



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**



**RÚBNER GONÇALVES PEREIRA**

**EXTRAÇÃO DE LIGNANAS A PARTIR DE QUEBRA-PEDRA (*Phyllanthus amarus*)  
UTILIZANDO FLUIDOS PRESSURIZADOS**

CAMPINAS  
2017

**RÚBNER GONÇALVES PEREIRA**

**EXTRAÇÃO DE LIGNANAS A PARTIR DE QUEBRA-PEDRA (*Phyllanthus amarus*)  
UTILIZANDO FLUIDOS PRESSURIZADOS**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

Orientador: Julian Martínez

Co-orientadora: Vera Lucia Garcia

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO  
RÚBNER GONÇALVES PEREIRA E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. JULIAN  
MARTÍNEZ

CAMPINAS  
2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

P414e Pereira, Rúbner Gonçalves, 1986-  
Extração de lignanas a partir de Quebra-Pedra (*Phyllanthus amarus*)  
utilizando fluidos pressurizados / Rúbner Gonçalves Pereira. – Campinas, SP :  
[s.n.], 2017.

Orientador: Julian Martínez.  
Coorientador: Vera Lúcia Garcia.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Engenharia de Alimentos.

1. Extração com fluido supercrítico. 2. Extração com líquido pressurizado. 3.  
Lignanas. 4. Filantina. 5. Nirantina. I. Martínez, Julian. II. Garcia, Vera Lúcia. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
IV. Título.

### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Extraction of lignans from *Phyllanthus amarus* using pressurized fluids

**Palavras-chave em inglês:**

Supercritical fluid extraction

Pressurized liquid extraction

Lignans

Phyllanthin

Niranthin

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Doutor em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Julian Martínez [Orientador]

Adilson Sartoratto

Alessandra Lopes de Oliveira

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Simone Andrade Gualberto

**Data de defesa:** 09-03-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Julian Martínez**

Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

---

**Dr. Adilson Sartoratto**

Membro Titular

Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – UNICAMP

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Lopes de Oliveira**

Membro Titular

Universidade de São Paulo – USP

---

**Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues**

Membro Titular

Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – UNICAMP

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Andrade Gualberto**

Membro Titular

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB

---

**Prof. Dr. Fernando Antônio Cabral**

Membro Suplente

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

---

**Prof. Dr. Juan Felipe Osorio-Tobón**

Membro Suplente

Colegio Mayor de Antioquia – COLMAYOR

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Martin do Prado**

Membro Suplente

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo da vida acadêmica do aluno.

*Da eterna procura*

*Só o desejo inquieto, que não passa,  
Faz o encanto da coisa desejada...  
E terminamos desdenhando a caça  
Pela doida aventura da caçada.*

*(trecho do poema Espelho mágico)*

*Mario Quintana*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Julian Martínez pela orientação no trabalho e por ter permitido que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa.

A Prof<sup>a</sup> Vera Lucia Garcia por toda a paciência, carinho e dedicação ao me co-orientar.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) pela oportunidade concedida de ser discente do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Aos Funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA): técnicos de laboratórios, funcionários da secretaria, equipe de limpeza, professores. O trabalho de vocês possibilitou que o meu pudesse ser realizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão a bolsa.

A TODOS do Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos (LAPEA) pelo companheirismo e ajuda em muitos momentos sofridos na realização dos experimentos.

Ao Renato Nakamura por ter aceitado participar desse trabalho como estudante de iniciação científica.

Ao pessoal da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF) do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), em especial Marili, Adriana, Adilson, Sinésio, Gabi, Renata, Elô, Carol; por terem sempre paciência e boa-vontade para me ajudar sempre que precisei.

Aos companheiros e amigos da Capela: Jancei, Daniel Barbeiro, Manuel, Rândilla, Arthur, Pasquel e Ariel. Obrigado por conviverem comigo todos esses anos.

Aos amigos de perto, em especial Daniel Lachos, Andressa, Juliane, Paulo, Mirla, Alex, Evelin, Alexander, Abel, Cecília, Giovani, Bruce, Brianna, Fabíola e Rúbia. E aos amigos de longe, Vanessa, Evaldo, Milene, Luciene, Iasnaia, Danilo, Jane, Pilar e Faber; e tantos outros que passaram por minha vida.

A Vitor pelo amor, apoio e parceria nesse último ano.

Aos meus pais (Ildeu e Nice) e familiares, em especial Jullia, Lais, Vitor, July e Arthur que são importantes alicerces para minha vida.

## RESUMO

Os processos de desenvolvimento, produção e utilização de produtos derivados de origem natural com propriedades bioativas têm chamado atenção, especialmente devido às suas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Dentre esses processos, a tecnologia que usa fluidos pressurizados vem sendo muito estudada, tendo como principal vantagem o apelo de ser uma tecnologia limpa e de alta seletividade, sobretudo quando se utiliza dióxido de carbono supercrítico. Relatos da aplicação dessa tecnologia para extração a partir da planta *Phyllanthus amarus* são muito escassos, mas a mesma é necessária tanto para a obtenção de extratos livres de solventes tóxicos quanto pela possibilidade de obtenção de extratos enriquecidos em compostos bioativos. Tendo em vista que as lignanas são os compostos de maior interesse dessa planta pela ação farmacológica, este projeto teve como objetivo a obtenção de extratos ricos em lignanas a partir da espécie *P. amarus* utilizando fluidos pressurizados como solventes. A proposta foi realizar extrações: i. por líquidos pressurizados (*Pressurized Liquid Extraction* - PLE), utilizando água e etanol como solventes, avaliando o efeito da temperatura e comparando com um método de extração à baixa pressão com dispersor UltraTurrax (Extração com Ultra-Turrax - EUT); ii. por fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid Extraction* – SFE) utilizando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solvente (SFE1) e avaliando o efeito da temperatura, da pressão e da adição de cossolvente (SFE2). A análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas foi utilizada para a identificação dos compostos presentes nos extratos obtidos por PLE e EUT, e a quantificação das lignanas filantina e nirantina nos extratos obtidos por todos os métodos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detector de Arranjo de Diodos. Para as melhores condições de extração foram realizadas as estimativas de custo de manufatura (COM). Dos resultados obtidos, verificou-se que etanol 50% em água (v/v) foi o melhor solvente para extrair maiores quantidades de ambas as lignanas da matéria-prima, pelos métodos PLE e EUT. Contudo, o uso de etanol absoluto como solvente levou a extratos mais concentrados em filantina e nirantina. A temperatura não foi significativa na PLE no intervalo estudado. Nos processos de SFE, verificou-se que a temperatura e a pressão foram parâmetros significativos para a extração de lignanas por SFE1 mas não por SFE2. O uso de cossolvente na SFE2 provocou um aumento na quantidade de lignanas obtidas a partir da matéria-prima em comparação com a SFE1, mas diminuiu a seletividade do processo, já que para a SFE2 a concentração de lignanas no extrato ficou entre 2,5 e 4,0%, enquanto na SFE1 foi de 25 a 35%. Verificou-se que o custo da matéria-prima representa mais de 90% do COM dos processos estudados. Os valores de COM dos

processos PLE e SFE2 foram menores que o de SFE1. No entanto, na melhor condição de SFE1 se obtêm extratos 9 e 17 vezes mais puros que os obtidos nas melhores condições de SFE2 e PLE, respectivamente.

**Palavras-chave:** *extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado, lignanas, filantina, nirantina.*

## ABSTRACT

The processes of development, production and use of natural products with bioactive properties have attracted attention in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Among these processes, the technology that uses pressurized fluids has been largely studied. However, reports of the application for extraction from *Phyllanthus amarus* are rare, but it is necessary to obtain extracts free of toxic solvents (clean technology) and with a higher concentration of the bioactive compound (high selectivity) when compared to conventional techniques. Considering that lignans are the major bioactive compounds of this plant, this work had the objective of obtaining extracts rich in lignans from *P. amarus* using pressurized fluids as solvents. The proposal was to perform extractions: i. By Pressurized Liquid Extraction (PLE), using water and ethanol as solvents, evaluating the effect of temperature and comparing with a low-pressure extraction method (Ultra-Turrax Disperser Extraction - EUT); ii. Supercritical Fluid Extraction (SFE) using carbon dioxide as solvent (SFE1) and evaluating the effect of temperature, pressure, and the addition of cosolvent (SFE2). The analysis of Gas Chromatography - Mass Spectrometry was used to identify the compounds present in the extracts obtained by PLE and EUT. The quantification of phyllanthin and niranthin in the extracts was performed by High-Performance Liquid Chromatography with a Diode-Array Detector. The estimative of the Cost of Manufacturing (COM) were performed for the best extraction conditions. It was verified that ethanol 50% (v / v) was the best solvent to extract larger quantities of both lignans of the raw material, by the PLE and EUT methods. However, the use of absolute ethanol as solvent leads to extracts with higher concentrations of phyllanthin and niranthin. The temperature was not significant in PLE. In SFE processes, it was found that temperature and pressure are significant parameters for the extraction of lignans by SFE1 but not by SFE2. The use of cosolvents in SFE2 caused an increase of lignans obtained from raw material compared to SFE1 but decreased the selectivity of the process, since the concentration of lignans in the SFE2 extract was between 2.5 and 4.0% while it was 25 to 35% for SFE1. It was verified that the cost of the raw material represents more than 90% of the COM of the processes studied. The COM values of PLE and SFE2 were lower than that of SFE1. However, in the best SFE1 condition, the obtained extracts are 9 and 17 times richer than those obtained under the best conditions of SFE2 and PLE, respectively.

**Key words:** *supercritical fluid extraction, pressurized liquid extraction, lignans, phyllanthin, niranthin.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de uma lignana pela definição clássica.....	23
Figura 2. Estruturas básicas das principais classes de lignanas.....	23
Figura 3. <i>Phyllanthus amarus</i> Schum & Thonn.....	29
Figura 4. Diagrama de fases genérico pressão-temperatura de uma substância pura.....	43
Figura 5. Diagrama das atividades do projeto. ....	47
Figura 6. Unidade de extração construída no LAPEA. ....	49
Figura 7. (a) Esquema da unidade de extração. (b) Esquema detalhado da célula de extração usada nos experimentos. ....	50
Figura 8. Ilustração do dispersor ultraturrax T18 usado para os experimentos de extração ....	51
Figura 9. Fluxograma dos procesos obtidos pelo software SuperPro Designer 8.5®: A) SFE2; B) SFE1; C) PLE .....	58
Figura 10. Distribuição de diâmetro de partículas.....	61
Figura 11. Testes de cinética de extração a partir de <i>P. amarus</i> por PLE, utilizando etanol absoluto como solvente a 35 °C e 10 MPa. ....	62
Figura 12. Testes de cinética de extração a partir de <i>P. amarus</i> por PLE, utilizando água como solvente a 35 °C e 10 MPa. ....	63
Figura 13. Rendimentos globais ( $x_0$ ) obtidos por PLE para cada temperatura (°C) e tipo de solvente.....	64
Figura 14. Comparação entre os menores $x_0$ de cada solvente utilizado no PLE (35 °C e 10 MPa) e os $x_0$ obtidos por EUT utilizando os mesmos solventes. ....	67
Figura 15. Janela expandida do cromatograma típico dos extratos de <i>P. amarus</i> obtidos por PLE.....	68
Figura 16. Janela expandida do cromatograma típico dos extratos de <i>P. amarus</i> obtidos por EUT. ....	69
Figura 17. Comparação dos rendimentos de filantina e nirantina obtidos por PLE (valores médios de 35 °C a 80 °C e a 10 MPa) e EUT.....	73
Figura 18. Cinética de extração por SFE1 a partir de <i>P. amarus</i> a 40 °C e 10 MPa, com vazão de CO <sub>2</sub> de 1,75x10 <sup>-4</sup> kg.s <sup>-1</sup> .....	75
Figura 19. Cinética de extração por SFE2 a partir de <i>P. amarus</i> , à 40 °C e 10 MPa, com vazão de CO <sub>2</sub> de 1,79x10 <sup>-4</sup> kg/s e vazão de cossolvente de 1,07 mL/min.....	76
Figura 20. Rendimento global ( $x_0$ ) em função da densidade do CO <sub>2</sub> supercrítico.....	77

Figura 21. Rendimentos de lignanas ( $x_{1a}$ e $x_{1e}$ ) em função da densidade de $\text{CO}_2$ no método SFE1. ....	80
Figura 22. Percentual de cada lignana nos extratos para SFE1 e SFE2. ....	82
Figura 23. Custos de Manufatura (COM) para cada processo estudado. ....	84
Figura 24. Componentes do custo de manufatura (COM) para as condições ótimas de cada processo. ....	86
Figura 25. Custo de manufatura calculado por grama de lignana extraída (COM-Lig) para cada processo. ....	89
Figura 26. Janela expandida do cromatograma do extrato de <i>P. amarus</i> obtido por SFE1, a 40 °C e 20 MPa e analisado por GC/MS. ....	90
Figura 27. Janela expandida do cromatograma do extrato de <i>P. amarus</i> obtido por SFE2, a 40 °C e 10 MPa e analisado por GC/MS. ....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lignanas de diferentes classes encontradas em diversas espécies.....	24
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos principais solventes utilizados em métodos de extração.....	34
Tabela 3. Classificação de risco dos solventes de acordo com a National Fire Protection Association (NFPA). .....	34
Tabela 4. Trabalhos experimentais de extração envolvendo PLE e SFE desenvolvidos pela equipe do LAPEA nos últimos cinco anos. ....	40
Tabela 5. Propriedades críticas de alguns solventes.....	44
Tabela 6. Planejamento experimental para o processo de PLE.....	52
Tabela 7. Planejamento Experimental do método a baixa pressão.....	53
Tabela 8. Planejamento experimental para os processos de SFE sem e com cossolvente. ....	54
Tabela 9. Custos base dos equipamentos que compõem a planta de extração .....	59
Tabela 10. Parâmetros econômicos de entrada utilizados na simulação. ....	60
Tabela 11. Teor de umidade da amostra e caracterização do leito de partículas.....	61
Tabela 12. Rendimentos global, de filantina e nirantina obtidos por PLE para <i>P. amarus</i> em diferentes temperaturas e composição do solvente.....	65
Tabela 13. Rendimentos global, de filantina e nirantina obtidos por EUT para <i>P. amarus</i> em função da composição do solvente. ....	65
Tabela 14. Principais fragmentos observados no espectro de massas dos compostos presentes nos extratos de <i>P. amarus</i> .....	70
Tabela 15. Parâmetros dos modelos ajustados para os resultados de rendimento de lignanas por grama de amostra dos extratos de <i>P. amarus</i> obtidos por PLE.....	72
Tabela 16. Resultados de rendimento global por SFE1.....	76
Tabela 17. Resultados de rendimento global por SFE2.....	78
Tabela 18. Resultados experimentais de rendimentos de lignanas em termos de amostra ( $x_{1a}$ ) e extrato ( $x_{1e}$ ) para os processos SFE1 e SFE2. ....	81
Tabela 19. Custo de Manufatura (COM) e seus componentes calculados para a matéria-prima com custo de US\$75,98/kg.....	85
Tabela 20. Razão entre os valores de COM de cada processo .....	87
Tabela 21. Razão entre as somas das concentrações das lignanas para cada processo .....	87

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

### SÍMBOLOS

- $\mu$  = viscosidade
- $\rho$  = densidade
- $\varepsilon$  = constante dielétrica
- $I_p$  = índice de polaridade de Snyder
- $S$  = Solubilidade
- $P_c$  = Pressão Crítica
- $T_c$  = Temperatura Crítica
- $MM$  = Massa Molecular
- $CO_2$  = Dióxido de Carbono
- $x_0$  = rendimento global de extração
- $x_{la}$  = rendimento de lignana por grama de amostra seca
- $x_{le}$  = rendimento de lignana por grama de extrato
- $\beta_i$  ( $i = 0, 1, 2, 1-2, 1-1, 2-2$ ) = parâmetros do modelo testado na análise estatística
- $Y$  = variável resposta do modelo testado na análise estatística
- $R^2$  = Coeficiente de Determinação
- $d_{mp}$  = diâmetro médio de partículas
- $Q_1, Q_2$  = Capacidade do extrator na simulação dos processos
- $S/F$  = razão entre a massa de solvente (Solvent) e a massa de amostra (Feed) usada na extração.

### ABREVIATURAS E SIGLAS

- SFE = Supercritical Fluid Extraction (Extração com Fluidos Supercríticos)
- PLE = Pressurized Liquid Extraction (Extração com Líquidos Pressurizados)
- EUT = Extração com Ultra Turrax
- UT = Ultrassom
- SFE1 = SFE apenas com  $CO_2$  puro
- SFE2 = SFE com cossolvente
- GRAS = Generally Recognized As Safe (Geralmente reconhecido como seguro)
- GC-MS = Gas Chromatography - Mass Spectrometry (Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas)

- HPLC-DAD = High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos)
- ANOVA = Análise de Variância
- COM = Cost of Manufacturing (Custo de Manufatura)
- COM-lig = COM calculado por grama de lignana extraída
- FCI = Fixed Capital of Investment (Capital de investimento fixo)
- CRM = Cost of Raw Material (Custo de matéria-prima)
- CWT = Cust of Waste Treatment (Custo de tratamento de resíduos)
- COL = Cost of Operational Labor (Custo de mão-de-obra operacional)
- CUT = Cost of Utilities (Custo de Utilidades)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	18
	OBJETIVOS.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	Metabólitos secundários e compostos fenólicos .....	22
2.2	Lignanas.....	22
2.3	<i>Phyllanthus amarus</i> Schum & Thonn.....	28
2.3.1	Generalidades sobre a espécie .....	28
2.3.2	Medicina popular, estudos farmacológicos e clínicos .....	29
2.4	Extração de compostos bioativos.....	33
2.4.1	Técnicas convencionais de extração.....	37
2.4.2	Técnicas Não-Convencionais de Extração .....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	47
3.1	Reagentes e equipamentos .....	47
3.2	Material vegetal .....	47
3.2.1	Pré-tratamento do material vegetal.....	48
3.2.2	Caracterização do leito de partículas .....	48
3.3	Processos de extração .....	49
3.3.1	Extração com Líquidos Pressurizados – PLE.....	51
3.3.2	Extração com UltraTurrax – EUT .....	52
3.3.3	Extrações com CO <sub>2</sub> supercrítico.....	53
3.4	Análises dos extratos .....	55
3.4.1	Identificação das lignanas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) - Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS).....	55
3.4.2	Quantificação de filantina e nirantina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	56
3.5	Análises Estatísticas.....	56

3.6	Simulação dos processos industriais de extração com fluidos pressurizados.....	57
3.7	Avaliação econômica.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1	Matéria-prima e Caracterização do leite.....	61
4.2	Extração com Líquidos Pressurizados (PLE) e Extração com Ultra Turrax (EUT) ..	62
4.2.1	Experimentos preliminares.....	62
4.2.2	Rendimento Global - $x_0$ (%).....	64
4.2.3	Identificação das lignanas.....	68
4.2.4	Quantificação da Filantina e da Nirantina.....	70
4.3	Extração com fluido supercrítico.....	75
4.3.1	Experimentos preliminares.....	75
4.3.2	Rendimento Global – $x_0$ (%).....	76
4.3.3	Quantificação de Filantina e Nirantina.....	78
4.4	Avaliação Econômica dos processos de extração.....	83
5	CONCLUSÕES.....	91
6	DIFICULDADES ENCONTRADAS.....	92
7	PERSPECTIVAS.....	94
8	REFERÊNCIAS.....	96
	MEMÓRIA.....	108
	APÊNDICES.....	110
	APÊNDICE A – Equipamentos e Reagentes.....	111
	APÊNDICE B – Curvas de Calibração.....	114
	APÊNDICE C – Resultados Experimentais com replicatas.....	118
	APÊNDICE D – Relatórios do SAS.....	125
	APÊNDICE E – Fragmentogramas das lignanas obtidos por CG/EM.....	149
	APÊNDICE F – Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD.....	154
	APÊNDICE G – Relatório do SuperPro Designer.....	157

ANEXO .....	158
-------------	-----

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Não é recente o interesse na utilização de espécies vegetais com propriedades terapêuticas na medicina popular. Entretanto, grande parte da riqueza desse material vegetal não tem sido completamente avaliada em estudos fitoquímicos e farmacológicos. Mesmo que, no âmbito industrial, a utilização das espécies vegetais já ocorra no preparo de um amplo espectro de produtos, como extratos e seus derivados e compostos isolados, onde se tem o uso direto destes princípios (TERAMOTO et al., 2008), muito ainda deve ser investigado acerca dos compostos bioativos presentes nesses materiais, buscando sua maior aplicação em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios.

