroz, gérmen de trigo, óleo de semente de uva (14,1 mg / 100 g), amendoim (27,4 mg / 100 g), milho e amaranto (5942 mg / 100 g) (LOZANO-GRANDE *et al.*, 2018).

Owen *et al.* (2000), avaliaram a concentração de esqualeno em diversas variedades de azeites de oliva, constatando uma maior quantidade do composto em azeites de oliva extra virgens (424 mg/100g), quando comparados aos azeites refinados (340 mg/100g) e óleos de sementes (24 mg/100g).

Naziri *et al.* (2016), utilizaram a extração com fluido supercrítico a fim de extrair compostos de interesse da borra de vinho, sendo o esqualeno quantificado como 1,69% em peso do extrato obtido.

Tabela 7: Composição química dos extratos obtidos a partir das folhas de *Echinodorus macrophyllus*.

[illegible]

Tabela 8: Concentração de esqualeno nos extratos obtidos por ultrassom.

Ensaio	Razão (g sol/ml sol.)	Temperatura (°C)	Potência de ultrassom (W)	g Esqualeno/100g de extrato *
UAE-1	01:10	60	225	0,1993 ± 0,006
UAE-2	01:10	60	525	0,2541 ± 0,004
UAE-3	01:30	60	225	0,2365 ± 0,001
UAE-4	01:30	60	525	0,2294 ± 0,017
UAE-5	01:10	40	225	0,3795 ± 0,013
UAE-6	01:10	40	525	0,3556 ± 0,001
UAE-7	01:30	40	225	0,3092 ± 0,015
UAE-8	01:30	40	525	0,2627 ± 0,009
UAE-9	01:20	50	350	0,2897 ± 0,026

*valor médio ± desvio padrão

Segundo a análise estatística realizada, a variável temperatura e a interação entre temperatura e razão soluto solvente apresentaram efeitos significativos no teor de esqualeno dos extratos obtidos a partir das folhas de *Echinodorus macrophyllus*, como pode ser observado na figura a seguir.

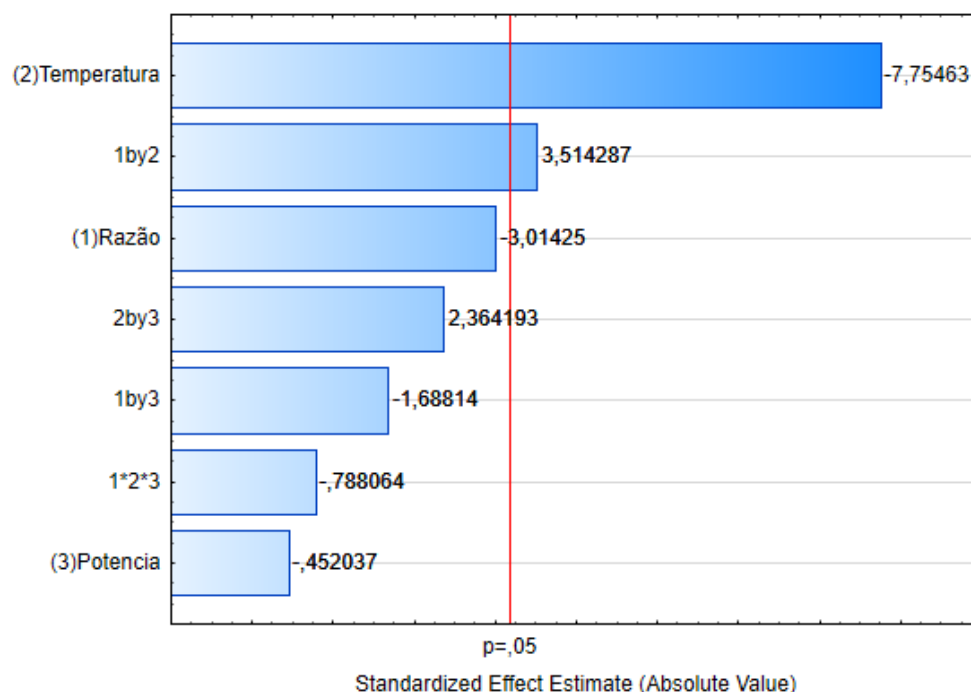


Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis razão Solute/Solvente, potência de ultrassom e temperatura no teor de esqualeno das extrações de *Echinodorus Macrophyllus*.

Podemos observar que a temperatura tem um efeito significativo negativo no teor de esqualeno, já que maiores teores de esqualeno puderam ser obtidos quando a temperatura utilizada era mais baixa (40°C). Esse efeito pode ser observado quando comparamos, por exemplo, os ensaios 2 e 6. Mantendo as mesmas condições de razão soluto/solvente e potência de ultrassom e variando a temperatura de 60°C para 40°C observa-se um aumento de quase 40% no teor de esqualeno. Esses resultados sugerem que temperaturas mais altas tendem a degradar o composto esqualeno presente nos extratos. He *et al.* (2003), ao extrair óleo da semente de amaranto por meio de fluido supercrítico, observou que o aumento da temperatura, combinado com diferentes condições de pressão tende a diminuir o teor de esqualeno. Neste estudo, observaram que temperaturas entre 40°C e 50°C favoreciam a extração deste composto, sendo que puderam ser obtidos 0,31g de esqualeno / 100 g de grão nas condições de a 50 ° C e 200 bar.

No entanto, Wejnerowska *et al.* (2013), observaram um comportamento oposto quando realizada a extração das sementes de amaranto por meio de fluido supercrítico. Neste caso, o óleo da semente de amaranto obtido por esse método teve um maior teor de esqualeno na temperatura de 130°C quando utilizada a pressão de 20 MPa. Já operando o sistema à 30 MPa, não puderam ser observados aumentos significativos no teor de esqualeno com o aumento da temperatura.

A validade do modelo foi verificada pela análise do teste F, mediante dados da análise de variância. O modelo é validado, ou seja, se ajusta aos dados experimentais, quando $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. O modelo obtido pela regressão linear explicou 96,8% das variações entre os valores experimentais e os previstos pelo mesmo, indicando uma boa concordância. A análise da estatística “F” é apresentada na tabela a seguir.

Tabela 9: Análise de variância para predição do teor de esqualeno da extração das folhas de *Echinodorus macrophyllus* por meio da extração assistida por ultrassom.

Causa de variação	Soma quadrática	GL ^a	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,0283	6	0,0047	39,6784	3,3738 ^b
Resíduo	0,0011	9	0,0001		
Falta de ajuste	0,0002	1	0,0002	1,7757	5,3177 ^c
Erro puro	0,0009	8	0,0001		
Total	0,0293	15			
R ²	0,9680				

^aGraus de liberdade;

^b F_{tabelado}(6;9;0,05);

^c F_{tabelado}(1;8;0,05).

As figuras a seguir apresentam as superfícies respostas obtidas a partir da análise estatística dos dados de teor de esqualeno dos ensaios realizados:

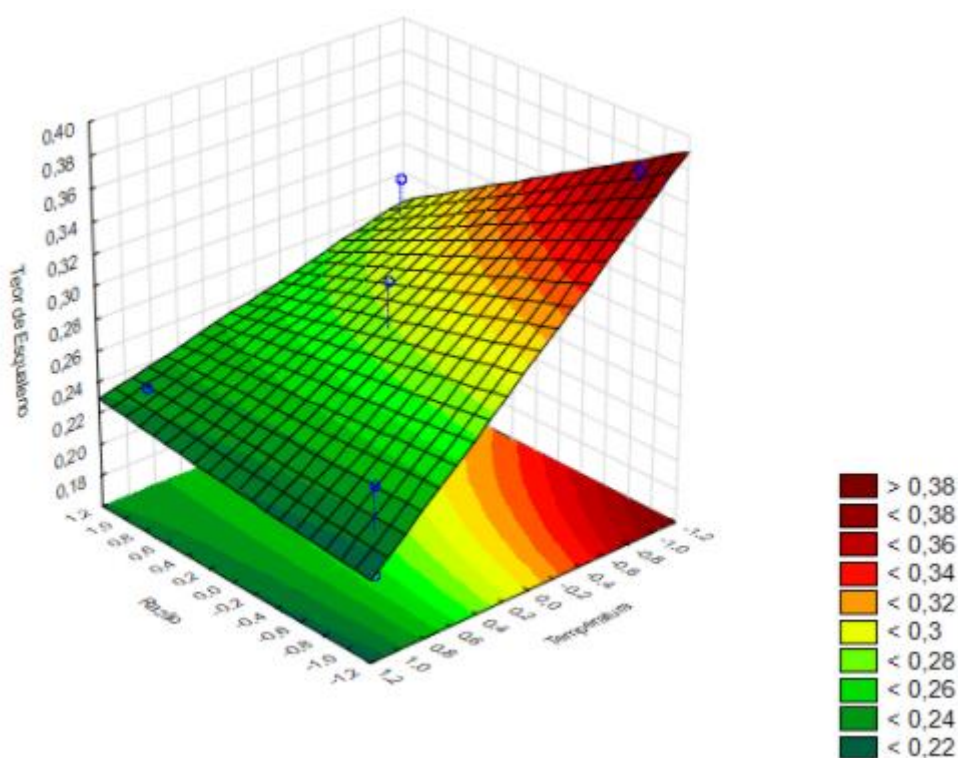


Figura 15: Superfície de resposta para o teor de esqualeno das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das razões soluto/solvente e temperaturas empregadas.

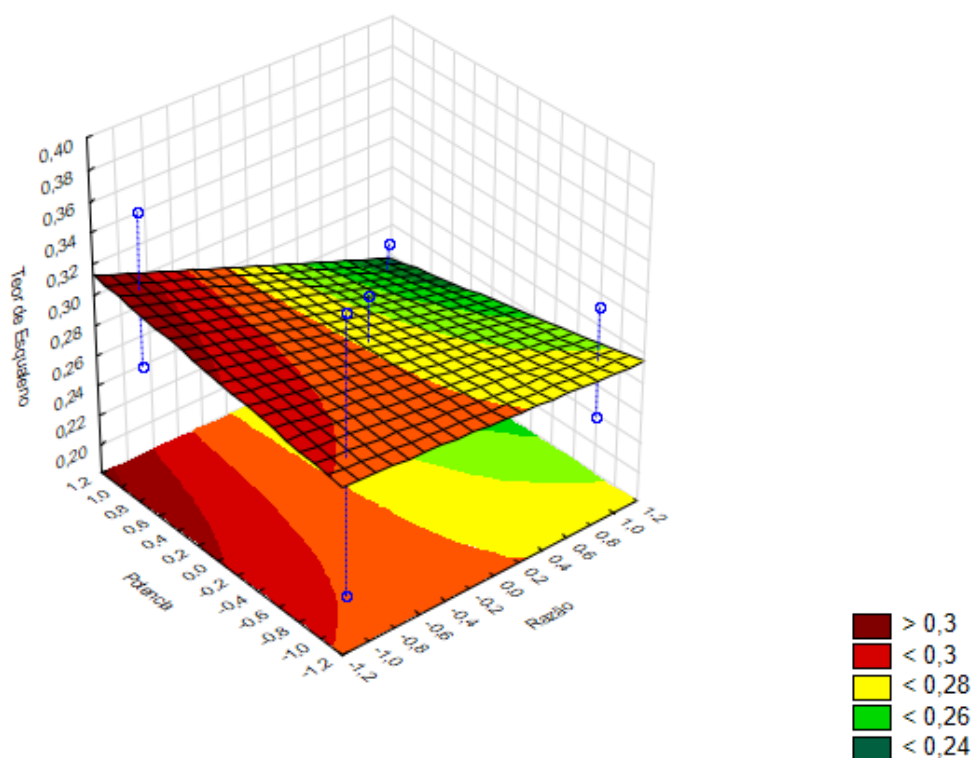


Figura 16: Superfície de resposta para o teor de esqualeno das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das razões soluto/solvente e potências empregadas.

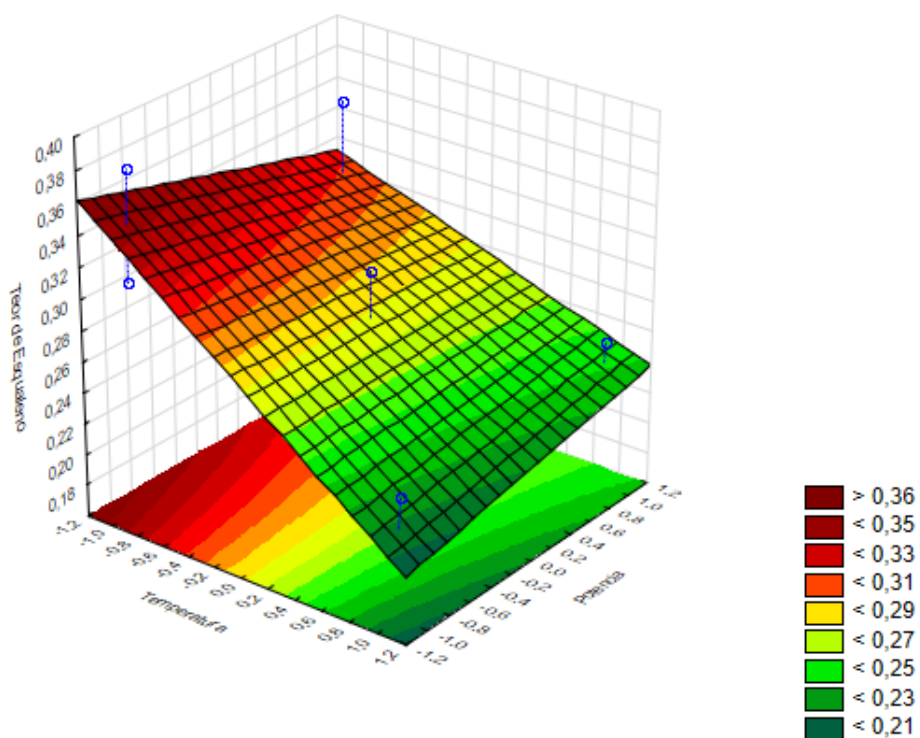


Figura 17: Superfície de resposta para o teor de esqualeno das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função da potência e temperaturas empregadas.

5.4 Atividade Antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir das folhas de *Echinodorus macrophyllus*, foi realizada a metodologia do radical DPPH, onde se expressa a concentração do extrato (mg mL^{-1}) necessária para reduzir o radical em 50%. Além disso, realizou-se também a metodologia de Folin-Ciocalteu para a quantificação dos compostos fenólicos, expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico presentes em 1 grama de extrato. Os resultados obtidos estão expressos na tabela abaixo, de acordo com cada parâmetro utilizado.

Tabela 10: Atividade antioxidante e compostos fenólicos dos extratos das folhas de *Echinodorus macrophyllus* obtidos por extração assistida por ultrassom.

Ensaio	Razão soluto/solvente (g mL^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Potência de ultrassom (W)	Folin (mg EAG g^{-1})* ^a	DPPH IC50 (mg mL^{-1})* ^b
UAE-1	01:10	60	225	$9,967 \pm 0,639$	$0,746 \pm 0,008$
UAE-2	01:10	60	525	$9,536 \pm 0,577$	$0,692 \pm 0,014$
UAE-3	01:30	60	225	$9,161 \pm 0,558$	$0,722 \pm 0,018$
UAE-4	01:30	60	525	$11,655 \pm 0,731$	$0,648 \pm 0,005$
UAE-5	01:10	40	225	$8,278 \pm 0,618$	$1,019 \pm 0,017$
UAE-6	01:10	40	525	$12,632 \pm 0,627$	$0,555 \pm 0,016$
UAE-7	01:30	40	225	$8,212 \pm 0,534$	$0,925 \pm 0,021$
UAE-8	01:30	40	525	$9,685 \pm 0,531$	$0,708 \pm 0,011$
UAE-9	01:20	50	350	$9,976 \pm 1,123$	$0,732 \pm 0,027$
SOX-E	01:25	$78,37^{\circ}\text{C}$	-	$11,026 \pm 0,814$	0,591
SOX-A	01:25	$77,1^{\circ}\text{C}$	-	$5,499 \pm 0,424$	9,31
SOX-H	01:25	69°C	-	$4,955 \pm 0,653$	253,33

*média $\pm$ desvio padrão

^a miligramas de equivalente de ácido gálico presentes em 1 grama de extrato;

^b IC50: concentração do extrato (mg mL^{-1}) necessária para reduzir o radical em 50%.



Figura 18: Resultados das análises de teor de compostos fenólicos das folhas de *Echinodorus macrophyllus*.

De acordo com os resultados apresentados, podemos observar que o ensaio 6 (UAE-6) apresentou melhores resultados de composição fenólica ($52,95 \text{ mg EAG g}^{-1}$) e inibição do radical DPPH ($0,55 \text{ mg mL}^{-1}$), enquanto que o ensaio 5 teve os piores resultados, com composição fenólica de $27,13 \text{ mg EAG g}^{-1}$ e concentração de $1,02 \text{ mg mL}^{-1}$ para inibição de 50% do radical DPPH. Comparando-se esses dois ensaios, podemos ver que a única diferença em suas condições de extração é a potência de ultrassom empregada, sendo que o ensaio 6 foi obtido utilizando-se maior potência de ultrassom (525 W).

Por sua vez, o ensaio 8, que apresentou maior rendimento de extração (10,93%), teve $35,91 \text{ mg EAG g}^{-1}$ como resultado de composição fenólica pela metodologia de Folin-Ciocalteu e concentração de $0,71 \text{ mg mL}^{-1}$ para inibição de 50% do radical DPPH.

Estudos de Lunardi *et al.* (2014), já haviam comprovado o potencial antioxidante de uma espécie do mesmo gênero, *Echinodorus grandiflorus*. Foram quantificados cerca de $120 \text{ mg EAG mL}^{-1}$ em chás dessa espécie, indicando significativa presença de compostos fenólicos. Os chás de *Echinodorus grandiflorus* também foram capazes de eliminar o radical DPPH.

A atividade antioxidante observada nos extratos de *Echinodorus macrophyllus* pode ser em parte justificada pela presença do esqualeno em sua composição. Ko *et al.* (2002), observou que os extratos obtidos por meio da extração supercrítica das folhas de *Terminalia catappa* L. apresentaram conteúdo de esqualeno de 0,9% até 12,29%, dependendo da maturidade das folhas, sendo que para os extratos estudados, observou-se atividade

antioxidante e sequestrante do radical DPPH, justificada pela presença do composto. Já os estudos de Tikekar *et al.* (2008), mostram que o esqualeno isolado apresenta propriedades antioxidantes fracas, porém, quando em associação a outros compostos, como tocotrienóis, presentes no óleo de amarantho estudado, as propriedades antioxidantes mostram-se melhores.

Assim sendo, conclui-se que a atividade antioxidante constatada nos extratos das folhas de *Echinodorus macrophyllus* pode ser resultado do sinergismo entre o composto químico esqualeno e outros compostos presentes na amostra.

As figuras a seguir mostram gráficos de pareto para o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos.