O gênero *Phyllanthus* compreende cerca de 750 espécies, muitas das quais são de interesse farmacológico. As plantas desse gênero são muito utilizadas na medicina popular para tratar os rins e distúrbios urinários, infecções intestinais, diabetes e hepatite B (ARUNA KUMAR et al., 2010; CALIXTO et al., 1998; EZURUIKE; PRIETO, 2013; KUMARAN; JOEL KARUNAKARAN, 2007; PATEL et al., 2011; SPRENGER; CASS, 2013; YUANDANI et al., 2013). *Phyllanthus* spp. faz parte da “Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS” (Rennisus), uma lista de plantas medicinais criada pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde. A finalidade da lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (BRASIL, 2009).

Dentre essas espécies está a *Phyllanthus amarus*, conhecida popularmente no Brasil como quebra-pedra, arrebenta-pedra ou erva-pombinha. Esta espécie é rica em lignanas, um grupo de compostos farmacologicamente ativo. Quimicamente as lignanas pertencem a uma classe de metabólitos secundários de plantas produzidas pela dimerização oxidativa de duas unidades de fenilpropanóide com uma enorme diversidade de estruturas.

Das várias classes de compostos químicos presentes na planta *P. amarus*, as lignanas foram uma das primeiras classes a serem descritas, sendo que nirtetralina, hipofilantina, filantina, filtetralina e nirantina, foram identificadas há mais de uma década (KASSUYA et al., 2006). De acordo com Patel et al. (2011), também já foram encontrados na planta alcaloides, flavonoides, taninos hidrolisáveis, triterpenos e esteróis.

São atribuídas aos extratos e compostos isolados de *P. amarus* diversas atividades farmacológicas (KHATOON et al., 2006; PATEL et al., 2011), tais como: antidiabética (ADENEYE, 2012), antimicrobiana (MAZUMDER; MAHATO; MAZUMDER, 2006),

antioxidante (KUMARAN; JOEL KARUNAKARAN, 2007; LIM; MURTIJAYA, 2007; MAHOMOODALLY; MUTHOORA, 2014; MAITY et al., 2013a), antiviral (NOTKA; MEIER; WAGNER, 2004; RAVIKUMAR et al., 2011), anti-inflamatória (KASSUYA et al., 2005, 2006), antialodínica<sup>1</sup> (KASSUYA; SILVESTRE; REHDER, 2003), anticâncer e hepatoprotetora (CHIRDCHUPUNSEREE; PRAMYOTHIN, 2010).

Na última década, algumas pesquisas realizadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e no Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP têm demonstrado promissora atividade esquistossomicida de extratos e frações dessa espécie, sobretudo pela ação das lignanas, resultado importante do ponto de vista social, uma vez que a esquistossomose é uma das chamadas doenças negligenciadas, com poucos estudos de produção de novos fármacos (OLIVEIRA, 2012).

Para a extração dos diversos compostos presentes na espécie *Phyllanthus amarus*, vários métodos podem ser utilizados. A literatura apresenta métodos de extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais desde os mais convencionais, como extração à baixa pressão com solventes orgânicos (MAITY et al., 2013a; SPRENGER; CASS, 2013), às tecnologias mais recentes, como extração assistida por ultrassom (ŞAHIN; SAMLI, 2013; WANG et al., 2013), extração assistida por microondas (LI et al., 2012; MARAN et al., 2013), a extração com líquidos pressurizados (PLE – Pressurized Liquid Extraction) (LUTHRIA, 2012; MACHADO et al., 2015a; PAES et al., 2014; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012a) e a extração com fluido supercrítico (SFE – Supercritical Fluid Extraction) (BARRALES; REZENDE; MARTÍNEZ, 2015; DE AGUIAR et al., 2014; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PASQUEL REÁTEGUI et al., 2014). Azmir et al. (2013) e Wijngaard et al. (2012) realizaram uma extensa revisão sobre estes e outros métodos de extração de compostos bioativos presentes em materiais vegetais.

Dentre estas técnicas, a PLE e a SFE, que utilizam fluidos a altas pressões como solventes de extração, têm merecido muita atenção nas últimas décadas. A utilização destes fluidos pressurizados permite uma melhora da solubilidade dos compostos a serem extraídos, bem como uma aceleração da cinética de dessorção destes compostos da matriz vegetal (RICHTER et al., 1996). Nestes métodos, os solventes, preferencialmente não-tóxicos, são escolhidos com base nas características de solubilidade do soluto desejado. O ideal seria conseguir atingir uma substância mais pura possível e ter alta solubilidade do soluto no solvente, enquanto outros componentes da matriz sólida permanecessem insolúveis. No

---

<sup>1</sup> Allodynia é uma disfunção da atividade cerebral que se manifesta como uma sensação de dor quando, normalmente, o estímulo não é doloroso (toque, calor, frio, entre outros).

entanto, mesmo que na prática o processo não ocorra idealmente, a escolha do solvente é muito importante. E com o solvente de trabalho definido, suas propriedades físico-químicas (densidade, difusividade, viscosidade e constante dielétrica) podem ser controladas pela variação da pressão e da temperatura do sistema de extração. Deste modo, o poder de solubilização e a seletividade desse solvente podem ser eficazmente monitorados (PRONYK; MAZZA, 2009).

A desvantagem usualmente relatada em estudos com SFE e PLE é o alto custo de investimento inicial. Muitas empresas e investidores consideram estas técnicas muito caras devido aos custos elevados de investimento em comparação com equipamentos clássicos de baixa pressão, restringindo o uso desta tecnologia para produtos de alto valor agregado (PERRUT, 2000). No entanto, os custos operacionais são baixos, justificando a sua utilização. Além disso, o custo da matéria-prima é um fator limitante quando não se trabalha com reaproveitamento de resíduos. De acordo com Albuquerque e Meireles (2012) o custo da matéria-prima é a maior influência para o custo de produção (COM), sendo até 80% do Custo de Manufatura (COM) ao executar processos que envolvem tecnologia supercrítica.

Diante das vantagens apresentadas para as técnicas PLE e SFE e tendo em vista as possíveis limitações em termos de custos, é necessário que estas técnicas sejam avaliadas para a extração de compostos bioativos presentes em *P. amarus*.

## OBJETIVOS

Tendo em vista o que foi apresentado, o objetivo principal deste projeto foi obter extratos ricos em lignanas a partir da espécie *Phyllanthus amarus* utilizando fluidos pressurizados.

Entre os objetivos específicos, tem-se:

- Realizar a técnica de extração com líquidos pressurizados (Pressurized Liquid Extraction – PLE), utilizando etanol e água como solventes;
- Avaliar a influência da temperatura e do tipo de solvente nos extratos obtidos por PLE;
- Realizar as técnicas de extração com fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Extraction – SFE) com e sem co-solvente;
- Avaliar a influência da temperatura e da pressão nos extratos obtidos por SFE;
- Analisar por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-EM) todos os extratos obtidos para identificar as lignanas presentes;
- Quantificar as lignanas filantina e nirantina por HPLC-DAD;
- Estimar o custo de manufatura nas melhores condições de extração.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Metabólitos secundários e compostos fenólicos*

Diversas partes das plantas, como raiz, caule e folhas, podem conter substâncias bioativas denominadas metabólitos secundários, que estão envolvidos em muitos processos fisiológicos, particularmente naqueles que respondem ao estímulo ambiental. Neste grupo de metabólitos estão compostos nitrogenados (alcaloides, aminas, aminoácidos, glicosinolatos, entre outros) e não nitrogenados, como os terpenoides, saponinas e compostos fenólicos (flavonoides, antocianinas, taninos, ácidos fenólicos, lignanas) (WINK, 2004).

Os compostos fenólicos são uma classe bastante abundante e sua concentração nas plantas depende da variedade, clima, solo e condições de cultivo. Eles são derivados das vias pentose fostato, chiquimato e fenilpropanoides em plantas e exibem uma vasta gama de propriedades bioativas, tais como antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombótico, cardioprotetor, entre outros.

Os compostos fenólicos podem ser classificados com base na sua estrutura básica da seguinte forma: C<sub>6</sub> (fenóis simples e benzoquinonas), C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (ácidos fenólicos), C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> (acetofenonas e ácidos fenilacético), C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas, fenilpropenos, e cromonas), C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub> (naftoquinonas), C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (xantonas), C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> (estilbenos e antraquinonas), C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (flavonoides e isoflavonas), (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>)<sub>2</sub> (taninos hidrolisáveis), (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (lignanas), (C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (biflavonoides), (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub> (ligninas), (C<sub>6</sub>)<sub>n</sub> (melaninas catecol), e (C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub> (taninos condensados).

### 2.2 *Lignanas*

Pela definição clássica criada em 1936, as lignanas são compostos formados pela união de duas unidades de fenilpropanoide pela ligação 8-8' (Figura 1) (HAWORTH, 1942). Como um grande número de outros fenilpropanoides diméricos (ou até oligoméricos) não poderiam ser classificados de acordo com esta definição, foi criado termo "neolignana" para incluir outros modos de acoplamento. Posteriormente, para adicionar ainda mais a esta complexidade, o termo oxineolignana também foi criado para incluir mais tipos de ligações.

O uso contínuo dos termos lignanas, neolignanas e oxineolignanas resultou em inconsistências graves de nomenclatura, sendo necessário assumir que o termo geral "lignana" passasse a abranger todas as lignanas da definição clássica, as neolignanas e as oxineolignanas,

independentemente da sua composição monomérica e dos tipos de ligação (VASSÃO et al., 2010), mas havendo a divisão em diversas classes.

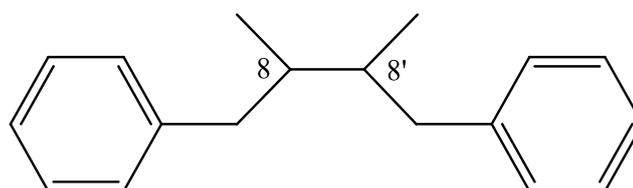


Figura 1. Esquema de uma lignana pela definição clássica.

Dos vários tipos conhecidos de lignanas, no entanto, aquelas formadas pela ligação 8-8' parecem ser as mais difundidas na natureza com base em dados quimiotaxonômicos atuais. Elas também podem ser subdivididas em furofuranas, tetra-hidrofuranas, diarilbutanas, diarilbutirolactonas, ariltetrahidronaftalenas (ou tetralinas), arilnaftalenas e dibenzociclo-octadienos. As estruturas básicas das classes mais comuns estão apresentadas na Figura 2. Alguns exemplos de lignanas dessas quatro classes são mostrados na Tabela 1, com suas respectivas fontes vegetais.

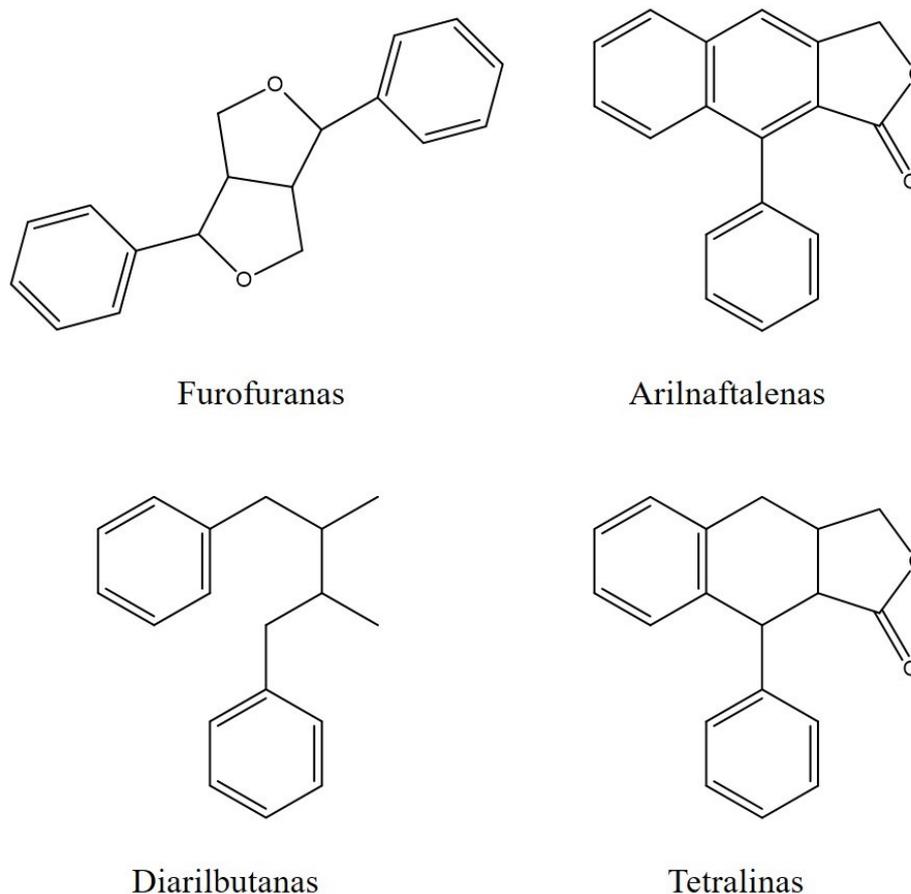
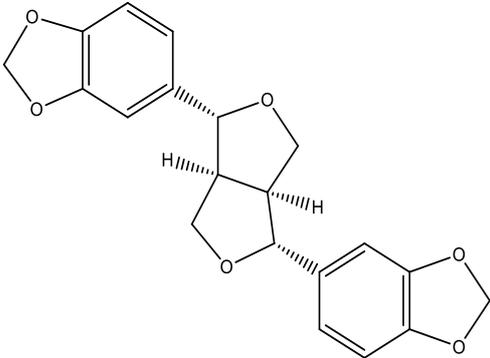
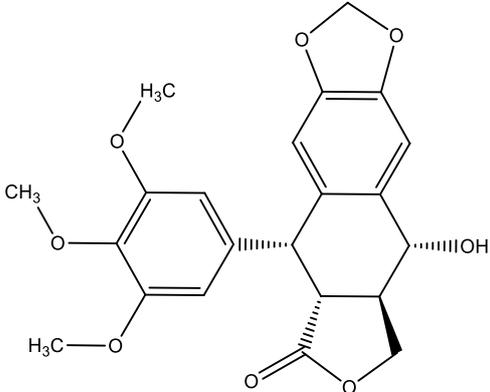
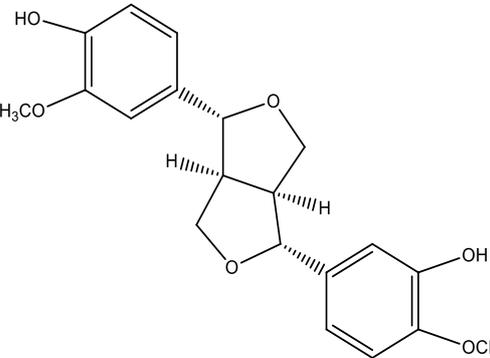
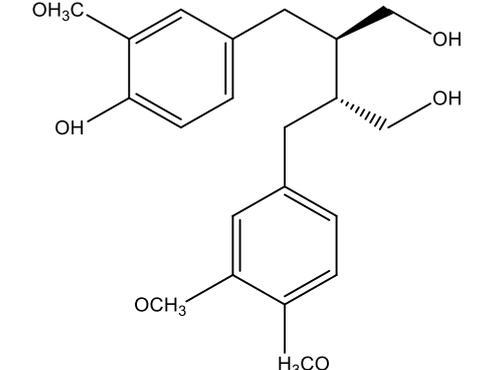
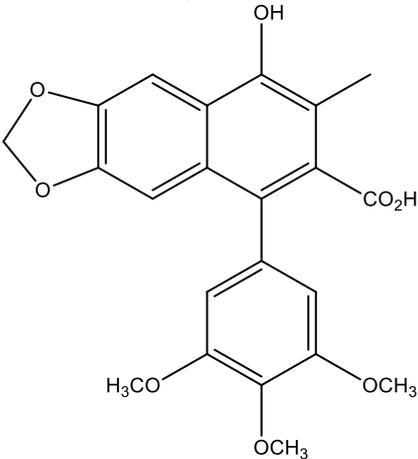
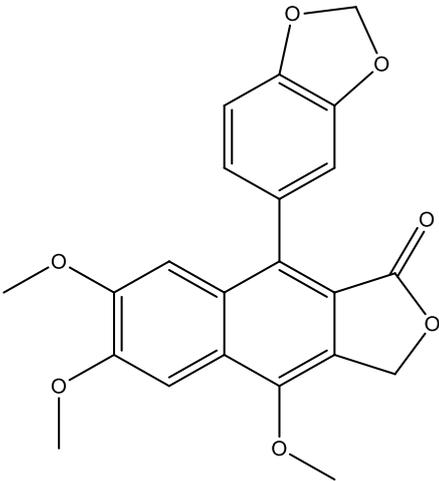
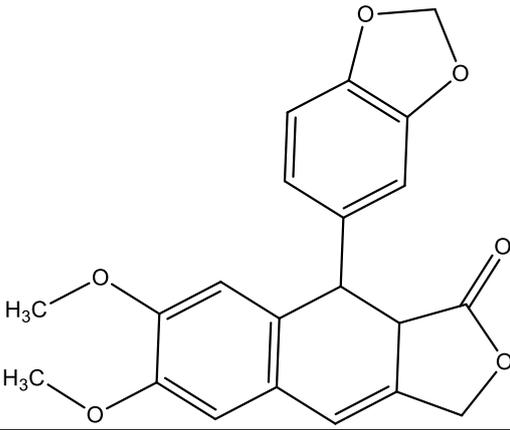
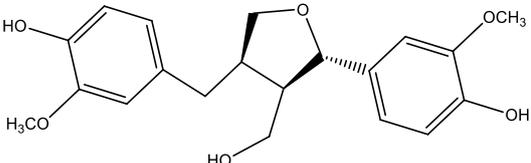
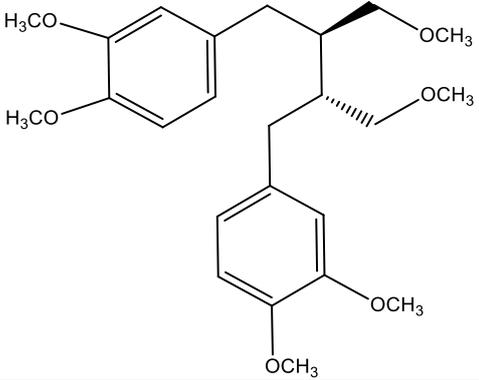
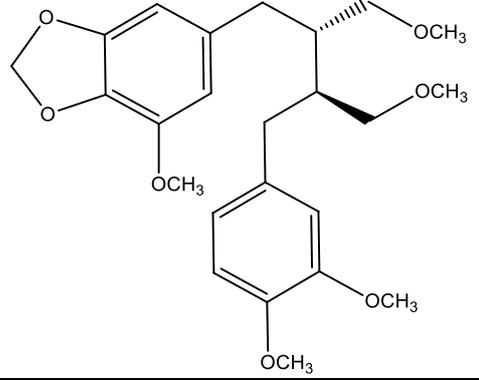
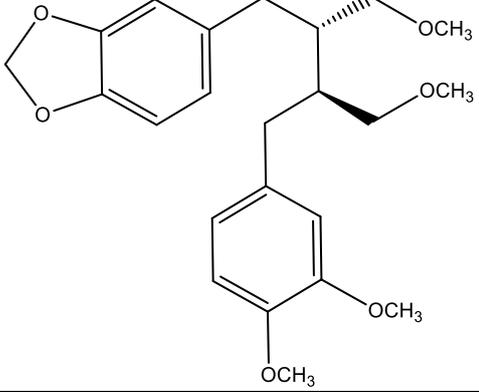
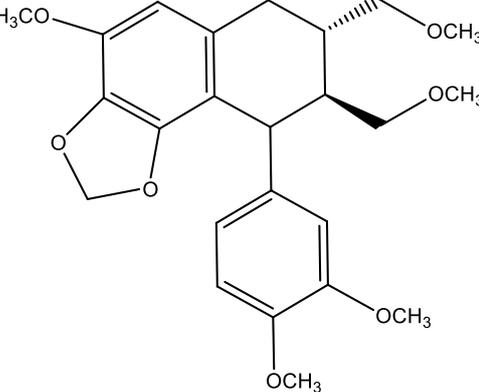