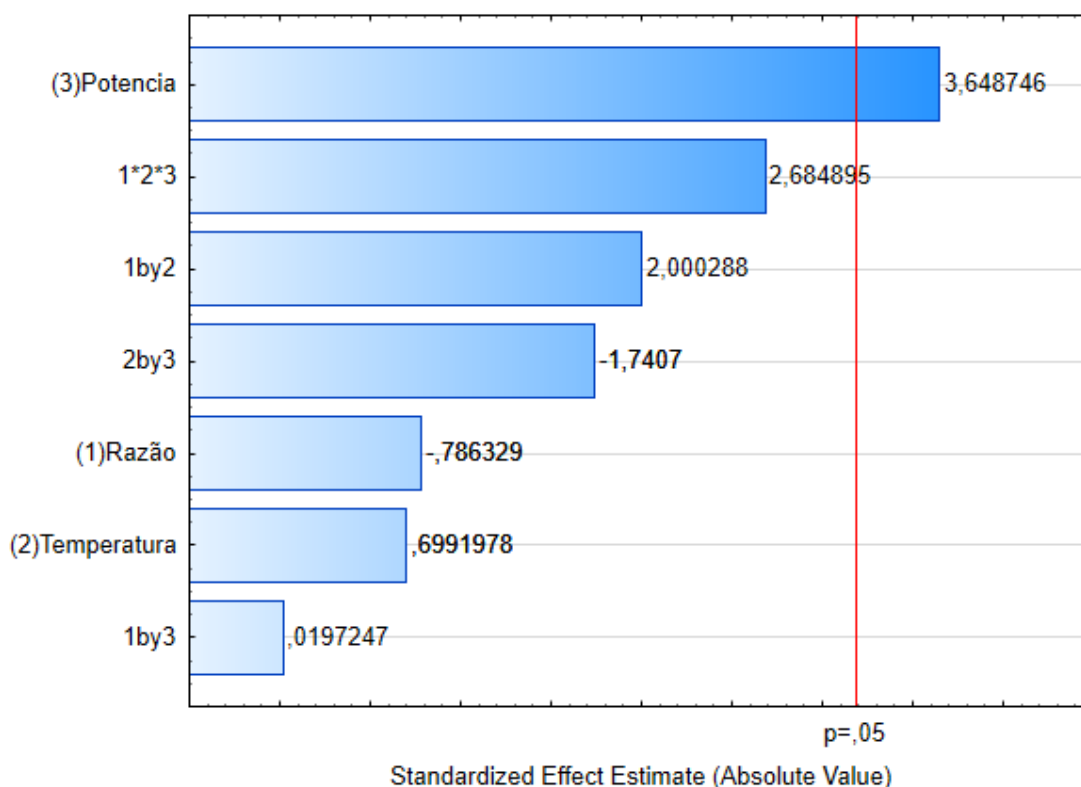


Figura 19: Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis razão Solute/Solvente, potência de ultrassom e temperatura no teor de compostos fenólicos das extrações de *Echinodorus Macrophyllus*.

De acordo com a análise estatística realizada, percebe-se que para o Teor de Compostos Fenólicos (metodologia de Folin Ciocalteu), a potência de ultrassom foi a única variável que exerceu diferença significativa para os resultados obtidos.

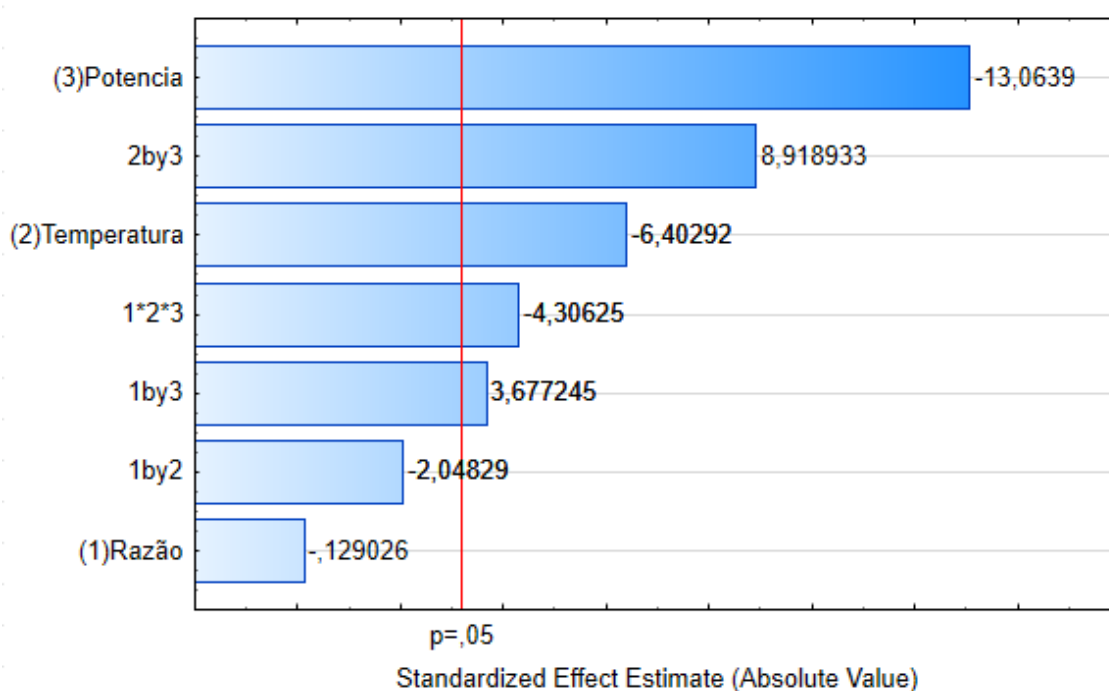


Figura 20: Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Razão Soluta/Solvente, Potência de Ultrassom e Temperatura na atividade antioxidante das extrações de *Echinodorus Macrophyllus*.

Tratando-se da atividade antioxidante dos extratos (metodologia DPPH), exerceram influência significativa a potência de ultrassom, temperatura, interrelação entre esses dois fatores, e relação entre potência, temperatura e razão soluto/solvente. Além disso, a relação entre razão soluto solvente e potência de ultrassom também apresentou diferença significativa.

Para as duas metodologias utilizadas, a potência de ultrassom apresentou grande efeito nos resultados obtidos. Hossain *et al.* (2012), estudaram os extratos das folhas de manjerona (*Origanum majorana* L.) e observaram que a potência de ultrassom, temperatura e tempo de ultrassom influenciaram o conteúdo fenólico e atividade antioxidante dos extratos. Para esse caso, a potência de ultrassom foi o fator que exerceu maior efeito, sendo justificado que amplitudes mais altas possibilitariam o rompimento das paredes celulares, liberando os compostos fenólicos e antioxidantes para o meio. Altemimi *et al.* (2015), também observou o efeito da potência do ultrassom para as extrações das folhas de espinafre (*Spinacea olerace a* L.), estabelecendo uma relação entre a temperatura e a amplitude utilizadas.

A validação do modelo foi verificada pela análise do teste F, mediante dados da análise de variância. O modelo é validado, ou seja, se ajusta aos dados experimentais, quando $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. O modelo obtido pela regressão linear explicou 90,5% das variações entre os valores experimentais e os previstos pelo mesmo para o teor de compostos fenólicos e 99,09% para a atividade antioxidante, indicando uma boa concordância. A análise da estatística “F” é apresentada nas tabelas a seguir.

Tabela 11: Análise de variância para predição do teor de compostos fenólicos das folhas de *Echinodorus macrophyllus* por meio da extração assistida por ultrassom.

Causa de variação	Soma quadrática	GL ^a	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	167500,10	6	27916,68	14,3304	3,3738 ^b
Resíduo	17532,70	9	1948,078		
Falta de ajuste	706,20	1	706,20	0,3358	5,3177 ^c
Erro puro	16826,50	8	2103,312		
Total	185032,80	15			
R ²	0,9052				

^aGraus de liberdade;

^b F_{tabelado}(6;9;0,05);

^c F_{tabelado}(1;8;0,05).

Tabela 12: Análise de variância para predição da atividade antioxidante da extração das folhas de *Echinodorus macrophyllus* por meio da extração assistida por ultrassom.

Causa de variação	Soma quadrática	GL ^a	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,1574	6	0,0262	163,7028	3,3738 ^b
Resíduo	0,0014	9	0,0002		
Falta de ajuste	0,0004	1	0,0004	3,3767	5,3177 ^c
Erro puro	0,0010	8	0,0001		
Total	0,1588	15			
R ²	0,9909				

^aGraus de liberdade;

^b F_{tabelado}(6;9;0,05);

^c F_{tabelado}(1;8;0,05).

As figuras a seguir apresentam as superfícies resposta para as análises de teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

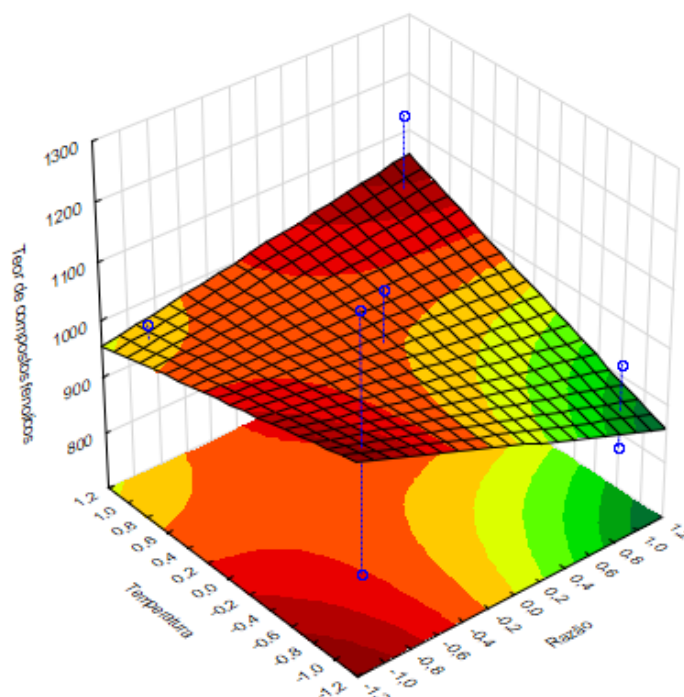


Figura 21: Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das razões soluto/solvente e temperaturas empregadas.