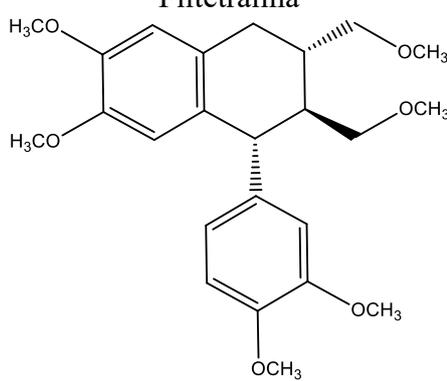
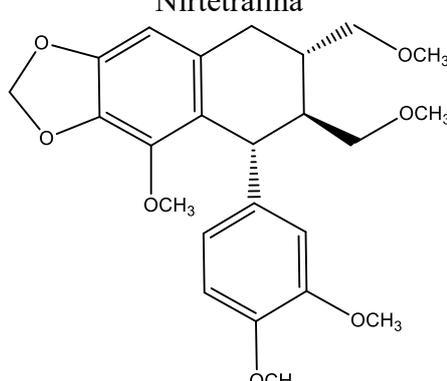
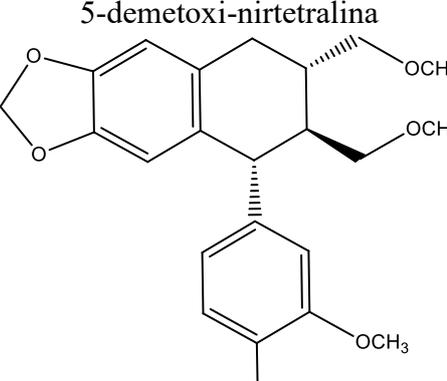
Figura 2. Estruturas básicas das principais classes de lignanas.

Tabela 1. Lignanas de diferentes classes encontradas em diversas espécies.

Lignana	Classe	Fontes
<p>Sesamina</p> 	Furofurana	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sesamin indicum</i></li> <li>• <i>Zanthoxylum spp</i></li> </ul>
<p>Podofilotoxina</p> 	Tetralina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Podophyllum spp</i></li> </ul>
<p>Piroresinol</p> 	Furofurana	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sambucus williamsii</i></li> <li>• <i>Eucommia ulmoides</i></li> <li>• <i>Phyllanthus oxyphyllus</i></li> <li>• <i>Phyllanthus reticulares</i></li> <li>• <i>Linum usitatissimum</i></li> </ul>
<p>Secoisolariciresinol</p> 	Diarilbutana	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Linum usitatissimum</i></li> <li>• <i>Phyllanthus niruri</i></li> <li>• <i>Phyllanthus oxyphyllus</i></li> </ul>

Lignana	Classe	Fontes
<p data-bbox="406 309 630 342">Acido junaftóico</p> 	<p data-bbox="826 539 957 573">Naftalena</p>	<ul data-bbox="1038 539 1262 573" style="list-style-type: none"> <li>• <i>Juniperus sabina</i></li> </ul>
<p data-bbox="432 808 604 842">Justicidina A</p> 	<p data-bbox="826 1048 957 1081">Naftalena</p>	<ul data-bbox="994 958 1390 1182" style="list-style-type: none"> <li>• <i>Justicia</i> spp</li> <li>• <i>Garcinia subelliptica</i> Merr</li> <li>• <i>Phyllanthus myrtifolius</i></li> <li>• <i>Phyllanthus oligospermus</i></li> <li>• <i>Hplophyllum tuberculatum</i></li> <li>• <i>Phyllanthus acuminatus</i></li> </ul>
<p data-bbox="432 1330 604 1364">Justicidina B</p> 	<p data-bbox="826 1543 957 1576">Naftalena</p>	<ul data-bbox="994 1453 1390 1677" style="list-style-type: none"> <li>• <i>Justicia</i> spp</li> <li>• <i>Garcinia subelliptica</i> Merr</li> <li>• <i>Phyllanthus myrtifolius</i></li> <li>• <i>Phyllanthus oligospermus</i></li> <li>• <i>Hplophyllum tuberculatum</i></li> <li>• <i>Phyllanthus acuminatus</i></li> </ul>
<p data-bbox="432 1800 604 1834">Lariciresinol</p> 	<p data-bbox="818 1899 965 1933">Furofurana</p>	<ul data-bbox="1042 1868 1358 1980" style="list-style-type: none"> <li>• <i>Pteris vittata</i></li> <li>• <i>Sesamin indicum</i></li> <li>• <i>Linum usitatissimum</i></li> </ul>

Lignana	Classe	Fontes
<p style="text-align: center;"><b>Filantina</b></p> 	Diarilbutana	<i>Phyllanthus amarus</i> <i>Phyllanthus discoideus</i>
<p style="text-align: center;"><b>Nirantina</b></p> 	Diarilbutana	<i>Phyllanthus amarus</i>
<p style="text-align: center;"><b>5-demetoxi-nirantina</b></p> 	Diarilbutana	<i>Phyllanthus amarus</i> <i>Phyllanthus urinaria</i>
<p style="text-align: center;"><b>Hipofilantina</b></p> 	Tetralina	<i>Phyllanthus amarus</i>

Lignana	Classe	Fontes
<p><b>Filtetralina</b></p> 	Tetralina	<i>Phyllanthus amarus</i>
<p><b>Nirtetralina</b></p> 	Tetralina	<i>Phyllanthus amarus</i>
<p><b>5-demetoxi-nirtetralina</b></p> 	Tetralina	<i>Phyllanthus amarus</i>

As lignanas estão, na sua maioria, presentes na natureza sob a forma livre, sendo amplamente distribuídas no reino vegetal e encontradas em espécies que pertencem a mais de 70 famílias (UMEZAWA; DAVIN; LEWIS, 1991).

As plantas do gênero *Phyllanthus* são fontes bastante ricas em lignanas. Segundo Nahar et al. (2012), cerca de 50 lignanas diferentes pertencentes às classes diarilbutanas, diarilbutirolactona, tetralina e arilnaftalenas têm sido relatadas em pelo menos 11 espécies de *Phyllanthus*.

Para a *Phyllanthus niruri*, por exemplo, já foram identificadas as lignanas: secoisolintetralina, 2,3-demetoxiseco-isolintetralina, demetilenedioxinirantina, hinoquinina,

hidroxinirantina, nirfilina isolintetralina, linantina, lintetralina neonirtetralina, filnirurina, seco-4-hidroxilintetralina, secoisolariciresinol trimetil éter. Já a *Phyllanthus urinaria* tem as lignanas dextroboursehernina, heliobuftalmina lactona, urinalignana, urinatetralina e virgatusin. Nos extratos e frações de *Phyllanthus amarus* já foram identificadas sete lignanas: filantina, nirantina, 5-demetoxi-nirantina, hipofilantina, filtetralina, nirtetralina e 5-demetoxi-nirtetralina. (HANH; SINCHAIPANID; MITREVEJ, 2013; KASSUYA; SILVESTRE; REHDER, 2003; LEWIS; DAVIN, 1999; NAHAR; SARKER; DELAZAR, 2012; PATEL et al., 2011).

A classe das furofuranas, apesar de ser a mais abundante na natureza, apresenta poucos representantes no gênero *Phyllanthus*. Por exemplo, o pinoresinol (que é a lignana majoritária na linhaça e também presente no gergelim) é encontrado apenas nos extratos de *P. oxiphyllus* e *P. reticulares* (GERSTENMEYER et al., 2013; NAHAR; SARKER; DELAZAR, 2012).

## 2.3 *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn

### 2.3.1 Generalidades sobre a espécie

A família *Euphorbiaceae* possui cerca de 317 gêneros e 8000 espécies (WEBSTER, 1994). O maior e o mais diversificado gênero desta família é o *Phyllanthus*, que é dividido em diversos subgêneros e compreende cerca de 750 espécies, sendo encontrado largamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais do planeta (TORRES; CORDEIRO; GIULIETTI, 2003). O nome *Phyllanthus* vem do grego *Phyllon* (folha) e *anthos* (flor), em referência às flores produzidas em ramos que se assemelham à folhas compostas.

É frequente a confusão na identificação das espécies do gênero *Phyllanthus* por ele ser um muito complexo (CALIXTO et al., 1998). *P. amarus*, por exemplo, é constantemente confundida com *P. niruri*, mas as inflorescências bissexuais com duas flores e os estames completamente unidos identificam a espécie *P. amarus*.

*P. amarus* (Figura 3), conhecida popularmente no Brasil como quebra-pedra, arrebenta-pedra ou erva-pombinha, é um arbusto de cerca de 60 cm de altura, ereto, com caule cilíndrico, cinéreo-esverdeado a verde-avermelhado, disperso a densamente ramificado (DA SILVA; DE SALES, 2004). Em regiões tropicais a planta cresce espontaneamente em lugares úmidos, rochosos, de preferência ricos em calcáreo (UNANDER et al., 1993).



Figura 3. *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn.

### 2.3.2 Medicina popular, estudos farmacológicos e clínicos

O nome popular “quebra-pedra” se origina do uso do chá das folhas para tratar cálculo renal, mas diferentes partes da planta demonstram uma variedade de atividades terapêuticas. As folhas são também diuréticas, expectorantes e estimulantes da sudorese. As sementes são carminativas, laxativas, adstringentes para o intestino, tônicos para o fígado e diuréticas, além de serem usadas no tratamento de dor de ouvido, ascite (barriga d’água) e gripe. A raiz fresca tem sido usada no tratamento da icterícia (KHATOON et al., 2006).

A espécie *P. amarus* apresenta diversos compostos bioativos além das lignanas (citadas na Seção 2.2), tais como: alcaloides, flavonoides, taninos hidrolisáveis, triterpenos e esteróis (CALIXTO et al., 1998; PATEL et al., 2011; SPRENGER; CASS, 2013). Sousa et al. (2016) estudaram a extração de compostos bioativos de *P. amarus* por três métodos e encontraram em todos eles: ácido gálico, ácido carboxílico brevifolina, ácido múxico, ácido múxico lactona, três flavonoides (quercetina-3-O-hexosídeo, narirutina e niruriflavona), além de três alcaloides (niruroidina e dois isômeros) e três lignanas (virgatusina, filantina e nirantina).

O grande interesse farmacológico em relação à espécie se deve às suas diversas atividades biológicas. Londhe et al. (2009), em estudos sobre propriedades radioprotetoras de polifenóis (taninos e flavonoides) isolados de *P. amarus*, evidenciaram que, dentre os compostos testados, a elagitanina apresentou maior atividade.

O efeito antilítico (que evita a formação de cálculos) foi estudado para *P. niruri* (espécie que também é conhecida como quebra-pedra) e os resultados apontaram para uma ação preventiva na deposição de cristais de oxalato de cálcio (BARROS; SCHOR; BOIM, 2003; NISHIURA et al., 2004). Devido à semelhança entre as duas espécies, e como *P. amarus* é

usada na medicina popular para evitar a formação de cálculos, o efeito antilítico também deve ser uma de suas propriedades.

Os extratos aquosos e etanólicos de *P. amarus* foram também testados quanto à capacidade de inibição da replicação do HIV-1 *in vitro* e *in vivo*. Os resultados revelaram o poder antiviral dos extratos de *P. amarus*, que têm potencial para serem inseridos na quimioterapia das infecções por HIV (NOTKA; MEIER; WAGNER, 2003, 2004).

De acordo com Mazumder et al. (2006), o extrato metanólico de *P. amarus* possui atividade antibacteriana, especialmente contra microrganismos gram-negativos. Esse estudo sugere a utilização da planta em infecções disentéricas e diarreicas.

Leite et al. (2006) sugeriram em seu trabalho que os extratos de *P. amarus* reverterem a resistência a múltiplas drogas (Multi-Drugs Resistance - MDR). A MDR é um caso de resistência adquirida, observada em células tumorais, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos. Segundo os autores, os extratos de *P. amarus* são agentes de inversão da MDR, principalmente devido à sua capacidade de sinergia aos agentes quimioterapêuticos convencionais.

Kumaran e Karunakaran (2007) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos metanólicos de cinco espécies do gênero *Phyllanthus*, incluindo a *P. amarus*, por vários métodos. Em geral, os extratos mostraram forte atividade antioxidante quando comparados com os padrões BHT e ácido ascórbico e houve forte correlação entre a atividade testada e o teor de compostos fenólicos totais. Essa atividade também foi verificada por Maity (2013) pelos mesmos métodos, mas com extratos hidroetanólicos, o que reforça a indicação de utilização dos extratos de *P. amarus* na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo.

Adeneye (2012) investigou o mecanismo de atuação do extrato aquoso de folhas e sementes de *P. amarus* em hiperglicemia induzida e em dislipidemia (presença de níveis elevados ou anormais de lipídios e/ou lipoproteínas no sangue) como um modelo experimental de diabetes mellitus (DM) resistente à insulina. Os resultados deste estudo mostraram que os extratos de *P. amarus* controlam a resistência à insulina da DM, tendo potencial para serem utilizados na gestão local da DM. Resultado similar foi encontrado por Mahomoodally e Muthoor (2014), que observaram que os extratos de *P. amarus* exibem efeitos anti-hiperglicêmicos promissores (atividade inibidora significativa contra  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase *in vitro*). Além disso, nesse estudo se verificou que os extratos possuíam elevada atividade antioxidante, uma propriedade que é muitas vezes desejável em plantas com ação anti-diabética,

já que isso colabora para a redução das complicações tardias da diabetes induzida por estresse oxidativo.

Oliveira (2012) descobriu que os extratos e frações de *P. amarus* apresentam também atividade esquistossomicida sobre o *Schistosoma mansoni*, linhagem BH. Em seu trabalho observou que, apesar das lignanas filantina e nirantina separadamente não terem apresentado atividade esquistossomicida *in vitro*, foram testadas também *in vivo* e verificou-se que a associação filantina + nirantina (1:1 m/m) foi efetiva, assim como os extratos e frações. Essa atividade é importante de ser detectada, uma vez que a esquistossomose é uma enfermidade que acomete milhões de pessoas em todo o mundo e compõe o grupo de Doenças Negligenciadas. Esse termo se refere às doenças consideradas endêmicas em populações de baixa renda que apresentam indicadores elevados e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle. Além da esquistossomose, estão nesse grupo a malária, a doença de Chagas, a doença do sono (tripanossomíase humana africana), a leishmaniose visceral, a filariose linfática e a dengue.

Assim, nas últimas décadas tem sido descoberto que as lignanas são as responsáveis pela maior parte das atividades biológicas reportadas para a espécie, sendo filantina e nirantina duas das mais bioativas.

### 2.3.2.1 *Filantina*

Filantina (C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>) (Tabela 1) é o maior componente bioativo isolado dos extratos de *P. amarus*. É um sólido cristalino de massa molecular 418,5 g/mol, estável no estado sólido em solução, em um intervalo grande de pH (1,07 a 10,02) e com elevada temperatura de decomposição (200 °C) (HANH; SINCHAIPANID; MITREVEJ, 2013). Assim, pode ser obtida por diversas condições experimentais de extração sem que a instabilidade térmica seja um limitante.

Diversos estudos têm demonstrado que a filantina tem atividades farmacológicas interessantes. É reportado que ela e a hipofilantina reduzem a hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) e galactosamina em ratos (KHATOON et al., 2006; SYAMASUNDAR et al., 1985). Já o efeito hepatoprotetor em relação às injúrias induzidas por etanol foi investigado por Chirdchupunseree e Pramyothin (2010). Nesse estudo, verificou-se que a filantina restaurou a capacidade antioxidante de hepatócitos em ratos, sugerindo o efeito hepatoprotetor dessa lignana contra o estresse oxidativo induzido pelo etanol que causava danos

às células do fígado. Além disso, a atividade foi maior para a filantina do que para a hipofilantina.

Krithika et al. (2009) estudaram a atividade antioxidante (*in vitro* com radical DPPH) e hepatoprotetora (contra  $\text{CCl}_4$ ) da filantina e do extrato hidroalcoólico de *P. amarus*. Observou-se que a filantina atua eficazmente atenuando as alterações induzidas pelo  $\text{CCl}_4$ , apresentando propriedade hepatoprotetora em concentrações menores em comparação com o extrato de *P. amarus*. A atividade antioxidante foi maior para a filantina do que para o extrato.

De acordo com Hanh et al. (2013), a filantina reduziu significativamente o teor de ácido úrico no plasma em animais hiperuricêmicos para um nível normal. Também se verificou sinergismo notável com daunorrubicina em termos de atividade antileucêmica, e, portanto, é uma candidata potencial para o tratamento combinado com quimioterapias convencionais.

Inchoo et al. (2011), investigaram os efeitos de modulação da filantina e da hipofilantina sobre a tensão vascular, utilizando um modelo *in vitro* de aorta isolada de ratos. Ambas lignanas induziram o relaxamento da aorta via mecanismo independente do endotélio e suas ações farmacológicas estão envolvidas com o bloqueio da entrada de cálcio nas células do músculo liso vascular e a inibição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por fenilefrina a partir do retículo sarcoplasmático. Porém, concluíram que a filantina tem efeitos mais potentes em relação à hipofilantina, provavelmente devido à sua estrutura molecular menos planar.

Yuandani et al. (2013) avaliaram os efeitos inibidores dos extratos hidrometanólicos obtidos por maceração sobre a atividade fagocítica de neutrófilos humanos. Os extratos apresentaram elevada atividade inibidora, provavelmente devido às altas concentrações de filantina e hipofilantina, embora possa ter ocorrido efeito sinérgico com outros constituintes dos extratos. Além disso, a filantina exibiu efeitos inibitórios mais elevados em comparação com hipofilantina.

### 2.3.2.2 Nirantina

A nirantina ( $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$ ) (Figura 1) é um sólido cristalino de massa molecular de 432,5 g/mol, encontrada em algumas espécies do gênero *Phyllanthus* e exibe um amplo espectro de atividades farmacológicas.

Chowdhury et al. (2012) mostraram que a nirantina apresenta efeito anti-leishmaniose. O composto inibe a proliferação das formas amastigotas (intracelular do hospedeiro vertebrado) de *Leishmania* em cultura infectada com citotoxicidade limitada às

células hospedeiras e é eficaz contra parasitas de *Leishmania* com resistência ao antimônio (usado tradicionalmente na quimioterapia das leishmanioses).

Kassuya et al. (2003 e 2006) demonstraram que o extrato hexânico de *P. amarus* possui atividades anti-inflamatória e anti-alodínica e que essas atividades estão principalmente associadas à presença de certas lignanas, especialmente nirantina. No estudo, verificou-se que a nirantina causou uma inibição pronunciada da alodinia induzida por PAF (Platelet Activating Factor ou Fator Ativo de Plaquetas), que é um importante fosfolípídeo pró-inflamatório, envolvido na patogênese de pulmão, de fígado, doenças cardiovasculares e renais, entre outros.

A nirantina também já foi avaliada quanto à atividade contra o vírus da hepatite B. Os resultados confirmaram tal atividade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e ainda a nirantina se mostrou mais ativa do que outras lignanas como fletetralina e nirtetralina. Contudo, uma investigação mais aprofundada deve ser elaborada a fim de entender o mecanismo de ação dessas lignanas, sobretudo a nirantina, e assim desenvolvê-la como uma potencial alternativa para o tratamento ou como agente complementar anti-HBV (HUANG et al., 2003; LIU et al., 2014).

Sendo as lignanas as responsáveis por diversas atividades biológicas já reportadas para os extratos e frações de *P. amarus*, é de grande importância a sua obtenção da forma mais otimizada possível. Diversos métodos de extração podem ser potencialmente usados para a extração de lignanas, e eles serão apresentados na seção seguinte.

## 2.4 Extração de compostos bioativos

Para extrair compostos de matrizes vegetais podem ser usadas técnicas clássicas de extração, como maceração, percolação, Soxhlet e, também, técnicas mais recentes como micro-ondas, ultrassom e fluidos pressurizados. Entretanto, a escolha do método a ser utilizado é complicada e deve levar em consideração diversos fatores que estão intimamente correlacionados com o tipo de solvente, tempo requerido para o processo, quantidade de solvente que será gasto, características da matéria-prima, temperatura, pressão, custo energético, aspectos ambientais, entre outros. As propriedades físico-químicas do solvente, tais como densidade, difusividade, viscosidade e constante dielétrica, podem ser controladas pela variação da pressão e da temperatura do sistema de extração, modificando o poder de solubilização e a seletividade desse método (PRONYK; MAZZA, 2009).

Entre os solventes orgânicos mais utilizados em processos de extração estão: n-hexano, acetona, clorofórmio, acetato de etila, éter etílico, éter de petróleo, diclorometano,

metanol e etanol. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens que vão direcionar a sua aplicação. Algumas propriedades físico-químicas destes solventes estão apresentadas na Tabela 2 e as características de risco de acordo com a National Fire Protection Association (NFPA) estão na Tabela 3.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos principais solventes utilizados em métodos de extração.

Solvente	$\mu$ (cP)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	$I_p$	S (g/100mL)	$P_e$ (°C)	MM (g/mol)
N-Hexano	0,31	0,655	0,0	Insolúvel	68,9	86,18
Éter Etílico	0,33-0,37	0,710	2,2	6,9	68,3	74,12
Diclorometano	0,44	1,327	3,4	1,3	40,0	84,93
Clorofórmio	0,57	1,480	3,4-4,4	0,8	61,2	119,38
Acetato de Etila	0,46-0,47	0,897	4,3	8,3	77,1	88,10
Etanol	1,20	0,789	5,2	Infinita	78,3	46,06
Acetona	0,32	0,791	5,4	Infinita	56,3	58,08
Metanol	0,60	0,790	6,6	Infinita	64,7	32,04
Água	1,00	0,997	9,0	Infinita	100,0	18,01

$\mu$  é a viscosidade a 20 °C;  $\rho$  é a densidade a 20 °C;  $I_p$  é o índice de polaridade de Snyder; S é a Solubilidade em água a 20°C;  $P_e$  é o Ponto de Ebulição e MM é a Massa Molecular.

Tabela 3. Classificação de risco dos solventes de acordo com a National Fire Protection Association (NFPA).

Solvente	Riscos à saúde	Inflamabilidade	Reatividade
N-Hexano	1	3	0
Éter Etílico	2	4	0
Diclorometano	2	0	0
Clorofórmio	2	0	0
Acetato de Etila	1	4	0
Etanol	1	3	0
Acetona	1	3	0
Metanol	1	3	0
Água	0	0	0

O n-hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) é um hidrocarboneto alifático muito utilizado como solvente na extração de óleos e gorduras vegetais ou animais, com ponto de ebulição de 68,7 °C, imiscível em água, inflamável, nocivo para a saúde do manipulador e perigoso para o ambiente. No estado líquido é irritante para a pele e os olhos e, se ingerido, causa náuseas e vômito. Na forma de vapor é irritante para o nariz e a garganta e, se inalado, causa tosse e tontura.

A acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), também conhecida como propanona, é um solvente utilizado na extração de gorduras, óleos e pigmentos, como a clorofila. É miscível com água, inflamável e com ponto de ebulição de 56 °C. Se ingerida, causa irritação da mucosa. Em altas concentrações, os vapores inalados têm efeito narcótico e anestésico, e podem provocar dor de cabeça, vertigens, náuseas, sonolência, mal-estar e perda de consciência.

Clorofórmio ou triclorometano ( $\text{CHCl}_3$ ) é muito usado para extração de óleos voláteis e alcaloides. É um trialometano, sendo altamente poluente em águas, mesmo que em pequenas quantidades. Tem ponto de ebulição de  $61,2\text{ }^\circ\text{C}$ , baixa polaridade, é pouco solúvel em água, não inflamável e não oferece riscos altos ao meio ambiente. Entretanto, tem efeitos na saúde do manipulador, podendo ser absorvido pela pele e causar irritação, com vermelhidão, coceira e dor. Atua como um anestésico relativamente potente e a exposição a concentrações mais altas pode resultar em inconsciência e morte.

O acetato de etila ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) é um solvente polar, relativamente pouco volátil (ponto de ebulição de  $77\text{ }^\circ\text{C}$ ), produzido a partir da reação de ácido acético com etanol, em presença de ácido sulfúrico. É usado principalmente para a extração de flavonoides. O contato com os olhos pode causar forte irritação e a aspiração de vapores pode causar irritação do trato respiratório em altas concentrações causando dor de cabeça, náuseas, narcose, irritação pulmonar e efeitos tóxicos. Além disso, é altamente inflamável.

O éter etílico ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ), também conhecido como etoxietano, éter sulfúrico, ou simplesmente éter, tem ponto de ebulição baixo ( $34\text{ }^\circ\text{C}$ ) e é muito usado para a extração de lipídios. Contudo, se a amostra contém água, ele dissolverá também alguns mono e dissacarídeos. O éter etílico deve ser usado com cuidado, uma vez que é extremamente inflamável e tende a formar peróxidos quando armazenado.

O éter de petróleo é uma mistura de diversos hidrocarbonetos alifáticos (principalmente o pentano) derivados de petróleo, mas a sua composição pode variar conforme sua fabricação e procedência, podendo conter pequena porcentagem de hidrocarbonetos aromáticos. Por este motivo as suas propriedades físico-químicas são apresentadas em um intervalo, a ebulição do éter de petróleo, por exemplo, pode ocorrer entre  $35$  e  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Ele apresenta vantagens em relação ao éter etílico por extrair apenas a fração lipídica, ser mais barato e não ser afetado por pequenas quantidades de água na amostra. Entretanto, também é altamente inflamável e pode causar irritação nos olhos e na pele.

Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) é um composto clorado que apresenta a maioria das qualidades do éter etílico e com a vantagem adicional de não ser inflamável. Contudo, tem a tendência para formar emulsão e as preocupações sobre os seus efeitos na saúde humana levaram a uma procura por alternativas ao seu uso.

Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ou álcool metílico tem ponto de ebulição de  $64,5\text{ }^\circ\text{C}$ , é inflamável, miscível em água, irritante para pele e olhos. Se inalado, causa tontura, dor de cabeça, dificuldade respiratória ou perda de consciência. Se ingerido, é altamente venenoso. É

um solvente polar capaz de extrair diversos tipos de compostos, como antocianinas, terpenóides, saponinas, taninos, flavonas, polifenóis e lactonas.

Todos os solventes citados esbarram nos inconvenientes de serem tóxicos para o manipulador, para o ambiente ou indesejáveis no produto final. Sendo assim, para demonstrar a segurança de alguns solventes surgiu a denominação GRAS (Generally Recognized As Safe) que significa “geralmente reconhecido como seguro”, de acordo com a agência americana FDA (Food and Drug Administration). Essa designação indica que um produto químico ou substância adicionada ao alimento é considerado seguro por especialistas, sendo isento dos requisitos de tolerância de aditivos alimentares do conjunto de leis FFDCa (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act) dos Estados Unidos (FDA, 2016). Em termos práticos, se um solvente é tido como GRAS, ele passa por critérios rigorosos que atestam sua aplicação não só para a indústria de alimentos como para a de cosméticos e fármacos. Água, etanol e dióxido de carbono são exemplos de solventes GRAS.

Etanol ou álcool etílico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) é um solvente orgânico que pode ser obtido da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução de acetaldeído. Tem polaridade intermediária (Tabela 2), é miscível em água e apresenta ponto de ebulição elevado em comparação com outros solventes orgânicos. Solventes como etanol e água proporcionam a extração de uma gama de compostos polares e de polaridade intermediária, sendo comumente usados na obtenção de compostos fenólicos, mas a água é um solvente inorgânico denominado de "solvente universal" por ser capaz de dissolver muitas substâncias, o que aumenta o rendimento de extração. Por esse motivo, se o objetivo é a obtenção de determinados compostos que são extraídos por ambos solventes, o uso do etanol é preferível, por proporcionar uma extração mais seletiva.

As propriedades únicas da água estão relacionadas com a estrutura e força das ligações de hidrogênio. A força de uma ligação de hidrogênio é governada pela presença de outras ligações de hidrogênio agrupadas em torno dela. Assim, uma pequena alteração em uma das ligações de hidrogênio afeta as demais, e isso reflete na constante dielétrica e calor de vaporização. Em temperaturas baixas, as ligações de hidrogênio são mais fortes e a constante dielétrica é elevada. À medida que a temperatura da água é aumentada, as ligações de hidrogênio são enfraquecidas, a constante dielétrica é reduzida e isso leva a um aumento da solubilidade dos compostos orgânicos. Em temperaturas muito elevadas, a água líquida atua mais como solvente orgânico, de modo que a solubilidade das substâncias orgânicas é drasticamente aumentada (CARR; MAMMUCARI; FOSTER, 2011).

### 2.4.1 Técnicas convencionais de extração

A maceração é uma técnica de extração realizada à temperatura ambiente e pressão atmosférica, por um tempo que varia de horas a dias. Ela pode ser estática (quando o contato do solvente com a matriz vegetal é feito em repouso e o fenômeno que governa o mecanismo de transferência de massa é a difusão) ou dinâmica (quando o leito é agitado para aumentar a transferência de massa por difusão e pelo movimento global do sistema solvente + material vegetal). Neste método, não ocorre o esgotamento da matéria prima vegetal, uma vez que pode ocorrer saturação do solvente ou estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o solvente e o material vegetal. Geralmente é utilizada quando se tem interesse em compostos termosensíveis e solúveis à temperatura ambiente, em um solvente não volátil. Para a extração em pequena escala, a maceração geralmente consiste nas seguintes etapas: i. moagem do material vegetal para aumentar a área de superfície que entrará em contato com o solvente; ii. Escolha do solvente que será adicionado na proporção de interesse em relação à quantidade de material vegetal utilizado; iii. O processo de extração ocorre por um intervalo de tempo estabelecido. iv. O extrato líquido é retirado e o bagaço (material vegetal restante) é pressionado para recuperar o restante do extrato. Também pode ser feita uma centrifugação desse bagaço (AZMIR et al., 2013).

A extração em aparelho de Soxhlet é um processo semi-contínuo de extração sólido-líquido no qual o material vegetal entra em contato com o solvente, que é renovado a cada ciclo de evaporação. É necessário utilizar solventes que sejam voláteis, para que a temperatura de extração não seja alta, proporcionando ciclos mais curtos. A extração ocorre da seguinte forma: uma pequena quantidade de amostra seca envelopada em um cartucho feito com papel filtro é colocada no extrator, acoplado em um balão de destilação contendo o solvente de interesse. O sistema é aquecido e o solvente evapora, passando do balão para um condensador e o condensado para o extrator. O contato entre o solvente e o cartucho de amostra permite que os compostos sejam extraídos. Após atingir um nível de transbordamento no extrator, o extrato é descarregado pelo sifão de volta para o balão de destilação. O extrato permanece no balão enquanto o solvente é continuamente evaporado e é renovado a cada ciclo para o extrator (AZMIR et al., 2013). Dessa forma, nesse método, o solvente não é saturado permanentemente possibilitando uma extração mais eficiente do que a maceração, empregando uma quantidade reduzida de solvente devido aos ciclos. É tradicionalmente usado para obtenção de óleos vegetais utilizando n-hexano, éter etílico e éter de petróleo. No geral produz

altos rendimentos e, por esse motivo, a maior desvantagem está relacionada à baixa seletividade do processo. Entretanto, a temperatura e o tempo também são fatores limitantes.

A técnica de hidrodestilação ou extração por arraste de vapor é utilizada para extração de óleos voláteis. Não são usados solventes orgânicos e pode ser realizada sem que o material vegetal seja seco. Nesse processo a matéria-prima é colocada em um balão de fundo redondo contendo água destilada. O balão é aquecido em uma manta térmica até a ebulição da água. O vapor da água arrasta os compostos voláteis e essa mistura volta para o estado líquido após passar pelo condensador. Alternativamente, vapor pode ser injetado diretamente na amostra para fazer a extração. O inconveniente dessa técnica é a limitação de aplicação devido ao solvente e a temperatura. Se a temperatura for muito elevada, alguns componentes voláteis podem ser perdidos e também formar hidrolatos (AZMIR et al., 2013; SILVA et al., 2005; VANKAR, 2004).

#### **2.4.2 Técnicas Não-Convencionais de Extração**

Entre as técnicas não-convencionais de extração, as mais utilizadas atualmente são: a extração assistida por ultrassom, a extração assistida por micro-ondas e a extração com fluidos pressurizados.

A extração por ultrassom consiste em utilizar ondas de alta frequência (acima de 20 kHz), que promovem maior eficiência de extração. As ondas ultrassônicas produzem ciclos de compressão e descompressão, onde poder haver formação de bolhas. Estas bolhas crescem conforme as ondas ultrassônicas passam pelo fluido, até atingirem um tamanho crítico, quando ocorre o colapso, num processo conhecido como cavitação. Quando a cavitação ocorre perto da superfície sólida do material vegetal, o colapso gera um jato de alta velocidade de líquido que pode causar a fragmentação das estruturas das membranas celulares do material vegetal, liberando com mais facilidade os compostos extraíveis. O ultrassom pode ser usado na forma de banho ou sonda, embora a última seja mais eficiente no que diz respeito ao aproveitamento das ondas para o efeito desejado. Essa técnica também tem sido incorporada a várias técnicas clássicas para aumentar a eficiência de extração. Mais recentemente, esta técnica tem sido associada a técnicas não convencionais como as que utilizam fluidos pressurizados (AZMIR et al., 2013; BARRALES; REZENDE; MARTÍNEZ, 2015; LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003; PASQUEL REÁTEGUI et al., 2014; PÉRES et al., 2006; SOUSA et al., 2016).

A extração assistida por micro-ondas (que utiliza ondas eletromagnéticas na faixa de frequência de 300 MHz a 300 GHz) tem chamado atenção devido ao seu mecanismo de aquecimento especial, custo de capital moderado e seu bom desempenho sob condições atmosféricas. Como a matriz vegetal contém uma quantidade significativa de água que absorve fortemente a energia das micro-ondas, o superaquecimento interno provoca o rompimento celular, facilitando o processo de extração. Além disso, a migração de íons dissolvidos, aumenta a penetração do solvente no interior da matriz e, posteriormente, aumenta o rendimento de extração. Entre as principais vantagens em comparação com as técnicas de extração convencionais estão: consumo reduzido de solvente, menor tempo de extração, menor gradiente térmico no extrator e manipulação mínima da amostra para o processo de extração (AZMIR et al., 2013; GAROFULIĆ et al., 2013; VIGANÓ; MACHADO; MARTÍNEZ, 2015). Além disso, ela também tem sido utilizada associada as técnicas convencionais e não-convencionais de extração visando a obtenção dos compostos de interesse de forma mais otimizada.