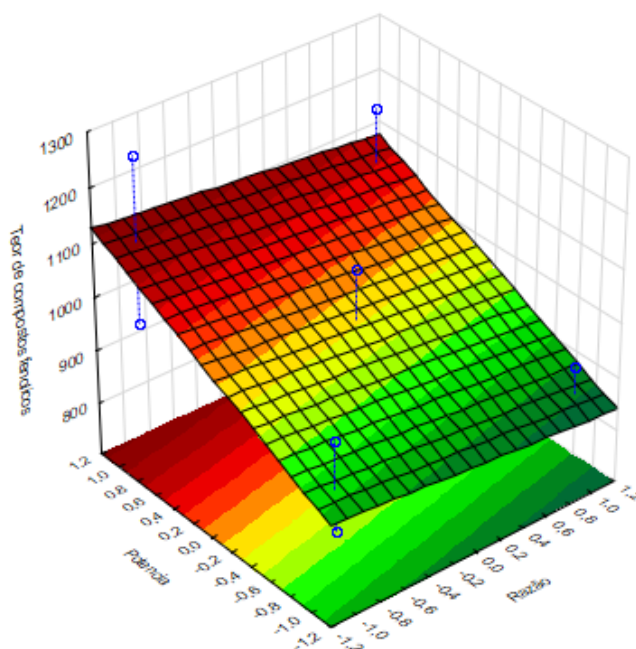


Figura 22: Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das razões soluto/solvente e potência de ultrassom empregadas.

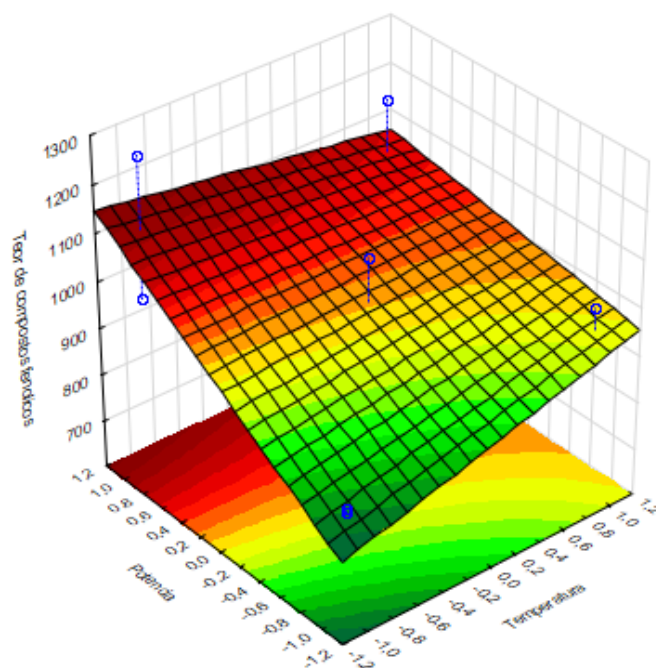


Figura 23: Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função da potência e temperaturas empregadas.

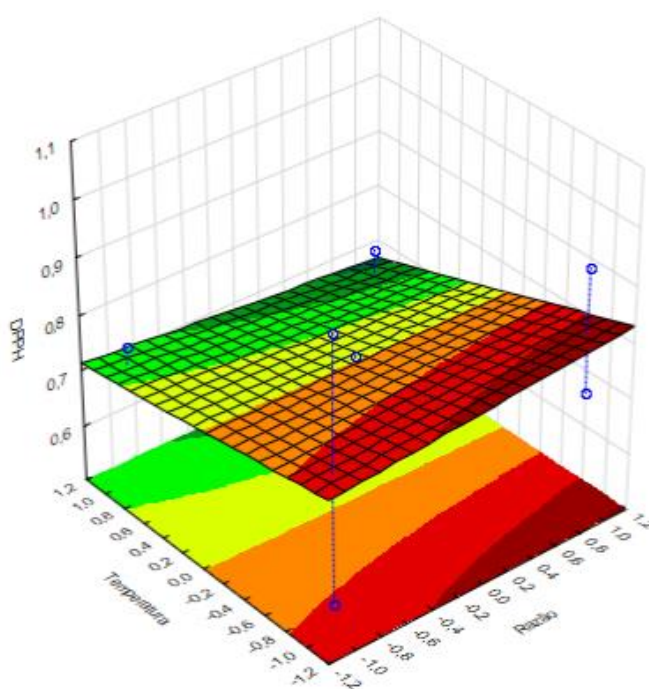


Figura 24: Superfície de resposta para a atividade antioxidante das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das razões soluto/solvente e temperaturas empregadas.

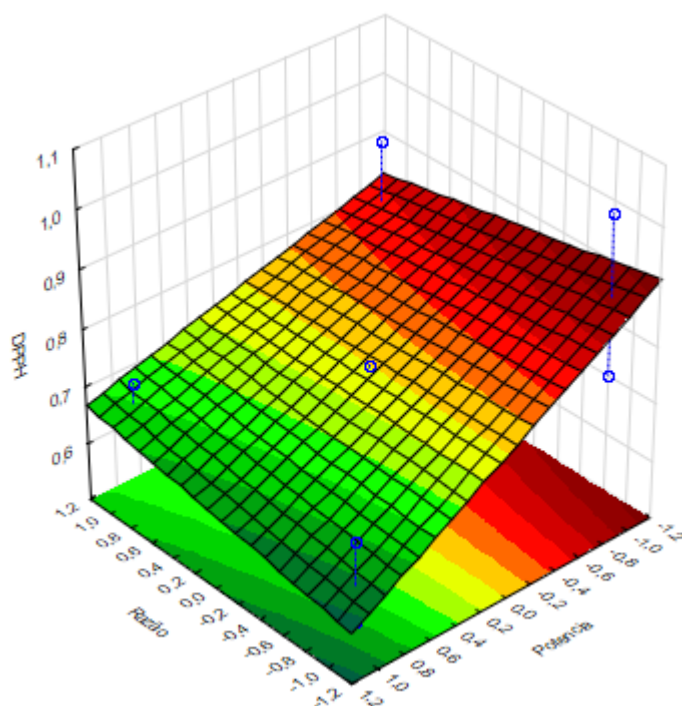


Figura 25: Superfície de resposta para a atividade antioxidante das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das razões soluto/solvente e potência de ultrassom empregadas.

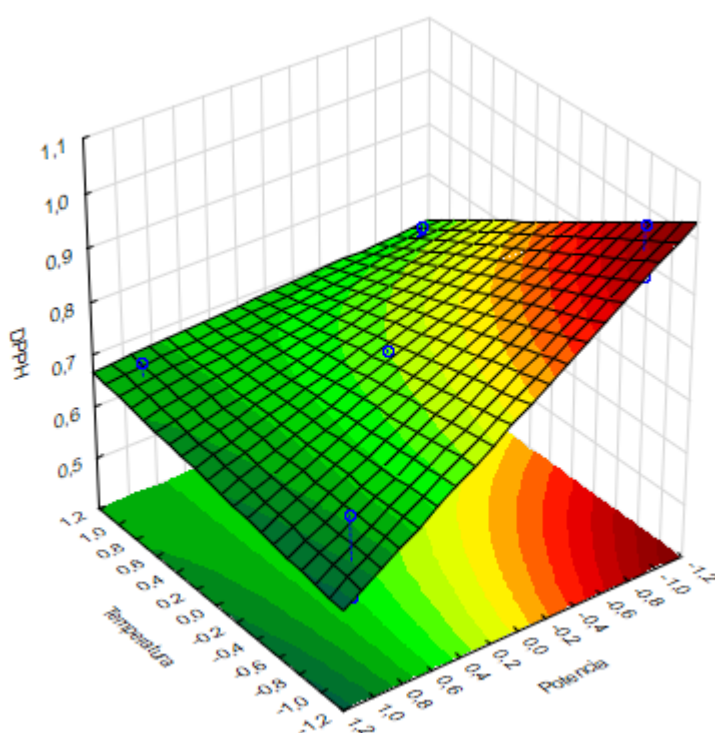


Figura 26: Superfície de resposta para a atividade antioxidante das folhas de *Echinodorus macrophyllus* em função das temperaturas e potência de ultrassom empregadas.

5.5 Atividade Antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana, realizou-se a análise no ponto central (ensaio 9), do ponto de maior rendimento (ensaio 8) e dos pontos de maior e menor rendimento (ensaio 6 e ensaio 5, respectivamente). Uma forma de observar se o extrato apresenta atividade antimicrobiana é observando a turbidez dos poços reservatórios. Quanto mais turvo, maior o crescimento microbiano, e, portanto, menor a atividade antimicrobiana dos extratos. Na figura a seguir, podemos observar a turbidez dos poços testados.

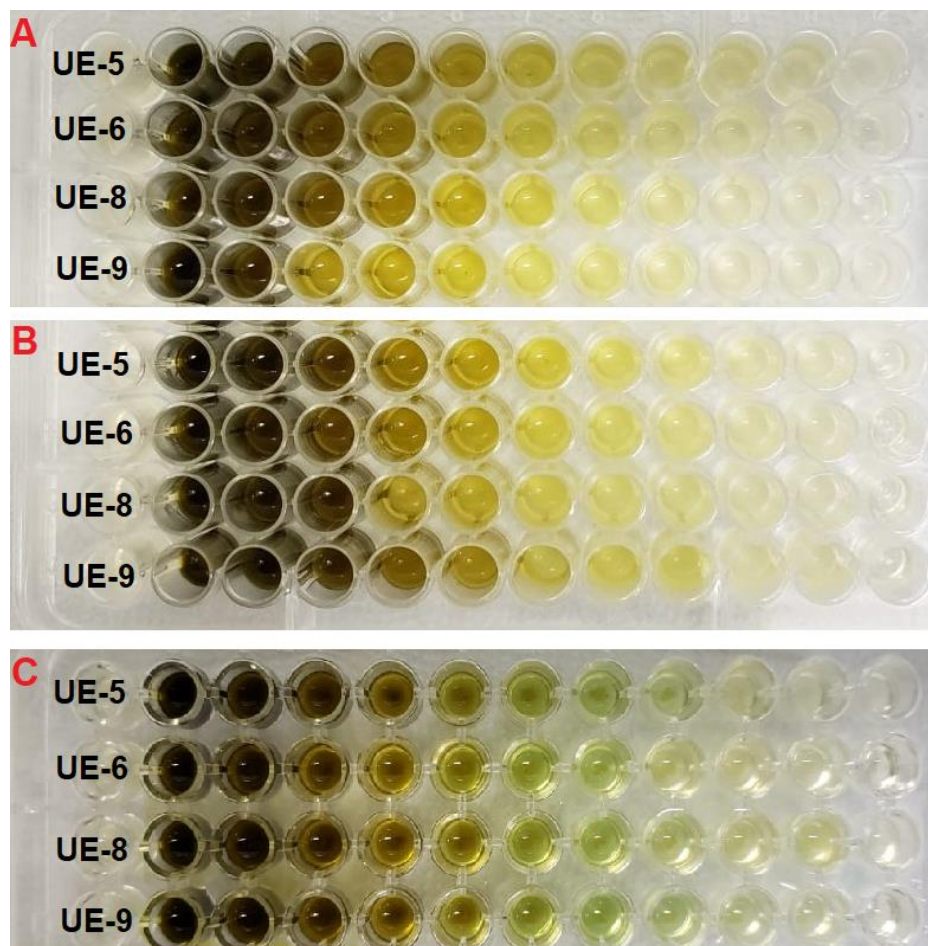


Figura 27: Turbidez dos poços reservatórios (A: *Escherichia coli*; B: *Staphylococcus aureus* e C: *Pseudomonas aeruginosa*).

Tabela 13: Concentração inibitória mínima (mg mL⁻¹) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Extrato	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
UE-5	250	250	250
UE-6	>250	>250	250
UE-8	>250	>250	125
UE-9	250	250	125

O ponto central (ensaio 9), apresentou CIM de 250 mg mL⁻¹ frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e CIM de 125 mg mL⁻¹ frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Silva *et al.* (2012), realizou testes para verificar a atividade antimicrobiana dos extratos de *Echinodorus macrophyllus* e comprovaram uma alta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Observou-se também que os extratos obtidos a partir de etanol apresentaram maior atividade do que os extratos obtidos com hexano. A concentração de 0,24 mg mL⁻¹ foi eficaz para inibir 37,78% de *S. aureus* e a concentração de 1,95 mg mL⁻¹ para inibir 43,21% de *B. subtilis*.

Por sua vez, Bonetti *et al.* (2020), testou a atividade antibacteriana dos extratos de *Echinodorus grandiflorus*, e concluiu que os extratos analisados não inibiram o crescimento da bactéria testada, e, portanto, não apresentaram atividade antimicrobiana considerável.

Assim sendo, conclui-se que os extratos obtidos a partir das folhas de *Echinodorus macrophyllus* puderam inibir o crescimento bacteriano nas cepas testadas, porém em níveis não significativos.

5.6 Otimização dos resultados

Após obtidos todos os resultados, foi realizada a análise estatística da desejabilidade, para encontrar o ponto ótimo das extrações. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 14: Condições ótimas para obtenção do extrato de *Echinodorus macrophyllus*, de acordo com o estudo da desejabilidade.

Razão soluto solvente (mL g ⁻¹)	21,4
Temperatura (°C)	40
Potência de ultrassom (W)	414

Tabela 15: Resultados esperados nas condições ótimas para obtenção do extrato de *Echinodorus macrophyllus*, de acordo com o estudo da desejabilidade

	Resultados esperados
Rendimento (%)	8,5147 ± 0,7653
Teo de esqualeno (g 100g ⁻¹)	0,3173 ± 0,0306
Teor de compostos fenólicos (mg EAG/g de extrato)	9,9846 ± 1,64054
Atividade antioxidante - DPPH IC50 (mg mL ⁻¹)	0,7582 ± 0,0399

Como podemos observar nas tabelas, os resultados otimizados deveriam ser obtidos em temperaturas mais baixas de operação (40°C), potência de ultrassom em um nível médio (414 W) e razão soluto solvente também em um nível médio (21,4 ml g⁻¹). Os resultados de rendimento, teor de esqualeno, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas condições ótimas precisam ser comprovados realizando as análises correspondentes.

6 CONCLUSÃO

As extrações das folhas de *Echinodorus macrophyllus* apresentaram resultados positivos utilizando os diferentes métodos.

Dentre as técnicas de extração estudadas, o ultrassom apresentou diversas vantagens frente à extração convencional (Soxhlet), como diminuição no tempo para a obtenção dos extratos e utilização de uma menor quantidade de solventes orgânicos. Foi possível notar que as variáveis estudadas – potência de ultrassom, temperatura, razão soluto/solvente – apresentaram efeitos significativos positivos, isoladas e interagindo em conjunto, no rendimento de extração, teor de esqualeno, atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos extratos.

Utilizando o ultrassom, o melhor rendimento obtido foi de 10,93%, nas condições de temperatura de 40°C e potência de ultrassom de 525 W e maior quantidade de solvente (1:30). Por sua vez, o melhor resultado de atividade antioxidante e composição fenólica (52,95 mg EAG 100 g⁻¹ extrato) foi obtido também na temperatura de 40°C, potência de ultrassom maior (525 W), porém em uma quantidade de solvente menor (1:10). Essas mesmas condições possibilitaram a obtenção de um dos extratos com maior quantidade de esqualeno (0,36%).

Apesar do potencial antimicrobiano avaliado ter apresentado efeitos fracos, é muito interessante a obtenção destes dados para estudos futuros e possíveis comparativos do extrato com outras plantas similares.

Este trabalho contribuiu para a ampliação dos estudos sobre as propriedades terapêuticas do chapéu de couro, comprovando sua eficiência como fonte antioxidante e fonte alternativa para a obtenção de esqualeno.

7 REFERÊNCIAS

ABOU-ARAB A E, ABOU-ARAB A A, ABU-SALEM M F. **Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana bertonii* plant.** African Journal of Food Science, Vol. 4, p. 269- 281, 2010.

AHMAD-QASEM M H, CÁNOVAS J, BARRAJÓN-CATALAN E, MICOL V, CÁRCEL J A, GARCIA-PEREZ J V. **Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound.** Innovative Food Science & Emerging Technologies, Vol. 17, p. 120-129, 2013.

AKTHAR, M.S; DEGAGA, B.; AZAM, T. **Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review.** Biological Sciences and Pharmaceutical Research, Vol.2, pp. 001-007, 2014.

ALMEIDA, F H O. **Revisão Sistemática da Miconia albicans (sw.) Triana: Uso tradicional, atividade farmacológica e outras atividades.** Monografia, Universidade Federal de Sergipe, 2016.

ALTEMIMI A, CHOUDHARY R, WATSON D G, LIGHTFOOT D A. **Effects of ultrasonic treatments on the polyphenol and antioxidant content of spinach extracts.** Ultrasonics Sonochemistry, V. 24, P. 247-255, 2015.

AMARAL M P M, BRAGA F A V, PASSOS F F B, ALMEIDA F R C, OLIVEIRA R C M, CARVALHO A A, CHAVES M H, OLIVEIRA F A. **Additional Evidence for the Anti-inflammatory Properties of the Essential Oil of *Protium heptaphyllum* Resin in Mice and Rats.** Latin American Journal of Pharmacy, Vol. 28, 2009.

ANKLAM E., BERG H., MATHIASSEN L., SHARMAN M., ULBERTH F. **Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review.** Food Additives and Contaminants, Vol. 15, No. 6, 729-750, 1998.

ARAGÃO G F, MORAES FILHO M O, BANDEIRA P N, FROTA JUNIOR A P, OLIVEIRA Y I S, BALACÓ C F A, DE MORAES M E A. **Monoaminergic Involvement in Decreased Locomotor Activity of Mice Treated with α and β -amyryn from *Protium heptaphyllum*.** Natural Product Communications, Vol. 13, 2018.

AZWANIDA, N. N. **A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation.** Medicinal & Aromatic Plants, Volume 4, Page 196, 2015.

BARBOSA-FILHO J M, PIUVEZAM M R, MOURA M D, SILVA M S, LIMA K V B, LEITAO-DA-CUNHA E V, FECHINE I M, TAKEMURA O S. **Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, Vol. 16, P. 109-139, 2006. ,

BAUMGARDT F. J. L. **Extração de óleo de microalgas com fluidos pressurizados e avaliação de sua conversão em monoésteres graxos.** Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, 2013.

BEVILAQUA G A P, NEDEL J L, ZUANAZZI J A, CORREA C T. **Distribuição geográfica e composição química de Chapéu de couro (*Echinodorus spp.*) no Rio Grande do Sul.** Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.2, p.213-218, 2001.

BNOUHAM M, ZIYYAT A, MEKHFI H, TAHRI A, LEGSSYER A. **Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000).** Int J Diabetes & Metabolism, Vol. 14, P. 1-25, 2006.

BONETTI C I, DALMAGRO M, FRIEDRICH J C, JESUS D R. **Phytochemical Profile and Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Echinodorus grandiflorus* Crude Extract of the Leaves.** Journal of Agricultural Studies, Vol. 8, No. 4., 2020.

BOUTEKEDJIRET C, BENTAHAR F, BELABBES R, BESSIERE J M. **Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation.** Flavour Fragr. J., volume 18, p. 481–484, 2003.

BRUNNER G. **Supercritical gases as solvents: phase equilibria.** Springer (Editora), Gas Extr. – An Introd. to Fundam. Supercrit. Fluids Appl. to Sep. Process, Steinkopff-Verlag, pp. 59–146, 1994.