Já a técnica de extração com fluidos pressurizados se divide em Extração com Líquidos Pressurizados (Pressurized Liquid Extraction – PLE) e Extração com Fluidos Supercríticos (Supercritical Fluid Extraction – SFE), que serão descritas nas próximas seções. Uma pesquisa rápida com as palavras-chave “pressurized liquid extraction” e “supercritical fluid extraction”, contidas no título ou no abstract, no portal Science Direct ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)) retorna mais de 700 trabalhos publicados nos últimos 5 anos e esse número será ainda maior se levarmos em consideração outras expressões que podem ser usadas para se referir as técnicas. Isso demonstra o interesse da comunidade científica pelos fluidos pressurizados como solventes de extração.

Diversos estudos envolvendo PLE e SFE têm sido realizados nos últimos cinco anos no Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos (LAPEA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da UNICAMP, e tem sido demonstrado que estas técnicas podem ser aplicadas para a extração de diversos compostos a partir de várias matérias-primas diferentes. Além de trabalhos publicados sobre experimentos de extração (Tabela 4), há duas revisões sobre tecnologia supercrítica (MARTÍNEZ; AGUIAR, 2014; VIGANÓ; MACHADO; MARTÍNEZ, 2015); um trabalho com foco na modelagem matemática da transferência de massa no processo de SFE (SILVA; MARTÍNEZ, 2014) e estudos sobre a aplicação da tecnologia supercrítica em reações químicas (DOS SANTOS; REZENDE; MARTÍNEZ, 2016), formação de partículas e encapsulação (AGUIAR et al., 2016).

Tabela 4. Trabalhos experimentais de extração envolvendo PLE e SFE desenvolvidos pela equipe do LAPEA nos últimos cinco anos.

Método	Compostos-Alvo	Matéria-prima	Solvente	Referência
- SFE	Capsaicinoides	Pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	- CO <sub>2</sub>	(DE AGUIAR et al., 2013)
- SFE - PLE	Antocianinas	Mirtilo ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	- Etanol/Água - CO <sub>2</sub> - CO <sub>2</sub> +Etanol - CO <sub>2</sub> +Água - CO <sub>2</sub> +Etanol+Água	(PAES et al., 2014)
- SFE	Carotenóides	Polpa de pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> )	- CO <sub>2</sub>	(ESPINOSA-PARDO; MARTINEZ; MARTINEZ-CORREA, 2014)
- SFE - US -SFE + US	Antocianinas	Amora preta ( <i>Rubus fruticosus</i> L.)	- CO <sub>2</sub> - CO <sub>2</sub> +Etanol - CO <sub>2</sub> +Água - CO <sub>2</sub> +Etanol+Água	(PASQUEL-REÁTEGUI et al., 2014)
- SFE	Capsaicinóides	Pimenta biquinho ( <i>Capsicum chinense</i> )	- CO <sub>2</sub>	(DE AGUIAR et al., 2014)
- SFE - US -SFE + US	Ácidos Graxos Tocoferol Tocotrienol	Sementes de maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> sp)	- CO <sub>2</sub>	(BARRALES; REZENDE; MARTÍNEZ, 2015)
- PLE	Antocianinas	Amora-preta ( <i>Rubus fruticosus</i> L.)	- Etanol - Água	(MACHADO et al., 2015b)
- SFE - US -SFE + US	Capsaicinóides	Pimenta malagueta ( <i>Capsicum frutescens</i> )	- CO <sub>2</sub>	(SANTOS et al., 2014)
- SFE - PLE	-Piceatannol -Scirpusin B	Bagaço de maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> sp)	- CO <sub>2</sub>	(VIGANÓ et al., 2016b)
- SFE - US -SFE + US	Capsaicinóides	Pimenta dedo-de-moça ( <i>Capsicum baccatum</i> L.)	- CO <sub>2</sub>	(DIAS et al., 2016)
- SFE	Tocóis Ácidos Graxos Carotenóides	Bagaço de maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> sp)	- CO <sub>2</sub>	(VIGANÓ et al., 2016a)
- PLE - EUT	Lignananas	Quebra-pedra ( <i>Phyllanthus amarus</i> )	- Etanol - Água	(PEREIRA et al., 2016)
- SFE - US -SFE + US	Ácidos graxos	Cumbaru ( <i>Dipteryx alata</i> Vogel)	- CO <sub>2</sub>	(DOS SANTOS et al., 2016)
- PLE - SFE	Antocianinas	Resíduo de juçara ( <i>Euterpe edulis</i> Mart.)	- Etanol - Água - CO <sub>2</sub> + Etanol + Água	(DEL PILAR GARCIA-MENDOZA et al., 2017)

EUT – Extração com UltraTurrax; US - Ultrassom

### 2.4.2.1 Extração com líquidos pressurizados - PLE

A Extração com Líquidos Pressurizados (PLE – *Pressurized Liquid Extraction*) é também conhecida como “Extração com Solvente Pressurizado” e “Extração Acelerada com Solvente”. Quando a água é usada como solvente, a técnica pode ser chamada de “Extração com água quente pressurizada”, “Extração com Água Sub-crítica” ou “Extração com Água Superaquecida”, dependendo da temperatura de trabalho.

Na PLE, os solventes são submetidos a alta pressão (normalmente entre 10 e 20 MPa) a fim de extrair determinados compostos de matrizes sólidas ou semi-sólidas com tempo e quantidade de solvente reduzidos em relação aos métodos convencionais (SHEN; SHAO, 2005). A alta pressão possibilita que os solventes permaneçam no estado líquido em temperaturas em que eles já teriam evaporado em condições atmosféricas, ou seja, acima do ponto de ebulição. Isso é importante para os processos de extração, porque à medida em que a temperatura aumenta, a solubilidade também aumenta enquanto a viscosidade e a tensão superficial do solvente ficam menores, o que facilita a dessorção dos compostos da matriz vegetal e melhora a transferência de massa entre matriz e solvente.

O procedimento da PLE consiste em:

- i. Colocar a amostra no extrator, formando o leito de extração;
- ii. Aquecer o extrator até a temperatura de trabalho;
- iii. Pressurizar, aquecer e bombear o solvente;
- iv. Iniciar a extração, controlando a vazão do solvente;
- v. Coletar continuamente o extrato líquido em um frasco até o fim do período de extração.

Evidentemente, os extratos obtidos por PLE são líquidos devido ao uso do solvente líquido, que pode ser separado do extrato por evaporador rotativo, secagem em estufa ou liofilização, assim como nas técnicas convencionais. O extrato pode ser também concentrado por técnicas de separação por membranas ou fracionamento por adsorção.

A princípio, qualquer solvente orgânico poderia ser utilizado nessa técnica. Contudo, baseando-se nas características descritas para a água e o etanol (ambos GRAS) na Seção 2.4, estes solventes têm sido os mais empregados para processos cujo objetivo final são as indústrias de alimentos e de produtos medicinais, e são adequados para a extração de compostos de polaridade mediana a alta, como os compostos fenólicos.

Além disso, conforme descrito no trabalho de revisão de Mustafa e Turner (2011), usar uma mistura de solventes pode ser importante para melhorar a eficiência da extração. Por exemplo, em uma mistura binária, um solvente pode melhorar a solubilidade da substância a extrair, enquanto o outro solvente iria aumentar a sua dessorção. Neste sentido, a água pode auxiliar na quebra da interação matriz-soluto e o etanol diminuir a polaridade da mistura, fazendo com que compostos um pouco menos polares possam ser extraídos em comparação com a água pura.

Outra característica da PLE é que ela utiliza ambiente livre de oxigênio e luz, o que tem promovido sua ampla utilização na extração de compostos nutracêuticos, tal como ocorre no método de SFE.

#### **2.4.2.2 Extração com fluido supercrítico – SFE**

A SFE utiliza uma substância ou mistura de substâncias com temperatura e pressão maiores que seus valores críticos,  $T_c$  e  $P_c$ , respectivamente (Figura 4). A temperatura crítica ( $T_c$ ) é definida como a mais alta temperatura na qual um gás pode ser convertido em líquido, devido a um aumento de pressão. A pressão crítica ( $P_c$ ) consiste na mais alta pressão na qual um líquido pode ser convertido em um gás, devido a um aumento de temperatura. Em suma, se um fluido estiver acima do ponto crítico, deixa de haver tensão superficial e separação entre as fases líquida e gasosa em equilíbrio, formando-se uma única fase supercrítica, cujas propriedades são intermediárias daqueles dois estados. Caso esteja abaixo do ponto crítico, o fluido pode existir como um líquido ou como um vapor (BRUNNER, 1994). Se está abaixo do ponto crítico e permanece no estado líquido mesmo acima da temperatura de ebulição do mesmo líquido na pressão atmosférica, o solvente se encontra na região subcrítica.

Em comparação com as demais técnicas de separação, a SFE apresenta vantagens consideráveis, tais como: a possibilidade de monitoramento contínuo do poder do solvente/seletividade, através do ajuste das variáveis do processo, a exemplo da temperatura e pressão, o que leva a alterações nas propriedades físico-químicas do solvente utilizado, como densidade, difusividade e viscosidade e a não-necessidade de solventes orgânicos poluentes. (ABBAS et al., 2008; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

O processo de SFE envolve as seguintes etapas:

- vi. A amostra é adicionada ao extrator, formando o leito de extração;
- vii. O extrator é aquecido até a temperatura de trabalho;

- viii. O solvente é aquecido e pressurizado até o estado supercrítico e bombeado até o extrator;
- ix. Ocorre a extração estática (apenas pelo contato do fluido com o leito de extração);
- x. O fluxo é liberado e começa a extração dinâmica, pelo tempo e vazão de solvente estabelecidos previamente;
- xi. Após sair do extrator, a mistura extrato+solvente é separada pela descompressão que ocorre no separador ou válvula micrométrica.
- xii. O extrato é continuamente coletado em um frasco enquanto que o solvente é descartado ou armazenado para ser reutilizado.

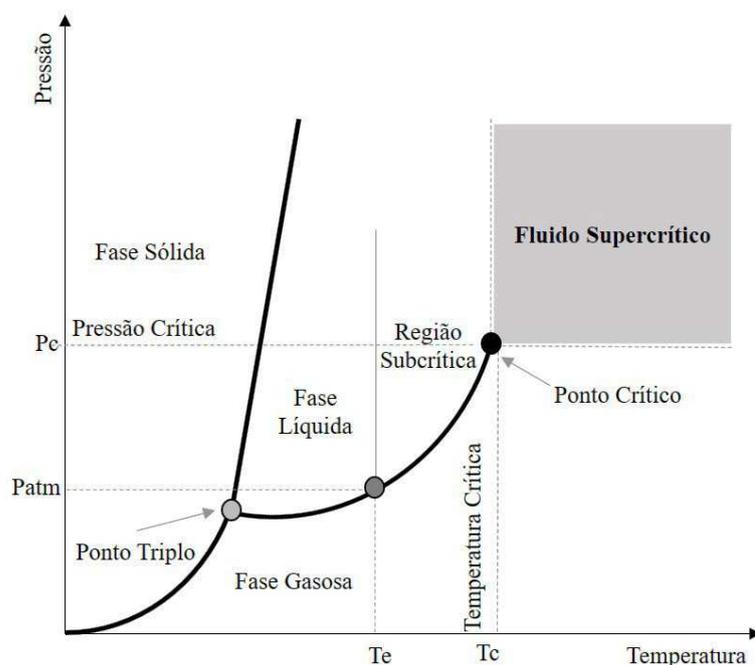


Figura 4. Diagrama de fases genérico pressão-temperatura de uma substância pura.  $T_c$  é a temperatura crítica;  $P_c$  é a pressão crítica;  $T_e$  é a temperatura de ebulição da substância na pressão atmosférica ( $P_{atm}$ ).

Existe uma variedade de solventes que podem ser utilizados na SFE. As propriedades críticas de diversos solventes estão apresentadas na Tabela 5. Contudo, na prática, o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é o mais usado para o processamento de produtos naturais com aplicação na indústria alimentícia, nutracêutica, farmacêutica e cosmética. Isso ocorre pelo  $\text{CO}_2$  possuir propriedades críticas relativamente baixas em relação a outros possíveis solventes, como a temperatura de  $31,4^\circ\text{C}$  e uma pressão de  $7,38\text{ MPa}$ , além de ser atóxico em comparação com solventes orgânicos, não inflamável, encontrado em estado puro e a baixo custo

(REVERCHON; DE MARCO, 2006). Além disso, o CO<sub>2</sub> é separado do extrato na etapa de depressurização do sistema, o que elimina a necessidade de evaporação do solvente.

Tabela 5. Propriedades críticas de alguns solventes

Solvente	Temperatura Crítica (°C)	Pressão Crítica (MPa)	Densidade Crítica (g.cm <sup>-3</sup> )
Dióxido de Carbono	31,4	7,38	0,469
Água	374,3	22,12	0,348
Etanol	240,9	6,14	0,276
Metanol	239,6	8,09	0,272
Amônia	132,4	112,50	0,235
Etano	32,3	4,87	0,203
Pentano	96,6	3,33	0,232

Outras substâncias que também apresentam pontos críticos relativamente baixos não são comumente usadas porque são inflamáveis (etano, pentano) ou corrosivas e tóxicas (amônia). Como o CO<sub>2</sub> supercrítico é geralmente eficaz para a purificação e fracionamento de compostos hidrofóbicos (LEE et al., 2007), a maior desvantagem da sua utilização é que ele não favorece a extração de compostos com alta polaridade, sendo necessário o uso de cossolventes (ARAÚJO; MEIRELES, 2000; CAVALCANTI, 2013).

Os cossolventes agem quebrando ou enfraquecendo as interações entre soluto-matriz sólida através de interações moleculares como forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, facilitando o transporte do soluto dos poros (CAVALCANTI, 2013). Assim como na PLE, qualquer solvente orgânico poderia ser utilizado, destacando-se o etanol, principalmente por ser GRAS. Há também diversos trabalhos utilizando água e misturas hidroetanólicas como cossolventes.

Entretanto, quando um cossolvente é adicionado ao CO<sub>2</sub>, a temperatura crítica da mistura resultante é elevada, limitando a quantidade de cossolvente que pode ser utilizada caso se queira trabalhar na região supercrítica a 40-60 °C. Por exemplo, a adição de 5% de etanol em CO<sub>2</sub> aumenta a temperatura crítica da mistura para 42,5 °C (ADIL et al., 2007).

#### 2.4.2.3 Viabilidade econômica dos processos SFE e PLE

Apesar de PLE e SFE terem diversas vantagens do ponto de vista técnico, para viabilizar a implantação de uma unidade industrial de SFE ou PLE não basta demonstrar a viabilidade técnica do processo; sua viabilidade econômica é tão importante quanto, ainda mais quando se considera que existem outras tecnologias concorrentes que apresentam custo de investimento inferior (PRADO et al., 2010). Dessa forma, uma análise mais profunda de todos

os fatores que contribuem para o custo total do processo deve ser realizada quando se quer apresentar tecnologias não-convencionais como alternativa para os processos de extração.

Para estimar os custos dos processos é necessário se fazer uma simulação, gerando cenários, vendo os impactos de cada um deles nos processos e analisando os resultados para uma tomada de decisão mais assertiva. A simulação facilita a avaliação, o desenvolvimento e o aumento de escala de um processo.

O software SuperPro Designer® é considerado um dos simuladores mais completos e é muito utilizado em processos tecnológicos e de produtos bioquímicos. Ele permite a criação de projetos diferenciados, dimensionando equipamentos e estimando o custo preliminar do processo através da integração com ferramentas de outros processos de engenharia e de modelagem de custo. Além disso, é possível avaliar o capital de investimento no início do projeto (VEGGI, 2013).

A metodologia de Turton (TURTON; BAILIE; WHITING, 2009) tem sido muito utilizada para se calcular o Custo de Manufatura (COM) através do SuperPro Designer (CARVALHO et al., 2015; OSORIO-TOBÓN et al., 2014; PRADO et al., 2010; ROSA; MEIRELES, 2005; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012b; ZABOT et al., 2015). Entre os fatores envolvidos na estimativa de custos de processos de extração estão: i. aqueles relacionados com a matéria-prima (custo da matéria-prima a ser extraída, necessidade de pré-processamento – secagem e moagem, transporte e armazenamento), ii. os que envolvem as condições operacionais (geometria do leito, capacidade da bomba, tipo de solvente a ser utilizado, temperatura, pressão, vazão de solvente, parâmetros cinéticos e dados termodinâmicos) e os requerimentos industriais (custo de mão de obra, horas de trabalho por dia, dias de trabalho por ano, capacidade da planta, custo da água de refrigeração, custo da geração de vapor, custos relacionados com a refrigeração e energia elétrica, entre outros). De acordo com a metodologia de Turton, o custo pode ser estimado em termos da soma de cinco custos principais: custo da matéria-prima (CRM: *cost of raw material*), custo de mão-de-obra operacional (COL: *cost of operational labor*), custo de utilidades (CUT: *cost of utilities*), custo de tratamento de resíduos (CWT: *cost waste treatment*) e custo fixo de investimento (FCI: *fixed of cost investment*).

O elevado custo de investimento inicial (FCI) era comumente apontado como principal desvantagem dos processos de PLE e SFE. Entretanto, o custo de aquisição da matéria-prima é visto atualmente como fator de maior impacto, sobretudo quando se trabalha

com plantas medicinais, podendo chegar até 80% do Custo de Manufatura (COM), segundo Albuquerque e Meireles (2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades que contemplam este trabalho são: preparo da matéria-prima, realização dos métodos de extração, identificação e quantificação dos compostos de interesse, avaliação dos resultados e definição das melhores condições dos processos, análise de custos das melhores condições, conforme ilustrado no diagrama da Figura 5.