CAMARGO M G G, SCHAEFER H M, HABERMANN G, CAZETTA E, SOARES N C, MORELLATO L P C. **Bicolored display of *Miconia albicans* fruits: Evaluating visual and physiological functions of fruit colors.** American Journal of Botany, 102 (9), 1453 – 1461, 2015.

CARNEIRO, F. M.; DA SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. **Tendência dos estudos com plantas medicinais no Brasil.** Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais, Volume 3, p.44-75, 2014.

CARNIEL N, DALLAGO R M, BILIBIO D, NUNES A L, BENDER J P, PRIAMO W L. **The effects of ultrasound-assisted extraction on polyphenolics compounds obtained from *Physalis angulata* using response surface approach.** Acta Scientiarum. Technology, v. 40, e35530, 2018.

CARREIRA RC, ZAIDAN LBP. **Germinação de sementes de espécies de Melastomataceae de Cerrado sob condições controladas de luz e temperatura.** Hoehnea, 34(3):261-269, 2007.

CARRILHO E, TAVARES M C H, LANÇAS F M. **Fluidos supercríticos em química analítica e cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos.** Quím. Nova, vol.24, no.4, 2001.

CARVALHO, A. C. B.; SANTOS, L. A.; SILVEIRA, D. **La regulación de los medicamentos herbarios en Brasil.** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Santiago, v. 8, n. 1, p. 7-11, 2008.

CARVALHO K M M B, MARINHO FILHO J D B, MELO T S, ARAUJO A J, QUETZ J S, CUNHA M P S S, MELO K M, SILVA A A C A, TOME A R, HAVT A, FONSECA S G C, BRITO G A C, CHAVES M H, RAO V S, SANTOS F A. **The Resin from *Protium heptaphyllum* Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice:Scientific Evidence and Potential Mechanisms.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2015, 2015.

CAVALCANTI R. N. **Extração de antocianinas de resíduos de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2013.

CHANDRA H, BISHNOI P, YADAV A, PATNI B, MISHRA A P, NAUTIYAL A R. **Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review.** *Plants*, Volume 6, P. 16, 2017.

CHEMAT F, ZILL-E-HUMA, KHAN M K. **Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction.** F. Chemat et al. / *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 18, Pages 813–835, 2011.

CHOI C W, KIM S C, HWANG S S, CHOI B K, AHN H J, LEE M Y, PARK S H, KIM S K. **Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison.** *Plant Science*, v. 163, n. 6, p.1161-1168, dez. 2002.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination.** Taylor & Francis Group, Second Edition, 2008.

CUNHA W R, ANDRADE E SILVA M L, TURATTI I C C, FERREIRA D S, BATARELLO H L. **Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos.** Rev. Bras. Farm., 84(2), 47-49, 2003.

CUNHA W R, CREVELIN E J, ARANTES G M, CROTTI A E M, ANDRADE E SILVA M L, FURTADO N A J C, ALBUQUERQUE S, FERREIRA D S. **A study of the tripanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species.** Phytother. Res., 20, 474-478, 2006.

CUNHA W R, ANDRADE E SILVA M L, DOS SANTOS F M, MONTENEGRO I M, OLIVEIRA A R A, TAVARES H R, LEME DOS SANTOS H S, BIZÁRIO J C S. **In Vitro Inhibition of Tumor Cell Growth by *Miconia fallax*.** Pharmaceutical Biology, Vol. 46, No. 4, pp. 292–294, 2008.

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

DE CASTRO M D L, PRIEGO-CAPOTE F. **Soxhlet extraction: Past and present panacea.** Journal of Chromatography A, 1217, p. 2383–2389, 2010.

DIAS A L B, SERGIO C S A, SANTOS P, BARBERO G F, REZENDE C A, MARTINEZ J. **Effect of ultrasound on the supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*).** Elsevier. Ultrasonics Sonochemistry, Volume 31, P. 284-294, 2016.

DIAS, T.; DE MELO, H. C.; ALVES, F. R. R.; CARVALHO, R. F. C.; CARNEIRO, K. S.; SOUSA, C. M. **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em frutos de tomateiros mutantes fotomorfogénéticos**. Ciência Rural Online, 2015.

DURLING, N. E.; CATCHPOLE, O. J. GRAY, J.B.; WEBBY, R.F.; MITCHEL, K.A.; YEAP FOO, L.; PERRY, N.B. **Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures**. Science Direct. Volume 101, Issue 4, Pages 1417-1424, 2007.

ELISON, AM, DENSLOW JS, LOISELLE BA, DANILO BRENÉS D. **Seed and seedling ecology of neotropical Melastomataceae**. Ecology, 74(6):1733-1749, 1993.

ESCLAPEZ M. D., GARCÍA-PEREZ J. V., MULET A., CÁRCEL J. A. **Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products**. Food Eng Rev, Vol. 3, P. 108–120, 2011.

ESPINOSA-PARDO F A, NAKAJIMA V M, MACEDO G A, MACEDO J A, MARTINEZ J. **Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using supercritical CO₂ and cosolvents**. Elsevier. Food and Bioproducts Processing, Volume 101, Pages 1-10, 2017.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; DOS SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M.; BARVOSA FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. **Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil**. Revista Brasileira de Farmacognosia, Volume 15, Pages 381-391, 2005.

FARJAMINEZHAD R, GAROOSI G. **Establishment of green analytical method for ultrasound-assisted extraction of azadirachtin, mevalonic acid and squalene from cell suspension culture of *Azadirachta indica* using response surface methodology**. Industrial Crops and Products, Vol. 144, n. 111946, 2020.

FERNANDES D C, VELOZO L S M, ALVES R A, SIQUEIRA H A A, SILVA G P, SANTOS S V M, GAYER C R M, COELHO M G P. **Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae).** Revista Fitos, v. 7, n.4, 2012.

FLOR R V, CAMPOS M A A, SOLANO A G R, JOKL L, DANTAS-BARROS A M. **Drying of *Echinodorus macrophyllus* and autoclaving and lyophilization of the fluid-extract: effects on the pharmacochemical composition.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 2010.

GANDHI K., ARORA S., KUMAR A. **Industrial applications of supercritical fluid extraction: A review.** International Journal of Chemical Studies, 5(3), 336-340, 2017.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUITIERREZ, A. **Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples.** Molecules, Volume 15, Pages 8813-8826, 2010.

GATTI A. B., ANDRADE PEREZ S. C. J. G., FERREIRA A. G. **Avaliação da Atividade Alelopática de Extratos Aquosos de Folhas de Espécies de Cerrado.** Revista Brasileira de Biociências, v. 5, supl. 2, p. 174-176, 2007.

GOLDENBERG R. **O gênero Miconia (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil.** Acta Bot Bras, 18(4):927-947, 2004.

GONZÁLEZ-CENTENO M R, COMAS-SERRA F, FEMENIA A, ROSELLÓ C, SIMAL S. **Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling.** Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 22, p. 506-514, 2015.

GONZÁLEZ-CENTENO M R, KNOERZER K; SABAREZ, H, SIMAL S, ROSELLÓ 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, n. 6, p. 2176–2184, 2014.

GUIMARÃES A G, QUINTANS J S S, QUINTANS-JUNIOR L J. **Monoterpenes with Analgesic Activity—A Systematic Review.** PHYTOTHERAPY RESEARCH Phytother. Res., Vol. 27, P. 1–15, 2013.

GUÇLU-USTUNDAG O, TEMELLI F. **Solubility behavior of ternary systems of lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects.** Elsevier. J. of Supercritical Fluids, V. 36, p.1–15, 2005.

GUPTA A.; MAHAJAN S.; SHARMA R. **Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*.** ScienceDirect. Volume 6, Pages 51-55, 2015.

HAYNES R R, HOLM-NIELSEN L B. **Notes on *Echinodorus* (ALISMATACEAE).** Brittonia, v. 38, pp. 325-332, 1986.

HE H P, CORKE H, CAI J G. **Supercritical carbon dioxide extraction of oil and squalene from *Amaranthus* grain.** J. Agric. Food Chem., v. 51, pp. 7921-7925, 2003.

HOSSAIN M B, BRUTON N P, PATRAS A, TIWARI B, O'DONNELL C P, MARTIN-DIANA A B, BARRY-RYAN C. **Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos antioxidantes da manjerona (*Origanum majorana* L.) usando metodologia de superfície de resposta.** Ultrasonic Sonochemistry, V. 19, edição 3 , P. 582-590, 2012.

HUIE, C. W. **A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants.** Anal Bioanal Chem, Volume 373, Pages 23–30, 2002.

IBRAHIM N I, FAIRUS S, ZULFARINA M S, MOHAMED I N. **The Efficacy of Squalene in Cardiovascular Disease Risk-A Systematic Review.** *Nutrients*, Vol. 12, p. 414, 2020.

IVANOVIC J, RISTIC M, SKALA D. **Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plant material.** *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol. 57, n. 2, p. 129-136, 2011.

KAMBLE P N, GIRI S P, MANE R S, TIWANA A. **Estimation of Chlorophyll Content in Young and Adult Leaves of Some Selected Plants.** *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, Vol. 5, n. 6, p. 306-310, 2015.

KAVISHANKAR G B, LAKSHMIDEVI N, MURTHY M S, PRAKASH H S, NIRANJANA S R. **Diabetes and medicinal plants - A review.** *Int J Pharm Biomed Science*, Vol. 2, P. 65-80, 2011.

KELLY G S. **Squalene And Its Potential Clinical Uses.** *Alternative Medicine Review*, Vol 4, n. 1, 1999.

KLEIN, Elissandro Jair. **Obtenção de compostos bioativos de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) utilizando CO₂ supercrítico e extração com solvente assistida por ultrassom.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo - PR, 2016.

KO T-F, WENG Y-M, CHIOU R Y-Y. **Squalene Content and Antioxidant Activity of *Terminalia catappa* Leaves and Seeds.** *J. Agric. Food Chem.*, n 50, 19, p. 5343–5348, 2002.

KOKETSU M, GONÇALVES S L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor.** Embrapa CTAA, Centro Nacional de Pesquisa e Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Título III, série IV, Rio de Janeiro, 1991.

KRISHNAIAH D, SARBATLY M, NITHYANANDAM R. **A review of the antioxidant potential of medicinal plant species.** ELSEVIER, Food and bioproducts processing, V. 89, P. 217–233, 2011.

KUMAR A, GNANANATH K, GANDE S, GOUD E, RAJESH P, NAGARJUNA S. **Anti-diabetic Activity of Ethanolic Extract of *Achyranthes aspera* Leaves in Streptozotocin induced diabetic rats.** Journal of Pharmacy Research, Vol. 4, 2011.

KUMORO A C, HASAN M, SINGH H. **Effects of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves.** ScienceAsia, Vol. 35, p. 306-309. 2009.

LAZAR L, TALMACIU A I, VOLF I, POPA V I. **Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Picea abies* bark.** Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 32, p. 191-197, 2016.

LIMA R. C. L., KONGSTAD K. T., KATO L., DA SILVA M. J., FRANZYK H., STAERK D. **High-Resolution PTP1B Inhibition Profiling Combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for Identification of PTP1B Inhibitors from *Miconia albicans*.** Molecules, 23, 1755, 2018.

LORENZI H. **Árvores brasileiras.** Piracicaba, Plantarum LTDA, 1992.

LOZANO-GRANDE M A, GORINSTEIN S, ESPITIA-RANGEL E, DÁVILA-ORTIZ G, MARTINEZ-AYALA A L. **Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene.** International Journal of Agronomy, Vol. 2018, 13 pages, 2018.

LUNARDI R F, WOHLLENBERG M, MEDEIROS N, AGOSTINI F, FUNCHAL C, DANI C. ***In vitro* antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, “leather hat,” in Wistar rat liver.** An. Acad. Bras. Ciênc., V. 86, n. 3, 2014.

MA Y, YE X, HAO Y, XU G, XU G, LU D. **Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel.** Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 15, N.3, Pages 227-232, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. **Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova, Volume 25, No. 3, Pages 429-438, 2002.

MAHESH B.; SATISH S. **Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens.** World Journal of Agricultural Sciences, Volume 4, Pages 839-843, 2008.

MALAKA M S, NAIDOO K, KABUBA J. **Extraction of Siphonochilus aethiopicus Essential Oil by Steam Distillation.** Chemical Engineering Communications, volume 204, p. 813–819, 2017.

MARAN J P, MANIKANDAN S, NIVETHA C V, DINESH R. **Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design.** Arabian Journal of Chemistry, Volume 10, Pages S1145-S1157, 2017.

MARASINI, B. P.; BARAL, P.; ARYAL, P.; GHIMIRE, K. R.; NEUPANE, S.; DAHAL, N.; SINGH, A.; GHIMIRE, L.; SHRESTHA, K. **Evaluation of Antibacterial Activity of Some Traditionally Used Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria.** BioMed Research International, Volume 2015, 2015.

MARINHO C. M., LEMOS, C. O. T., ARVELOS S., BARROZO M. A. S., HORI C. E., WATANABE E. O. **Extraction of corn germ oil with supercritical CO₂ and cosolvents.** J Food Sci Technol, 56(10), 4448–4456, 2019.

MARTINS A B, SEMIR J, GOLDENBERG R, MARTINS E. **O Gênero Miconia Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no Estado de São Paulo.** Acta bot. bras. 10(2),1996.

MASANGO P. **Cleaner production of essential oils by steam distillation.** Journal of Cleaner Production, Volume 13, P. 833-839, 2005.

MELLO B. T. F., SILVA P. J., SILVA C. **Avaliação do efeito das variáveis de processo na obtenção do óleo de semente de chia por extração assistida por ultrassom.** XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

MELO K M, OLIVEIRA F T B, COSTA SILVA R A, GOMES QUINDERÉ A L, MARINHO FILHO J D B, ARAUJO A J, BARROS PEREIRA E D, CARVALHO A A, CHAVES M H, RAO V S, SANTOS F A. **α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells.** Elsevier Masson SAS, Biomed Pharmacother, Vol. 109, P. 1860-1866, 2019.

MENEZES F S, MINTO A B M, RUELA H S, KUSTER R M, SHERIDAN H, FRANKISH N. **Atividade hipoglicemiante de duas espécies de *Bauhinia* brasileira: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz.** Rev. bras. farmacogn. vol.17 no.1, 2007.

MOBIN, M, DE LIMA, S G, ALMEIDA, L T G, TAKAHASHI, J P, TELES, J B, SZESZS, M W, MARTINS, M A, CARVALHO, A A, MELHEM, M S C. **MDGC-MS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against *Candida* specie.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.2, p.531-538, 2016.

MOREIRA M. Z.,SCHOLZ F. G., BUCCI S. J., STERNBERG S., GOLDSTEIN G., MEINZER F. C., FRANCO A. C. **Hydraulic lift in a neotropical savanna.** Functional Ecology, 17, 573–581, 2003.

NAGY B, SIMANDI B. **Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika.** The Journal of Supercritical Fluids, Vol. 46, n. 3, p. 293-298, 2008.

NAZIRI E, GLISIC S B, MANTZOURIDOU F T, TSIMIDOU M Z, NEDOVIC V, BUGARSKI B. **Advantages of supercritical fluid extraction for recovery of squalene from wine lees.** The Journal of Supercritical Fluids, Volume 107, P. 560-565, 2016.

NEWMARK H L. **Squalene, olive oil and cancer risk: a review and hypothesis** Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., Vol. 6, p. 1101-1103, 1997.

OLIVEIRA F A, COSTA C L S, CHAVES M H, ALMEIDA F R C, CAVALCANTE I J M, LIMA A F, LIMA JR R C P, SILVA R M, CAMPOS A R, SANTOS F A, RAO V S N. **Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by a- and h-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice.** Life Sciences< Vol. 77, P. 2942–2952, 2005.

OWEN R W, GIACOSA A, HULL W E. **Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants.** Lancet Oncology, vol. 1, no. 2, pp. 107–112, 2000.

OWEN R W, MIER W, GIACOSA A, HULL W E, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H. **Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene.** Food and Chemical Toxicology, Volume 38, N. 8, P. 647-659, 2000.

PEREIRA D. T. V. **Extração de antocianinas a partir do bagaço de uva Syrah (*Vitis vinifera* L.) com líquidos pressurizados e concentração dos extratos por nanofiltração.** Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2018.

PIERONI L. G., REZENDE F. M., XIMENES V. F., DOKKEDAL A. L. **Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves.** Molecules, 16, 9439-9450, 2011.

PIZA, A. C. M. T. P.; HOKKA, C. O.; SOUSA, C. P. **Endophytic Actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) and Evaluation of Its Antimicrobial Activity.** Journal of Scientific Research & Reports, Volume 4, Pages 281-291, 2015.

PORTELLA V G, COSENZA G P, DINIZ L R L, PACHECO L F, CASSALI G D, CALIARE M V, BRANDÃO M G L, VIEIRA M A R. **Nephroprotective Effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats.** Nephron Extra, v. 2, p.177–183, 2012.

PRADO C. H. B. A., DE MORAES J. A. P. V. **Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species os Cerrado vegetation under field conditions.** Photosynthetica, 33, 103-112, 1997.

QADIR, M. A.; SHAHZADI, S. K.; MUNIR, A.; SHAHZAD, S. **Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Common Herbs.** International Journal of Analytical Chemistry, Volume 2017, 2017.

RAJALAKSHMI K, BANU N. **Extraction and Estimation of Chlorophyll from Medicinal Plants.** International Journal of Science and Research, Vol. 4, n. 11, 2015.

RATAJ K. **Contribution to the Knowledge of *Echinodorus macrophyllus* (KUNTH) MICH. and *E. scaber* from Tropical America.** Folia geobotanica et phytotaxonomica, Vol 4, p.435--442, 1969.

RATHEE P, CHAUDHARY H, RATHEE S, RATHEE D, KUMAR V, KOHLI K. **Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review.** Inflammation & Allergy - Drug Targets, Vol. 8, P. 229-235, 2009.

RAMSEY E, SUN Q, ZHANG Z, ZHANG C, GOU W. **Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide.** ScienceDirect. Journal of Environmental Sciences, volume 21, p. 720–726, 2009.

REDDY L H, COUVREUR P. **Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy.** Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 61, n. 15, p. 1412-1426, 2009.

REVERCHON E, DE MARCO I. **Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.** J. of Supercritical Fluids, Volume 38, Páginas 146–166, 2006.

REVERCHON, E.; TADDEO, R.; DELTA PORTA, G. **Extraction of sage oil by supercritical CO₂: Influence of some process parameters.** Science Direct, Volume 8, Issue 4, Pages 302-309, 1995.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C; EL-SALAM, M. A.; BASTOS, J. K. **Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review.** Pharmaceutical Biology, Volume 56, Pages 253-268, 2018.

RODRIGUES, W. **Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil.** Interações (Campo Grande), Vol.17 no.2, 2016.

RODRIGUES, J. **Soxhlet – Laboratório Online.** Disponível em: <<https://www.fciencias.com/2015/01/15/soxhlet-laboratorio-online/>>. Acesso em 09/11/2019.

ROMBAUT N., TIXIER A. S., BILY A., CHEMAT F. **Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery.** Biofuels, Bioprod. Bioref., Vol. 8, P. 530–544, 2014.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. **Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils.** J. Microbiol. Biotechnol. Volume 27, Pages 429–438, 2017.

SANTOS I. V., COUTO L. P. S. M. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante do extrato seco de *Miconia albicans* (Sw.) Tirana (Melastomataceae)**. Monografia, Universidade Federal de Sergipe, 2018.

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

SANTOS R R, FONSECA R S A, FONSECA R S, MARTINS E R. **Fenologia e quimiodiversidade do ‘Chapéu-de-couro’ (*Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus*)**. Cad. Ciênc. Agrá., v. 9, n. 3, p. 115–118, 2017.