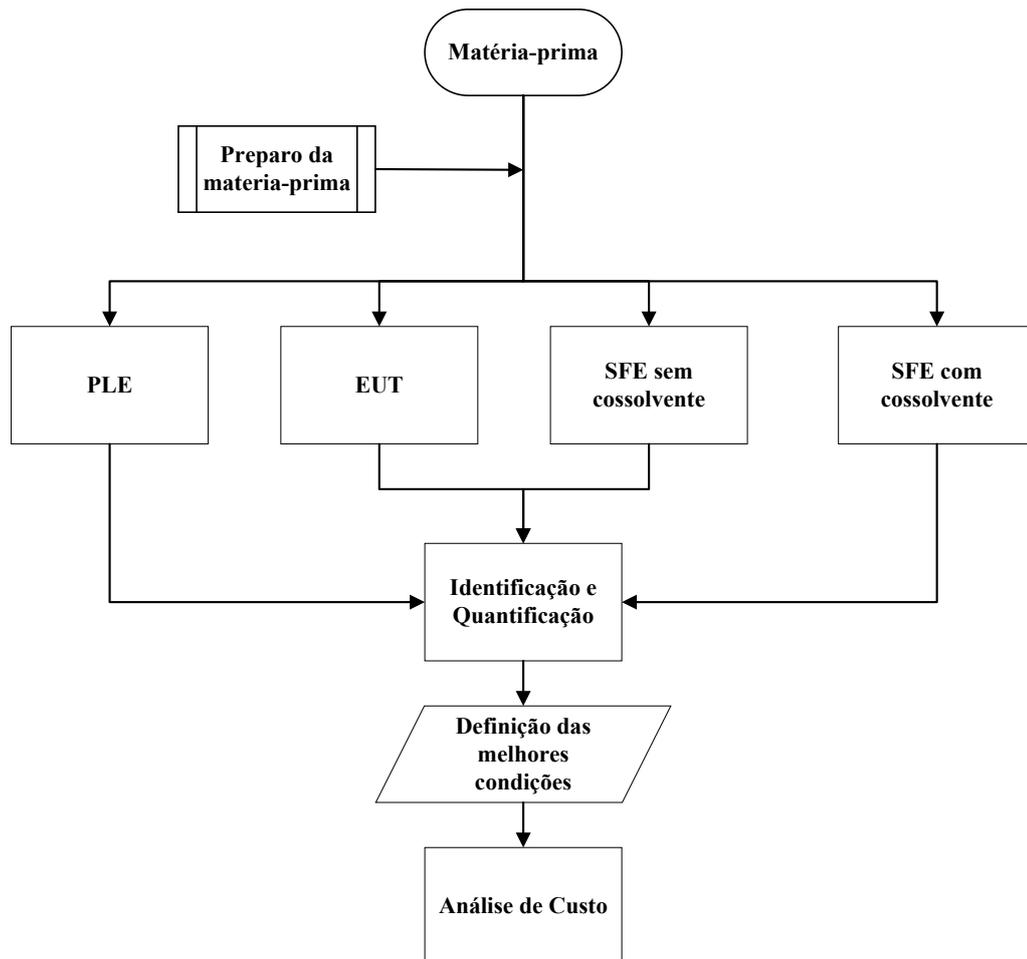


Figura 5. Diagrama das atividades do projeto. Onde: PLE é a extração por líquidos pressurizados; EUT é a extração utilizando Ultra-Turrax; SFE é a extração utilizando fluidos supercríticos.

#### 3.1 Reagentes e equipamentos

Os reagentes, soluções, utensílios e equipamentos usados durante a execução das atividades deste projeto estão apresentados no APÊNDICE A.

#### 3.2 Material vegetal

*Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn foi identificada pelo Prof. Dr. Grady L. Webster (University of Califórnia Davis, USA). Sua exsicata está depositada no Herbário do

Departamento de Botânica do Instituto de Biologia (IB/UNICAMP) sob número UEC 127.411. Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizadas as partes aéreas de *P. amarus* obtidas de cultivo realizado no Campo Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), utilizando sempre as sementes provenientes de um mesmo acesso de *P. amarus*, denominado – Pa14/05.

### 3.2.1 Pré-tratamento do material vegetal

As partes aéreas de *P. amarus* foram secas (45 °C/72 h em estufa com circulação de ar). Em seguida, foram moídas em moinho de facas, com peneira de malha de 10 mesh (Marconi, model MA340, Piracicaba, São Paulo) e armazenadas em sacos de polietileno de baixa densidade até o momento das extrações.

### 3.2.2 Caracterização do leito de partículas

A caracterização do leito de partículas consistiu na determinação do diâmetro médio de partícula, da massa específica aparente, massa específica real e da porosidade do leito. Estas informações são importantes para a realização de ajuste de modelos de cinética de extração. O diâmetro médio das partículas foi determinado através do modelo proposto por Levenspiel & López (1996).

$$d_{mp} = \frac{1}{\sum_i^n \left( \frac{x_i}{d_{pi}} \right)} \quad \text{Equação 1}$$

onde:  $d_{mp}$  é diâmetro médio das partículas (mm);  $d_{pi}$  é a abertura da  $i$ -ésima peneira (mm);  $x_i$  é a fração mássica das partículas retidas na  $i$ -ésima peneira;  $n$  é o número total de frações.

A massa específica aparente do leito de partículas foi obtida pela relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações pelo volume do leito, incluindo assim apenas os poros do leito e não os poros do interior das partículas. Para a determinação da massa específica real foi utilizado o método de picnometria com gás hélio com picnômetro automático (Quantachrome Ultrapyc 1200e, Boynton Beach, USA). A porosidade do leito de extração foi determinada através da massa específica real e aparente das amostras, incluindo os poros do leito e do interior das partículas. Todas as análises realizadas nesta seção foram conduzidas em triplicata.

### 3.3 Processos de extração

Os experimentos de extração foram realizados no Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos – LAPEA, em uma unidade de extração construída no próprio laboratório (Figura 6), e os resultados obtidos foram quantificados através do cálculo dos rendimentos de extração obtidos pelas Equações 2, 3 e 4:

$$x_0 = \left( \frac{m_{extrato}}{m_{amostra}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$x_{la} = \frac{m_{lignana}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3}$$

$$x_{le} = \frac{m_{lignana}}{m_{extrato}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:  $x_0$  é o rendimento global (%);  $x_{la}$  e  $x_{le}$  são os rendimentos de lignanas em termos de amostra (planta seca e moída) ( $\text{mg}_{lignana} / \text{g}_{amostra}$ ) e de extrato ( $\text{mg}_{lignana} / \text{g}_{extrato}$ ), respectivamente;  $m_{extrato}$  é a massa do extrato total obtido (g);  $m_{amostra}$  é a massa do material vegetal usado na extração (g);  $m_{lignana}$  é a massa de cada lignana obtida (mg).



Figura 6. Unidade de extração construída no LAPEA.

A unidade de extração, esquematizada na Figura 7, pode ser usada para SFE (com ou sem co-solvente) ou PLE. Esta unidade é composta por tubulações e conexões de aço

inoxidável (1/16" e 1/8"); um cilindro de CO<sub>2</sub> (para os experimentos de SFE); um reservatório de solvente (R) (para SFE com cossolvente e PLE); um compressor (C) (Schulz, MSV 6/30, Joinville-SC, Brasil); um banho ultratermostatizado (BU) (Marconi, MA184/BX, Piracicaba-SP, Brasil), uma bomba de CO<sub>2</sub> (BC) (Maximator, M111-CO, Nordhousen, Alemanha), uma bomba HPLC (Jasco, PU-2080 Plus, Tokio, Japão) (BH); dois banhos de aquecimento (BA-1 and BA-2) (Marconi, MA 126/B0, Piracicaba-SP, Brasil), 13 válvulas de bloqueio (V-1 to V-9); manômetros (I-1, I-2 and I-3); indicadores de temperatura (I-4); três células de extração (EC-1: 10 mL, EC-2: 50 mL e EC-3: 100 mL) aquecidas com camisa de água quente; uma célula de extração (CE-4: 100 mL) aquecida com camisa elétrica; uma válvula micrométrica (M V); um fluxômetro, um rotâmetro e um frasco de coleta.

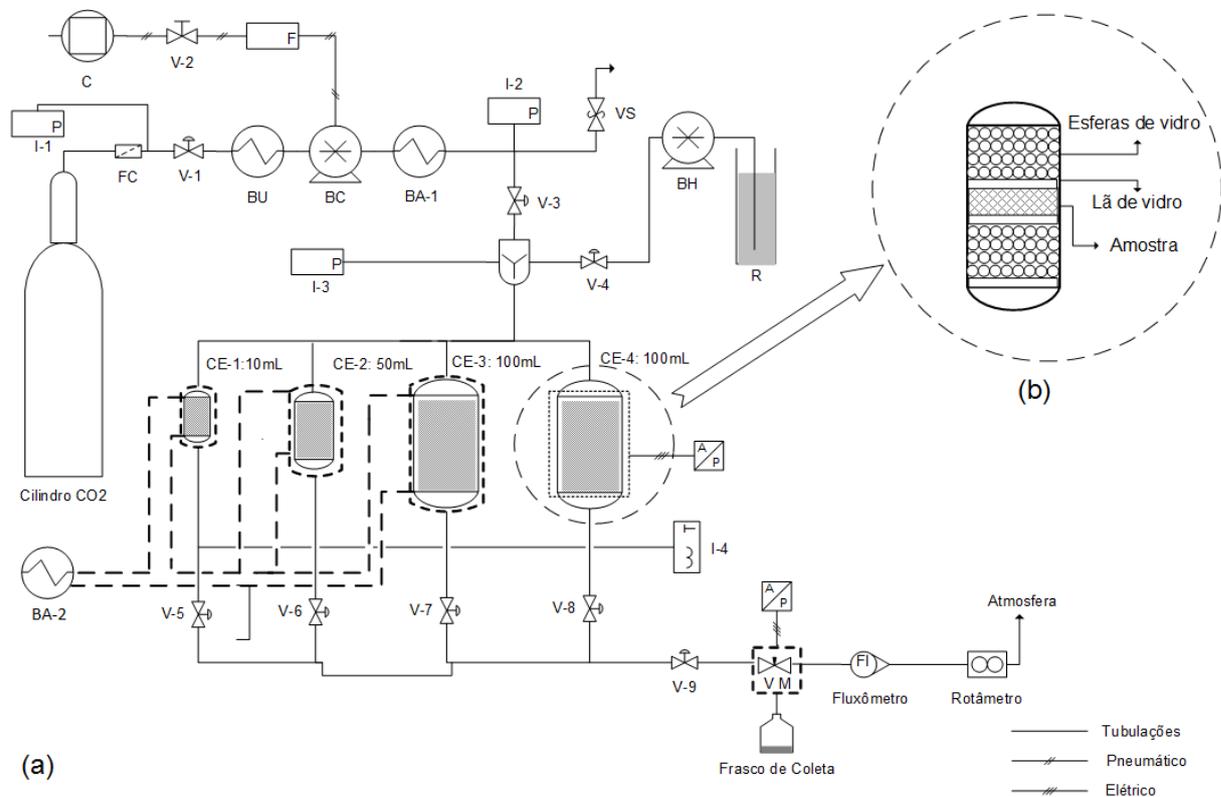


Figura 7. (a) Esquema da unidade de extração. (b) Esquema detalhado da célula de extração usada nos experimentos.

As extrações a baixa pressão foram realizadas utilizando um dispersor Ultra-Turrax (IKA, T18 Basic, Staufen im Breisgau, Germany), representado na Figura 8.

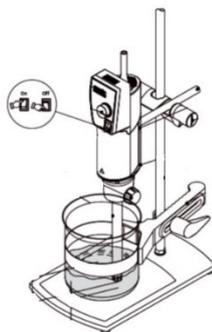


Figura 8. Ilustração do dispersor ultraturrax T18 usado para os experimentos de extração (FONTE: IKA (2016))

Nas seções seguintes, os métodos de extração serão apresentados na ordem em que foram realizados: PLE, EUT, SFE sem cossolvente (SFE1) e por fim, SFE com cossolvente (SFE2). Isso implica na ordem em que os extratos foram analisados por cromatografia.

### 3.3.1 Extração com Líquidos Pressurizados – PLE

Experimentos preliminares foram realizados para o processo de PLE com o intuito de determinar as condições de trabalho que seriam utilizadas posteriormente no planejamento experimental de extração, tais como: vazão de solvente, tempo estático, tempo de extração e, conseqüentemente, a razão entre massa de solvente e de amostra (S/F). Todos os testes foram realizados na temperatura de 35 °C e na pressão de 10 MPa, com aproximadamente 3 g de amostra.

Foram realizadas extrações utilizando etanol como solvente testando três vazões diferentes: 1,5; 3,0 e 6,0 mL.min<sup>-1</sup>. A vazão de trabalho foi escolhida com base no menor tempo para atingir um mesmo  $x_0$  e na facilidade em controlar os parâmetros do processo no equipamento. Fixando a vazão e o tempo, definiu-se a razão S/F, que foi mantida para os outros solventes.

Os experimentos de PLE foram realizados de acordo com o esquema fatorial com 12 condições experimentais diferentes e suas duplicatas, totalizando 24 ensaios. As variáveis independentes foram a temperatura (T - °C) e a concentração de etanol (%EtOH v/v) em solução aquosa (Tabela 6). As variáveis resposta avaliadas foram  $x_0$ ,  $x_{1a}$  e  $x_{1e}$ . Os resultados obtidos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Para as extrações, 3,0000 g de partes aéreas de *P. amarus* (amostras) foram colocadas em uma célula de extração de aço inoxidável de 100 mL com aquecimento elétrico, acoplada à unidade de extração representada na Figura 7. Esta célula foi utilizada para se

conseguir trabalhar na temperatura de 80 °C, o que não era possível nas outras células com aquecimento com banho de água.

Tabela 6. Planejamento experimental para o processo de PLE.

Ensaio	T (°C)	%EtOH
1	35	0
2	50	0
3	65	0
4	80	0
5	35	50
6	50	50
7	65	50
8	80	50
9	35	100
10	50	100
11	65	100
12	80	100

O processo de PLE consistiu nas seguintes etapas: i. a célula de extração, já com a amostra, foi aquecida por 30-60 min até atingir a temperatura de trabalho de cada ensaio; ii. O solvente foi bombeado para a célula com a vazão programada, até atingir a pressão de trabalho de 10 MPa; iii. A válvula de saída e a micrométrica foram abertas e a extração começou; iv. Após a extração, a massa de extrato líquido (extrato + solvente) foi medida e este foi armazenado em refrigerador até o momento das análises. Para todas as condições a razão entre as massas de solvente e amostra (S/F) foi mantida constante.

Para obtenção do  $x_0$ , três alíquotas (~20 g) de cada extrato obtido foram separadas para a evaporação do solvente, utilizando um rotaevaporador (Marconi, model MA120/E, Piracicaba-SP, Brasil) e a massa de cada alíquota seca foi usada para calcular a massa de extrato seco total.

### 3.3.2 Extração com UltraTurrax – EUT

O processo de extração à baixa pressão utilizando um dispersor Ultra-Turrax (IKA, T18 Basic, Staufen im Breisgau, Germany) foi realizado sem controle de temperatura. O dispersor Ultra-Turrax é normalmente utilizado em estudos qualitativos de extração em escala laboratorial. Os rendimentos alcançados nessa técnica são altos, pois o dispersor provoca a ruptura das paredes celulares, liberando os compostos para serem solubilizados pelo solvente. A extração com Ultra-Turrax foi utilizada para fins de comparação com os resultados da PLE. Experimentos preliminares foram realizados para definir a rotação e o tempo de extração, mantendo o S/F da PLE.

Após a definição das condições de trabalho, o planejamento experimental pôde ser realizado, com a concentração de etanol nos mesmos níveis da PLE sendo a variável independente (Tabela 7). As variáveis resposta avaliadas foram  $x_0$ ,  $x_{1a}$  e  $x_{1e}$ . Os resultados obtidos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Tabela 7. Planejamento Experimental do método a baixa pressão

Ensaio	%EtOH
1	0
2	0
3	0
4	50
5	50
6	50
7	100
8	100
9	100

O processo de extração se deu da seguinte forma: 0,5000 g do material vegetal foi colocado em tubos Falcon (50 mL) com quantidade suficiente de solvente para manter a razão S/F dos experimentos de PLE. Depois das extrações, os tubos foram centrifugados (Fanem, Excelsa Baby II Model 206R, São Paulo-SP, Brazil) a 3000 rpm durante 7 min. As porções sobrenadantes foram coletadas e armazenadas sob refrigeração até o momento das análises.

### 3.3.3 Extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico

#### 3.3.3.1 SFE sem cossolvente (SFE1)

Experimentos preliminares foram realizados para os processos de SFE sem cossolvente (SFE1) com o intuito de determinar as condições de trabalho que seriam utilizadas posteriormente nos planejamentos experimentais de extração, tais como: vazão de CO<sub>2</sub>, tempo estático e tempo de extração. Para estes testes, utilizou-se 3,0000 g de amostra e as extrações ocorreram a 40 °C e 10 MPa. Os testes culminaram na definição da razão S/F que foi usada no planejamento experimental.

Os experimentos de SFE1 foram organizados em um planejamento com dois fatores (Temperatura - T e Pressão - P) e 3 níveis de cada fator, com duplicata das extrações (Tabela 8).

O procedimento era o seguinte: i. a amostra foi adicionada à célula de extração de 100 mL; ii. A célula foi aquecida por 10-30 min, até atingir a temperatura de trabalho; iii. O CO<sub>2</sub> foi liberado do cilindro, passando pelo banho ultratermostatizado para se tornar líquido (a

-5 °C), para ser bombeado pela bomba pneumática até o banho de aquecimento (para atingir a temperatura de trabalho) e chegando até a célula; iv. O CO<sub>2</sub>, já no estado supercrítico, preencheu o leito até atingir a pressão de trabalho de cada ensaio experimental; v. O CO<sub>2</sub> ficou em contato com o leito durante o tempo estático, para que ocorresse a saturação de todo o leito com o solvente; vi. A válvula de saída e a micrométrica foram abertas e a extração (tempo dinâmico) começou; vii. Após o termino da extração a massa de extrato foi medida e este foi armazenado em refrigerador até o momento das análises.

Tabela 8. Planejamento experimental para os processos de SFE sem e com cossolvente.

Ensaio	T (°C)	P (MPa)
1	40	10
2	40	20
3	40	30
4	50	10
5	50	20
6	50	30
7	60	10
8	60	20
9	60	30

### 3.3.3.2 SFE com cossolvente (SFE2)

O processo de SFE com cosolvente (SFE2) foi realizado nas mesmas condições de temperatura e pressão (Tabela 8) e com o mesmo S/F do SFE1, a fim de comparação dos resultados. O cossolvente escolhido (mantido na concentração de 10% m/m) foi aquele que apresentou os melhores resultados em quantidade de lignanas extraídas da matéria-prima na PLE.

Para manter o S/F do SFE1, a massa de solvente e cossolvente foram calculadas de modo que a proporção de 10% do cossolvente se mantivesse constante tanto no tempo estático quanto no tempo dinâmico. Experimentos preliminares foram realizados para definir o tempo estático, a vazão de CO<sub>2</sub>, a vazão de cossolvente, o tempo de injeção de cossolvente e o tempo dinâmico. Para estes testes, foi utilizado 1,7000 g de amostra e a extração ocorreu a 40 ° C e 10 MPa.

O processo teve as seguintes etapas: i. a amostra foi adicionada na célula de extração de 10 mL; ii. A célula foi aquecida durante 10-30 min; iii. O cossolvente foi injetado para dentro da célula em vazão adequada por dois minutos; iv. O CO<sub>2</sub> encheu o leito até a pressão de trabalho de cada ensaio experimental; v. A mistura supercrítica de CO<sub>2</sub> + EtOH foi mantida em contato com o leito durante o tempo estático; vi. As válvulas de saída e

micrométrica foram abertas e a extração (tempo dinâmico) começou; vii. Após a conclusão da extração foi medido o peso do extrato líquido; viii. O solvente de cada extrato foi evaporado, e foi calculada o  $x_0$ ; ix. Os extratos foram armazenados em refrigerador até a análise por cromatografia.

### 3.4 Análises dos extratos

Os extratos obtidos por PLE e EUT foram os primeiros a serem analisados, sendo necessário conhecer quais as lignanas estavam presentes. Uma metodologia de identificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Gas Chromatography Mass Spectrometry - GC-MS) foi testada para estes extratos. Já a quantificação das lignanas foi realizada utilizando a filantina e a nirantina como padrões na cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Para os extratos obtidos por SFE1 e SFE2 a identificação e a quantificação foram realizadas apenas por HPLC-DAD.

#### 3.4.1 Identificação das lignanas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) - Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS)

Alíquotas dos extratos de PLE e EUT foram coletadas e os solventes foram removidos utilizando rotaevaporador (Marconi, MA120E, Piracicaba-SP, Brasil). Em seguida, os extratos secos foram ressuspendidos em metanol (MeOH) em abundância (para garantir a solubilização da maior quantidade possível de lignanas), levados ao banho de ultrassom por 10 min, filtrados utilizando filtros para seringas (de nylon, com 33 mm x 0,45  $\mu\text{m}$ ) e evaporados novamente. Finalmente, estes extratos foram solubilizados em metanol de modo a atingir a concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup> para a análise por GC. A partir dos resultados obtidos nessa análise e com base no padrão de fragmentação de cada composto e do tempo de retenção, as lignanas foram identificadas.

As análises de GC-MS foram realizadas em cromatógrafo a gás Agilent (modelo 6890N, Califórnia, EUA) com detector seletivo de massas (modelo 5975) e um auto-injetor (modelo 7683B). Os compostos foram separados em uma coluna capilar HP-5 (25 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) operando a 150 °C por 2 min; 5 °C/min até 240 °C; 10 °C/min até 300 °C e mantendo essa temperatura por 34 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 280 °C e 300 °C, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste com vazão de 1.0 mL.min<sup>-1</sup>.

### 3.4.2 Quantificação de filantina e nirantina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

As concentrações de filantina e nirantina nos extratos foram determinadas por HPLC usando um sistema Alliance (Waters, Milford, EUA) com detector de arranjo de diodo (Waters, modelo 2996). Uma coluna XBridge® Shield RP 18 (100 x 2,1 mm<sup>2</sup>, 3,5 µm, Waters) operando a 40 °C foi usada. A fase móvel consistiu na mistura de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água e metanol, na proporção de 60:40 (v/v). A vazão da fase móvel foi de 0,25 mL.min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 10 µL. Utilizou-se padrões secundários de filantina e nirantina isolados em projetos anteriores no CPQBA, com pureza mínima de 98% (determinada por HPLC). O cálculo das concentrações de filantina e nirantina foi determinado por calibração externa a 232 nm. Várias curvas de calibração dos analitos foram obtidas ao longo do trabalho (APENDICE B) nas seguintes concentrações: 1,09; 2,18; 3,26; 5,44; 7,62; 10,88; 16,32; 20,40; 32,64; 40,80; 65,28; 81,60 µg/mL para a nirantina e 5,00; 10,00; 20,00; 40,00; 60,00; 80,00 e 100,00 µg/mL para a filantina.

Antes das injeções os extratos obtidos nos processos de PLE, SFE2 e EUT, que já eram líquidos, foram filtrados utilizando filtros de seringa (de nylon, com 33 mm x 0,45 µm) e diluídos utilizando a fase móvel.

Os extratos de SFE1, por serem semi-sólidos, foram primeiramente solubilizados na fase móvel, filtrados e em seguida diluídos para a concentração desejada.

### 3.5 Análises Estatísticas

Para o processo de PLE, as variáveis independentes foram codificadas para realização das análises estatísticas: Temperatura (X<sub>1</sub>) e concentração de etanol (X<sub>2</sub>). Para a análise do rendimento global (x<sub>0</sub>), 72 valores experimentais foram usados (3 alíquotas x 24 ensaios), enquanto que para os rendimentos de filantina e nirantina 24 valores experimentais foram usados (24 ensaios).

A ANOVA e a regressão múltipla dos resultados de PLE foram realizadas utilizando o software SAS 9.0®. A regressão foi realizada para se obter uma predição do comportamento contínuo das variáveis estudadas. O modelo completo testado está expresso na Equação 5. Para o ajuste desse modelo se observou o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), a falta de ajuste e a significância dos parâmetros.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1 X_1 + \beta_{22} X_2 X_2 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:  $Y$  é a variável resposta;  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{12}, \beta_{11}, \beta_{22}$  são os parâmetros da equação;  $X_1, X_2$  são as variáveis independentes.

Além disso, avaliou-se o comportamento pontual das variáveis através da comparação entre médias (teste de Tukey) dos valores de  $x_0$  e rendimento de lignanas de cada condição experimental, a fim de se observar qual a melhor condição de cada processo.

Para o processo EUT, nove dados foram utilizados na análise estatística (9 ensaios). A ANOVA destes resultados foi realizada utilizando o SAS 9.0. Para a comparação dos resultados de rendimentos de cada lignana entre os processos de EUT e PLE, foi realizada a ANOVA e o teste Tukey.

Para os processos de SFE1 e SFE2, ANOVA e teste de comparação entre médias do rendimento global ( $x_0$ ) e dos rendimentos de filantina e nirantina foram realizados utilizando o software SAS 9.0, com 27 valores experimentais.

### 3.6 Simulação dos processos industriais de extração com fluidos pressurizados

As simulações dos processos de PLE e SFE1 e SFE2 foram realizadas utilizando o software SuperPro Designer 8.5® (Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ, EUA), e a Figura 9 mostra os seus fluxogramas.

Os processos consistiram no uso de dois extratores, permitindo a operação semi-contínua (enquanto um extrator estava em funcionamento, o outro era limpo e preparado para o próximo ciclo de extração). O sistema de PLE (Figura 9a) tem apenas um tanque de armazenagem de solvente. O processo de SFE2 (Figura 9c) tem um tanque de armazenamento de cossolvente (P-11 / V-101) e um sistema de alimentação de  $CO_2$  (P1 / MX-101), enquanto o processo SFE1 (Figura 9b) não tem um tanque para armazenamento de cossolvente.

Os processos foram concebidos para operar por 7920 horas por ano, o que corresponde a 3 turnos diários para 330 dias por ano. Foi considerado que o extrator da escala industrial teria volume de 50 L. Para a simulação, um procedimento semelhante ao descrito por Santos et al. (2012) foi utilizado: assumiu-se que os rendimentos e composição dos extratos obtidos na escala de laboratório também podem ser obtidos na escala industrial, quando as mesmas condições de processamento forem usadas (temperatura, pressão, S/F, porosidade do leito, etc.). A quantidade de matéria-prima a ser processada em cada estágio foi calculada com base no volume do extrator e densidade aparente da matéria-prima ( $210 \text{ kg/m}^3$ ).

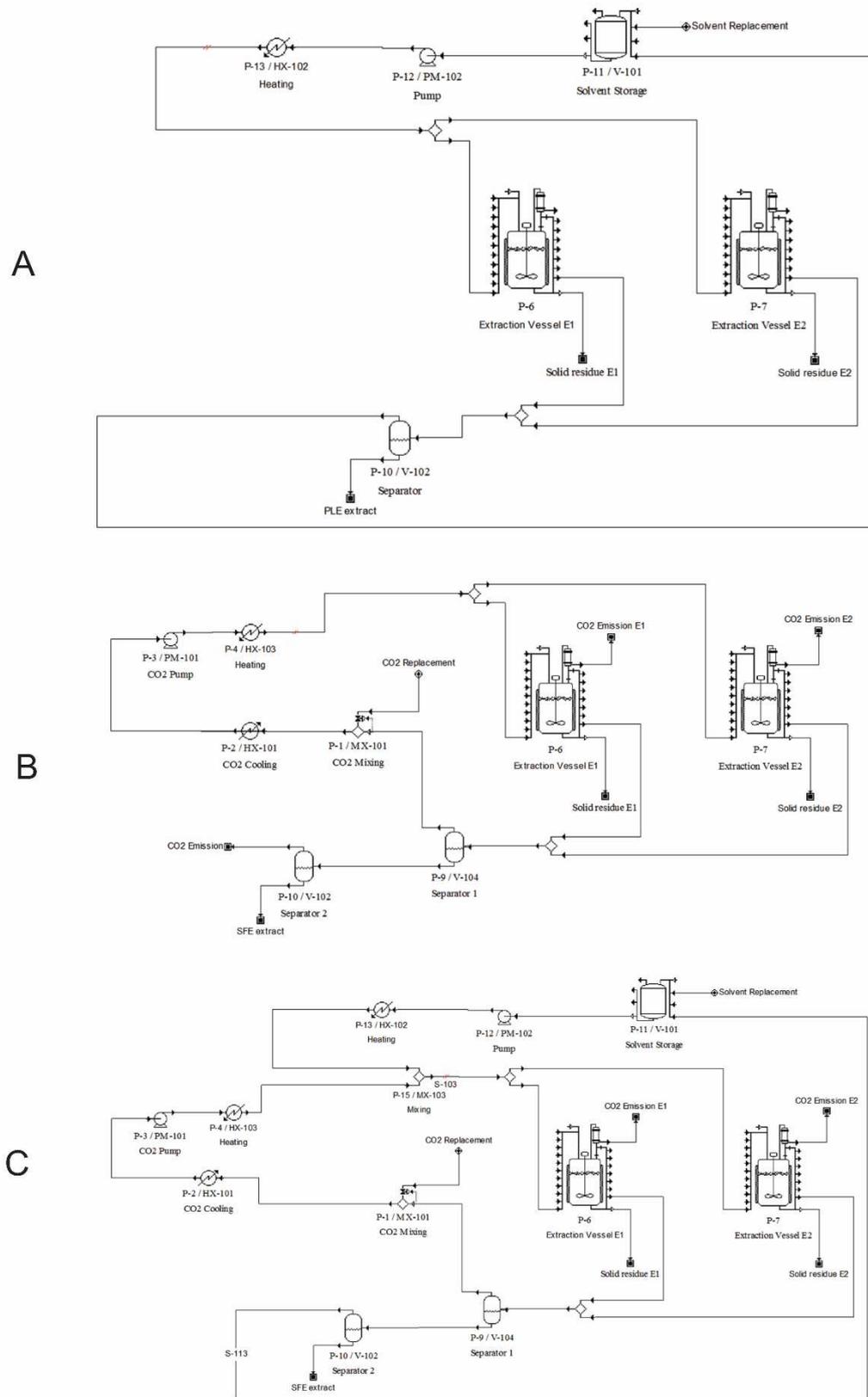


Figura 9. Fluxograma dos processos obtidos pelo software SuperPro Designer 8.5®: A) PLE; B) SFE1; C) SFE2

### 3.7 Avaliação econômica

Para obter o custo do equipamento foi utilizada a Equação 6, na qual  $C_1$  é o custo do equipamento com capacidade  $Q_1$  (L);  $C_2$  é o custo base conhecido para equipamentos com capacidade  $Q_2$  (L) e  $n$  é uma constante que depende do tipo de equipamento. Valores de  $n$  foram recolhidos a partir de literatura (GREEN; PERRY, 2007; SILLA, 2003; SMITH, 1995; TURTON; BAILIE; WHITING, 2009). Na Tabela 9 são apresentados os custos de base utilizados neste trabalho.

$$C_1 = C_2 \left( \frac{Q_2}{Q_1} \right)^n \quad \text{Equação 6}$$

Tabela 9. Custos base dos equipamentos que compõem a planta de extração

Equipamento	$n^a$	Custo da Unidade Base (US\$) <sup>b</sup>
Tanque de armazenagem <sup>c, e</sup>	0,57	300,00
Extrator encamisado <sup>c, d, e, f</sup>	0,82	5.540,00
Bomba de CO <sub>2</sub> movida a ar <sup>d, e</sup>	0,55	2.470,00
Bomba elétrica de líquido <sup>c, e</sup>	0,55	3.920,00
Cooler <sup>d, e</sup>	0,59	2,080
Aquecedor <sup>c, d, e</sup>	0,59	820,00
Manômetro <sup>c, d, e</sup>	0	410,00
Válvulas de bloqueio <sup>c, d, e</sup>	0,60	220,00
Válvulas Back-pressure <sup>c, d, e</sup>	0,60	1.780,00
Válvula Micrométrica <sup>c, d, e</sup>	0,60	1.090,00
Fluxômetro <sup>d, e</sup>	0,60	700,00
Válvula de Segurança <sup>c, d, e</sup>	0,60	310,00
Controlador de temperatura <sup>c, d, e</sup>	0,60	310,00
Compressor <sup>d, e</sup>	0,46	2.200,00
Separador <sup>d, e</sup>	0,49	1.460,00
Tubulações, conexões, misturadores e divisões <sup>c, d, e, g</sup>	0,60	3.660,00
Material estrutural de suporte do equipamento <sup>c, d, e, g</sup>	0,60	4.060,00
Custo Total PLE		29.420,00
Custo Total SFE1		35.570,00
Custo Total SFE2		39.790,00

<sup>a</sup>  $n$  constante que depende do tipo de equipamento com base em referências (GREEN; PERRY, 2007; SILLA, 2003; SMITH, 1995; TURTON; BAILIE; WHITING, 2009); <sup>b</sup> Baseado em uma planta que opera com extratores de 1 L; <sup>c</sup> Unidade de PLE; <sup>d</sup> Unidade de SFE1; <sup>e</sup> Unidade SFE2; <sup>f</sup> Suporta pressões de até 60 MPa; <sup>g</sup> Custo Total

O custo de manufatura (COM) foi estimado de acordo com Turton et al. (2009), onde o custo é determinado pela soma de três componentes principais: os custos diretos, custos fixos e despesas gerais. Em seguida, os três componentes principais da COM para cada processo foram estimados em termos de cinco grandes custos, conforme a Equação 7: capital fixo de investimento (fixed capital of investment - FCI), o custo de mão de obra operacional (cost of

operational labor - COL), custo de utilidades (cost of utilities - CUT), o custo de tratamento de resíduos (waste treatment cost - CWT) e o custo da matéria-prima (cost of raw material - CRM).

$$COM = 0,28FCI + 2,73 COL + 1,23 (CUT + CWT + CRM) \quad \text{Equação 7}$$

FCI envolve as despesas com a implementação da linha de produção. COL está relacionada com os operadores das unidades de extração. Definiu-se que dois operadores serão necessários para operar as unidades industriais. CUT considera a energia utilizada no ciclo de solvente para os requisitos de geração de vapor, de refrigeração de água e electricidade. CRM consiste no custo de aquisição da planta seca e moída e os custos dos solventes. Neste trabalho, o custo de aquisição da planta seca e moída utilizado foi de US\$ 48,39/kg (Tropilab Inc, EUA, <http://www.tropilab.com>, último acesso em 19/07/2016). Finalmente, a CWT foi considerada como sendo zero porque o desperdício gerado pelo processo pode ser considerado inofensivo e limpo e pode ser reutilizado em outras aplicações ou simplesmente eliminados como resíduos vegetais. Os solventes são recirculados e a perda foi considerada de até 2% em todos os processos. Mais detalhes podem ser encontrados em Peters et al. (2003) e Rosa e Meireles (2005). Considerando esses aspectos, a Tabela 10 fornece informações importantes sobre os dados utilizados para a simulação COM.

Tabela 10. Parâmetros econômicos de entrada utilizados na simulação.

<b>Capital fixo de investimento (FCI)</b>	
Unidade de PLE <sup>a</sup>	US\$ 480.154,00
Unidade de SFE1 <sup>a</sup>	US\$ 517.504,00
Unidade de SFE2 <sup>a</sup>	US\$ 542.931,00
Taxa de depreciação <sup>b</sup>	10%/ano
Taxa de manutenção anual <sup>b</sup>	6%/ano
<b>Mão-de-obra operacional (COL)</b>	
Salário <sup>c</sup>	US\$ 6,16/h
Trabalhadores	2
<b>Custo de matéria-prima (CRM)</b>	
Planta seca e moída <sup>d</sup>	US\$ 48,39 /kg
Dióxido de Carbono <sup>d</sup>	US\$ 4,88/kg
Etanol <sup>d</sup>	US\$ 8,12/kg
Água destilada <sup>d</sup>	US\$ 2,35/kg
<b>Utilidades (CUT)</b>	
Eletricidade <sup>e</sup>	US\$ 0,23/(kWh)

<sup>a</sup> Custo estimado utilizando a Equação 6 uma unidade de extração de 50 L; <sup>b</sup> baseando em Peters et al. (2003); <sup>c</sup> Indicador de salário, <http://www.wageindicator.org>, EUA, acessado em 15/07/2016; <sup>d</sup> Cotação direta; <sup>e</sup> <http://www.eia.gov>, EUA, acessado em 15/07/2016.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Matéria-prima e Caracterização do leito

O teor de umidade planta *P. amarus* seca e moída (amostra) e os resultados da caracterização do leito estão apresentados na Tabela 11. Essas informações foram utilizadas nos modelos de simulação da avaliação econômica.

Tabela 11. Teor de umidade da amostra e caracterização do leito de partículas

Umidade (%)	$6,41 \pm 0,04$
Diâmetro médio (mm)	0,43
Massa específica real ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	$1,49 \pm 0,01$
Massa específica aparente ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	$0,21 \pm 0,00$
Porosidade	0,85

Na Figura 10 está apresentada a distribuição de tamanho das partículas do leito, sendo que para a realização dos processos de extração rejeitou-se o conteúdo retido nas peneiras das extremidades, com intuito de evitar o entupimento da linha e empacotamento do leito (no caso das partículas menores) e evitar a formação de leitos não-uniformes (pela presença das partículas muito grandes).