SELLA, A. Classic Kit: **Soxhlet Extractor**. Royal Society of Chemistry. University College London, 2007. Disponível em <: <https://www.chemistryworld.com/?redir=http%3A%2F%2Fwww.rsc.org%2Fchemistryworld%2Fissues%2F2007%2FSeptember%2FClassicKitSoxhletExtractor.asp> ;> Acesso em 30 mar. 2020.

SEPERLONI J. M., VILEGAS W., VARANDA E., CÓLUS I. M. **Avaliação in vivo da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo**. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2008.

SHIRSATH S R, SABLE S S, GAIKWAD S G, SONAWANE S H, SAINI D R, GOGATE P R. **Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters**. Ultrasonics Sonochemistry, Volume 38, p. 437-445, 2017.

SHUKLA A, NAIK S N, GOUD V V, DAS C. **Supercritical CO₂ extraction and online fractionation of dry ginger for production of high-quality volatile**

oil and gingerols enriched oleoresin. Elsevier. Industrial Crops and Products, Volume 130, Paginas 352-362, 2019.

SIANI A C, RAMOS M F S, GUIMARÃES A C, SUSUNAGA G S, ZOGHBI M G B. **Volatile Constituents from Oleoresin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. J. Essent. Oil Res., Vol. 11, P. 72-74, 1999.**

SILVA G P, FERNANDES D C, VIGLIANO M V, FONSECA E N, SANTOS S V M, MARQUES P R, JUSTO M G, SABINO K C C, COELHO M G P. **Flavonoid-enriched fraction from *Echinodorus macrophyllum* aqueous extract exhibits high in-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 68, 2016.

SILVA N C C, FERNANDES A J. **Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. J. Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, vol.16, no.3, 2010.**

SILVA T M, MIRANDA R R S, FERRAZ V P, PEREIRA M T, SIQUEIRA E P, ALCÂNTARA A F C. **Changes in the essential oil composition of leaves of *Echinodorus macrophyllum* exposed to γ -radiation.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 23, p. 600-607, 2013.

SILVA T M, DIAS M D, PEREIRA M T, TAKAHASHI J A, FERRAZ V P, PILÓ-VELOSO D, ALCÂNTARA A F C. **Effect of the γ -radiation on phenol fractions obtained from the leaves of *Echinodorus macrophyllum* Mich.** Radiation Physics and Chemistry, v. 81, p. 22–26, 2012.

SINGH, R. **Medicinal plants: A review.** Journal of Plant Sciences, Volume 3, Pages 50-55, 2015.

SINGLETON V L, ROSSI J A. **Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic. Phosphotungstic Acid Reagents,** Am. J. Enol. Vitic., v. 16, n. 3, p.144-158, 1965.

SIVAKUMAR V, VERMA V R, SWAMINATHAN G. **Studies on the use of power ultrasound in solid–liquid myrobalan extraction process.** Journal of Cleaner Production, Vol. 15, n. 18, p. 1813-1818, 2007.

SOBRINHO F A P, SILVA B R. **Notas sobre *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, uma planta aquática ornamental e medicinal.** Water Gardeners International, Vol. 2, N° 2, 2007. Disponível em<: <http://www.watergardenersinternational.org/journal/2-2/bruno/page1p.html> :>. Acesso em 05/10/2020.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** Quim. Nova, Vol. 30, Pages 351-355, 2007.

SOUZA VC, LORENZI H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Instituto Plantarum, Nova Odessa, 640pp, 2005.

STALCUP MM. **Plantas de uso medicinal ou ritual numa feira livre no Rio de Janeiro, Brasil.** Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Botânica), UFRJ, 202 pp, 2000.

SUBRAMANIAN R., SUBBRAMANIYAN P., AMEEN N., RAJ V. **Double bypasses soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum*.** Arabian Journal of Chemistry, Volume 9, Pages S537-S540, 2016.

SURUCHI S K, SINGH L. **A review on medicinal plants having antioxidant potential.** Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology, Volume 1, P. 404, 2013.

SYTAR, O.; HEMMERICH, I.; ZIVCAK, M.; RAUH, C.; BRESTIK, M. **Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants**. Science Direct, Volume 25, Issue 4, Pages 631-641, 2018.

TANUS-RANGEL E, SANTOS S R, LIMA J C S, LOPES L, NOLDIN V, MONACHE F D, CECHINEL-FILHO V, MARTINS D T O. **Topical and Systemic Anti-Inflammatory Effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae)**. Journal of Medicinal Food, v. 13, p. 1161–1166, 2010.

TIKEKAR R V, LUDECHER R D, KARWE M V. **Processing Stability of Squalene in Amaranth and Antioxidant Potential of Amaranth Extract**. J. Agric. Food Chem, 56, 22, p. 10675–10678, 2008.

TOHMA, H.; GULÇIN, I.; BURSAL, E.; GOREN, A. C.; ALWASEL, S. H.; KOKSAL, E. **Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS**. Journal of Food Measurement and Characterization, Volume 11, Pages 556-566, 2017.

TOMÉ L. U., FERREIRA H. D., ALVES V. F., DE OLIVEIRA L. G., BORGES L. L., DE SÁ S., DE PAULA J. R., FIUZA T. S. **Estudo Morfo-Anatômico, Triagem Fitoquímica, Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto e Frações das Folhas de *Miconia albicans* (Sw.) Triana**. Journal of Social, Technological and Environmental Science, v.8, n.2, p. 372-391, 2019.

TRANCOSO M D, BAPTISTA B A V, GOMES G A, GONZALES M M, RIBEIRO T B. **Óleos essenciais: Extração, importância e aplicações no cotidiano**. 53º Congresso Brasileiro de Química. Disponível em <: <http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/14/2780-17038.html> >: Acesso em 02 de abril de 2020.

UDDIN M. S., SARKER M. Z. I., FERDOSH S., AKANDA M. J. H., EASMIN S., SHAMSUDINA S. H. B., YUNUSE K. B. **Phytosterols and their extraction**

from various plantmatrices using supercritical carbon dioxide: a review. J Sci Food Agric, 95, 1385–1394, 2014.

VARGAS F S, ALMEIDA P D O, BOLETI A P A, PEREIRA M M, SOUZA T P, VASCONCELOS M C, NUNEZ C V, POHLIT A M, LIMA E S. **Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as antiinflammatory.** BMC Complementary Altern Med., Vol.16, P.83–91, 2016.

VASCONCELOS M. A. L., FERREIRA D. S., ANDRADE E SILVA M. L, VENEZIANI R. C. S., CUNHA W. R. **Analgesic effects of crude extract of *Miconia albicans* (Melastomataceae).** Boll. Chim. Farmac. 142 (8), 2003.

VASCONCELOS M. A. L., ROYO V. A., FERREIRA D. S., CROTTI A. E. M., ANDRADE E SILVA M. L., CARVALHO J. C. T., BASTOS J. K., CUNHA W. R. **In vivo Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Ursolic Acid and Oleanoic Acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae).** Z. Naturforsch. 61c, 477-482, 2006.

VASHIST H., JINDAL A. **Antimicrobial Activities of Medicinal Plants – Review.** International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. Vol. 3 (1), p. 222, 2012

VAZ M S M. **Efeito anti-hiperuricêmico do extrato etanólico das folhas da *Echinodorus macrophyllus* e avaliação do potencial genotóxico e mutagênico in vivo.** Dissertação. Universidade Federal da Grande Dourados. 2015.

VEGGI P. C. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos.** Dissertação, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

VEIGA E C. **Composição química de *Echinodorus macrophyllus* (KUNTH) Micheli (Chapéu de couro): Uma abordagem teórica.** Monografia. Faculdade de Educação e Meio Ambiente, 2012.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. **Plantas medicinais: Cura segura?** Química Nova, Vol. 28, No. 3, Pages 519-528, 2005.

VETAL M D, LADE V G, RATHOD V K. **Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* by ultrasound: Process intensification and kinetic studies.** Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, Vol. 69, p. 24-30, 2013.

VIANA, E.; MOLTÓ, J. C.; FONT, G. **Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables.** Science Direct, Volume 754, Issues 1–2, Pages 437-444, 1996.

VIEIRA JUNIOR G M, DE SOUZA C M L, CHAVES M H. **Resina de *Protium heptaphyllum*: Isolamento, caracterização escritital e avaliação das propriedades térmicas.** Quim. Nova, Vol. 28, No. 2, 183-187, 2005.

VIOLANTE I M P, HEMERSKY L, GARCEZ W S, BATISTA A L, CHANG M R, POTT V J, GARCEZ F R. **Antimicrobial activity of some medicinal plants from the Cerrado of the central-western region of Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology, 1302-1308, 2012.

VIKRANT A, ARYA M L. **A Review on Anti-Inflammatory Plant Barks.** International Journal of PharmTech Research, Vol. 3, No.2, pp 899-908, 2011.

WEJNEROWSKA G, HEINRICH P, GACA J. **Separation of squalene and oil from *Amaranthus* seeds by supercritical carbon dioxide.** Separation and Purification Technology, V. 110, P. 39-43, 2013.

WEN C, ZHANG J, ZHANG H, DZAH C S, ZANDILE M, DUAN Y, MA H, LUO X. **Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds**

from cash crops – A review. Ultrasonics - Sonochemistry, V 48, p. 538–549, 2018.

WETTESTEIN D V. **Chlorophyll- letate and Der supmkroskopisch fromwecksee Der plastiden.** Exp. Cell Res., V. 17, p. 427, 1959.

ZOGHBP M G B, SIQUEIRA J B G, WOLTER E L A, JÚNIOR O L P. **Constituintes químicos de *Protium paniculatum* (Burseraceae).** ACTA AMAZONICA, Vol. 23, P. 187-189, 1993.

ZOUGAGH M, VALCARCEL M, RÍOS A. **Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness.** Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 5, 2004.