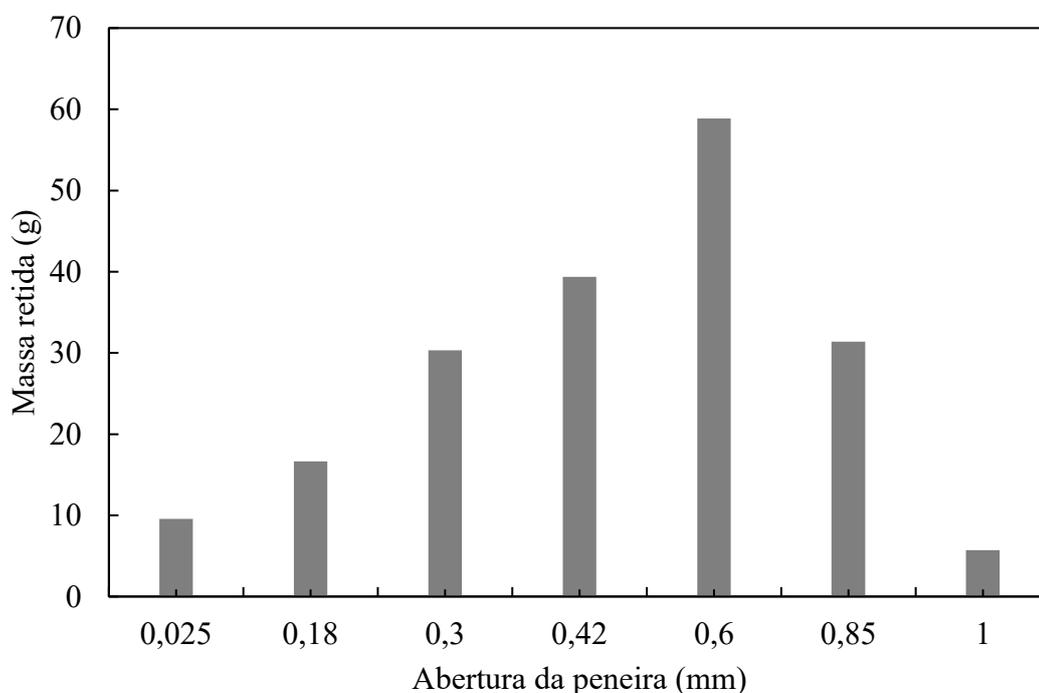


Figura 10. Distribuição de diâmetro de partículas

## 4.2 Extração com Líquidos Pressurizados (PLE) e Extração com Ultra Turrax (EUT)

### 4.2.1 Experimentos preliminares

Os primeiros testes de PLE para determinação de  $x_0$  utilizando etanol absoluto como solvente levaram a um valor de aproximadamente 12,4% em 120 min, para todas as vazões estudadas (1,5; 3,0 e 6,0 mL/min). Nos testes de cinética de extração por PLE (Figura 11), para definir o tempo de extração, assumiu-se como satisfatório atingir 80% deste valor de  $x_0$ , o que foi obtido em 70-85 min; 60 min e 60-70 min, para as vazões de 1,5; 3,0 e 6,0 mL/min, respectivamente. Logo, a vazão de 3,0 mL/min foi escolhida como vazão de trabalho, pelos seguintes fatores:

- i. apresentar o menor tempo para atingir o  $x_0$  estabelecido, o que implica em menor gasto de solvente em relação à cinética que utilizou vazão de 6,0 mL/min;
- ii. proporcionar um controle maior nas condições de operação no equipamento do que com a vazão de 1,5 mL/min no que diz respeito ao controle de temperatura e de abertura e fechamento da válvula micrométrica, proporcionando menos desvios na quantidade de extrato obtido em cada tempo.

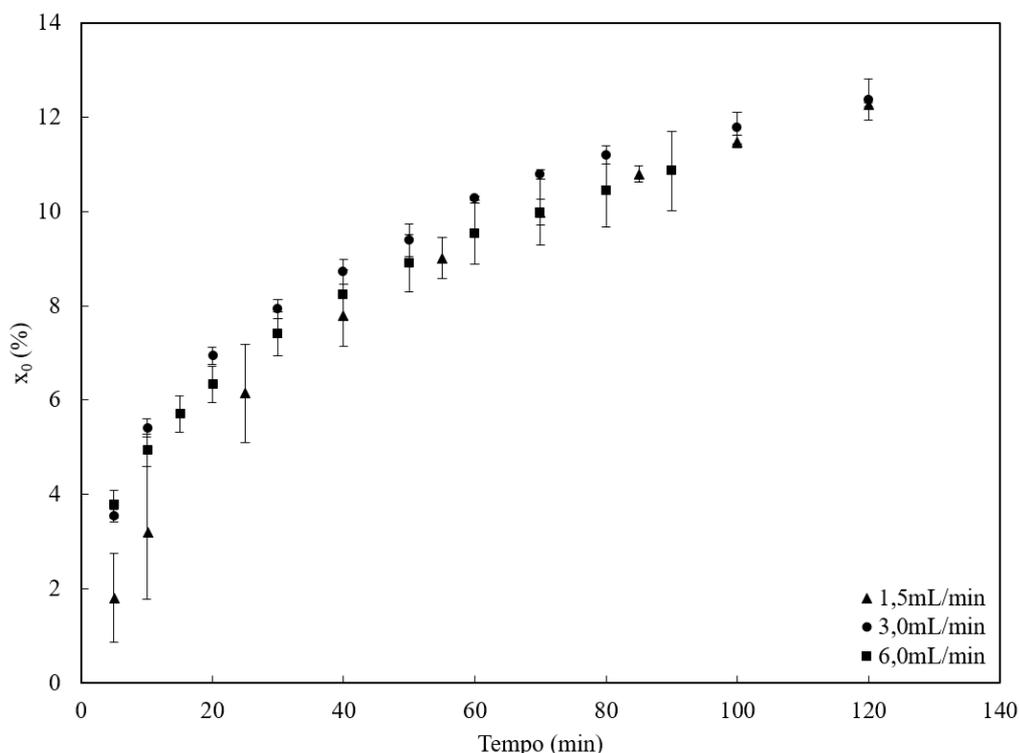


Figura 11. Testes de cinética de extração a partir de *P. amarus* por PLE, utilizando etanol absoluto como solvente a 35 °C e 10 MPa.

Também foram realizados ensaios cinéticos utilizando água como solvente (Figura 12) com uma vazão de 3,0 mL/min. O rendimento global máximo obtido nesse caso foi de 37%,

em 90 min. Observando a curva, é possível perceber que 80% desse rendimento é atingido entre 20 e 30 min. Entretanto, fixou-se o tempo de 60 min para manter a padronização entre os experimentos de PLE.

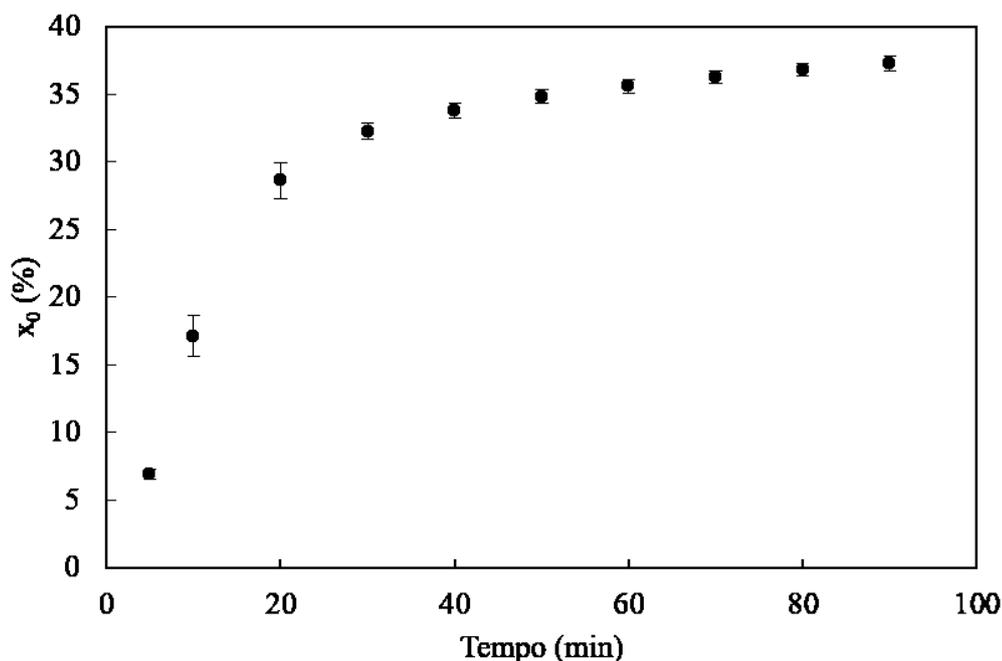


Figura 12. Testes de cinética de extração a partir de *P. amarus* por PLE, utilizando água como solvente a 35 °C e 10 MPa.

Dessa forma, definiu-se o tempo de extração de 60 min, fixando-se assim a razão S/F de 46 kg solvente/kg amostra (razão entre a quantidade utilizada de solvente e a quantidade de amostra seca e moída colocada no leito de extração). Estas informações foram usadas para direcionar o planejamento experimental. Para manter o S/F constante e utilizar o mesmo tempo de extração em todos os experimentos de PLE, foi necessário modificar a vazão volumétrica de cada solvente no planejamento experimental, devido às suas diferentes massas específicas: 2,30 mL/min (Água); 2,50 mL/min (mistura 50% v/v EtOH/Água) e 2,94 mL/min (EtOH absoluto).

Os dados completos das curvas de cinética de extração dos testes preliminares estão apresentados nas Tabelas C1 e C2 do Apêndice C.

No processo de extração por Ultra-Turrax os experimentos preliminares levaram à definição dos seguintes parâmetros: rotação do dispersor de 11000 rpm e tempo de extração de 5 min.

4.2.2 Rendimento Global -  $x_0$  (%)

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados de  $x_0$  do processo de PLE em diferentes temperaturas e composições de solvente. De acordo com a ANOVA (Relatório D1 do APÊNDICE D) destes resultados, ambas as variáveis são significativas para o processo de extração ( $p < 0,05$ ), inclusive com interação entre elas. Como são variáveis quantitativas, a análise estatística seguiu para a regressão múltipla para obtenção do comportamento contínuo dentro do intervalo de trabalho. Avaliando o coeficiente de determinação ( $R^2 < 0,75$ ), a falta de ajuste do modelo (que foi significativa,  $p < 0,05$ ) e a significância dos parâmetros da equação (todos os parâmetros do modelo completo foram significativos,  $p < 0,05$ ), verificou-se que não foi possível obter uma equação que descrevesse satisfatoriamente o comportamento do  $x_0$  (Relatório D2 do APÊNDICE D). Assim, utilizou-se a ANOVA one-way com o teste de Tukey, para uma análise pontual destes resultados em cada uma das condições (Relatório D3 do APÊNDICE D).

O menor valor de  $x_0$  foi obtido para os ensaios que utilizaram etanol absoluto como solvente (Figura 13), provavelmente porque o etanol é mais seletivo do que a água. É por este motivo que alguns trabalhos utilizam o etanol como solvente em diferentes métodos para extrair lignanas a partir de amostras do gênero *Phyllanthus* (HANH; SINCHAIPANID; MITREVEJ, 2013; MAITY et al., 2013a, 2013b; YUANDANI et al., 2013).

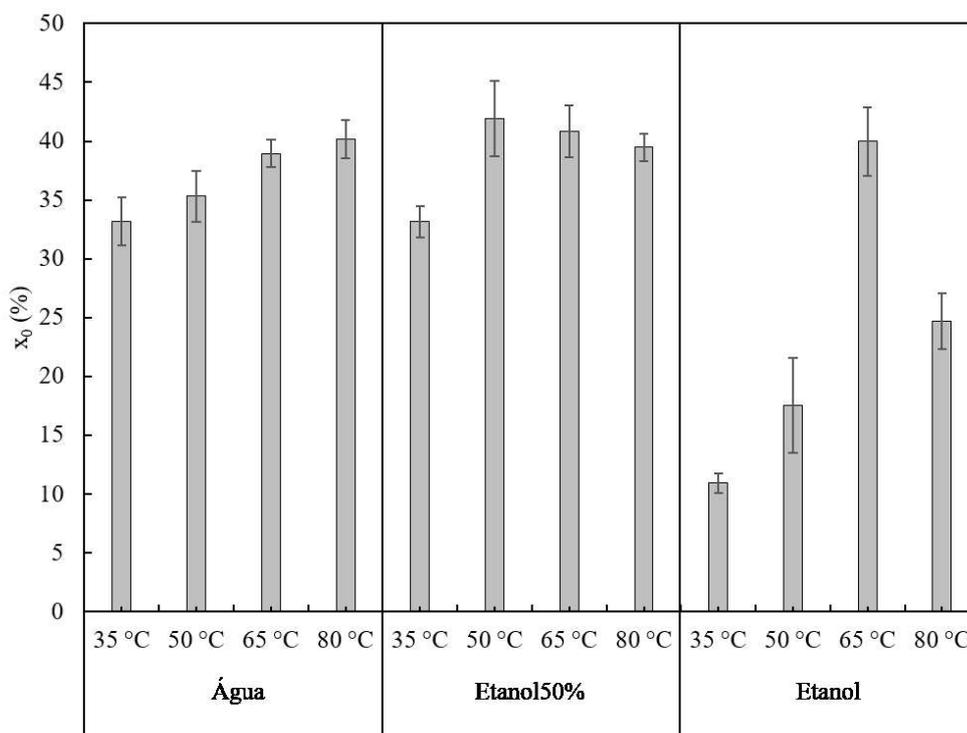


Figura 13. Rendimentos globais ( $x_0$ ) obtidos por PLE para cada temperatura (°C) e tipo de solvente.

Tabela 12. Rendimentos global, de filantina e nirantina obtidos por PLE para *P. amarus* em diferentes temperaturas e composição do solvente.

T (°C)	C (%)	X1	X2	x <sub>0</sub> (%)	x <sub>1a</sub> (mg <sub>lignana</sub> / g <sub>amostra</sub> )			x <sub>1e</sub> (mg <sub>lignana</sub> / g <sub>extrato</sub> )		
					Filantina	Nirantina	Soma	Filantina	Nirantina	Soma
35	0	-2	-1	33,18 ± 2,04 <sup>c</sup>	0,77 ± 0,03 <sup>f</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,90 ± 0,04 <sup>d</sup>	2,17 ± 0,08 <sup>e</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>d</sup>	2,53 ± 0,10 <sup>d</sup>
50	0	-1	-1	35,31 ± 2,18 <sup>bc</sup>	1,02 ± 0,21 <sup>f</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>d</sup>	1,23 ± 0,23 <sup>d</sup>	2,83 ± 0,76 <sup>e</sup>	0,60 ± 0,11 <sup>d</sup>	3,43 ± 0,87 <sup>d</sup>
65	0	0	-1	38,95 ± 1,51 <sup>ab</sup>	1,51 ± 0,38 <sup>ef</sup>	0,35 ± 0,13 <sup>d</sup>	1,86 ± 0,50 <sup>d</sup>	3,82 ± 1,03 <sup>de</sup>	0,87 ± 0,34 <sup>d</sup>	4,69 ± 1,37 <sup>d</sup>
80	0	1	-1	40,15 ± 1,64 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,05 <sup>ef</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,69 ± 0,06 <sup>d</sup>	3,58 ± 0,30 <sup>de</sup>	0,52 ± 0,04 <sup>d</sup>	4,11 ± 0,34 <sup>d</sup>
35	50	-2	0	33,15 ± 1,22 <sup>c</sup>	4,10 ± 0,07 <sup>abc</sup>	2,83 ± 0,01 <sup>ab</sup>	6,92 ± 0,08 <sup>abc</sup>	11,33 ± 0,26 <sup>bc</sup>	7,83 ± 0,07 <sup>bc</sup>	19,16 ± 0,33 <sup>bc</sup>
50	50	-1	0	41,92 ± 2,26 <sup>a</sup>	4,89 ± 0,36 <sup>a</sup>	3,24 ± 0,42 <sup>a</sup>	8,12 ± 0,78 <sup>a</sup>	11,33 ± 0,07 <sup>bc</sup>	7,49 ± 0,38 <sup>bc</sup>	18,82 ± 0,31 <sup>bc</sup>
65	50	0	0	40,82 ± 2,18 <sup>a</sup>	4,51 ± 0,14 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,21 <sup>a</sup>	7,53 ± 0,35 <sup>a</sup>	10,70 ± 0,08 <sup>bcd</sup>	7,15 ± 0,33 <sup>bc</sup>	17,85 ± 0,41 <sup>bc</sup>
80	50	1	0	39,46 ± 1,18 <sup>ab</sup>	4,20 ± 0,37 <sup>ab</sup>	2,95 ± 0,20 <sup>a</sup>	7,15 ± 0,57 <sup>ab</sup>	10,42 ± 0,76 <sup>bcd</sup>	7,34 ± 0,39 <sup>bc</sup>	17,76 ± 1,15 <sup>bc</sup>
35	100	-2	1	10,92 ± 0,82 <sup>f</sup>	2,59 ± 0,47 <sup>d</sup>	1,58 ± 0,50 <sup>c</sup>	4,17 ± 0,97 <sup>c</sup>	26,07 ± 2,42 <sup>a</sup>	15,65 ± 0,67 <sup>a</sup>	41,72 ± 1,75 <sup>a</sup>
50	100	-1	1	17,54 ± 0,88 <sup>e</sup>	3,00 ± 0,55 <sup>cd</sup>	2,17 ± 0,48 <sup>abc</sup>	5,17 ± 1,03 <sup>bcd</sup>	15,52 ± 4,99 <sup>b</sup>	11,27 ± 4,03 <sup>ab</sup>	26,79 ± 9,01 <sup>b</sup>
65	100	0	1	39,96 ± 2,62 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,00 <sup>de</sup>	1,60 ± 0,00 <sup>c</sup>	4,19 ± 0,00 <sup>d</sup>	7,04 ± 0,00 <sup>cde</sup>	4,38 ± 0,00 <sup>cd</sup>	11,42 ± 0,00 <sup>cd</sup>
80	100	1	1	24,68 ± 2,40 <sup>d</sup>	3,16 ± 0,13 <sup>bcd</sup>	1,79 ± 0,46 <sup>bc</sup>	4,95 ± 0,32 <sup>cd</sup>	12,84 ± 2,47 <sup>bc</sup>	7,09 ± 0,77 <sup>bc</sup>	19,93 ± 1,70 <sup>bc</sup>

T é a temperatura; C é a concentração de Etanol (%v/v) em água; X<sub>1</sub>: concentração de Etanol codificada; X<sub>2</sub>: temperatura codificada. x<sub>0</sub> é o rendimento global (kg<sub>extrato</sub>/kg<sub>amostra</sub>). x<sub>1a</sub> é o rendimento de lignana por grama de amostra (matéria-prima seca e moída); x<sub>1e</sub> é o rendimento de lignana por grama de extrato obtido; 100; Médias seguidas de mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si à 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tabela 13. Rendimentos global, de filantina e nirantina obtidos por EUT para *P. amarus* em função da composição do solvente.

%EtOH	x <sub>0</sub> (%)	x <sub>1a</sub> (mg <sub>lignana</sub> / g <sub>amostra</sub> )			x <sub>1e</sub> (mg <sub>lignana</sub> / g <sub>extrato</sub> )		
		Filantina	Nirantina	Soma	Filantina	Nirantina	Soma
0	20,90 ± 0,36 <sup>B</sup>	1,08 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>B</sup>	1,16 ± 0,03 <sup>B</sup>	5,16 ± 0,13 <sup>A</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>C</sup>	5,53 ± 0,11 <sup>C</sup>
50	28,63 ± 0,73 <sup>A</sup>	8,63 ± 0,07 <sup>A</sup>	0,47 ± 0,00 <sup>A</sup>	9,11 ± 0,08 <sup>A</sup>	30,17 ± 0,78 <sup>B</sup>	1,66 ± 0,05 <sup>B</sup>	31,82 ± 0,82 <sup>B</sup>
100	8,79 ± 0,42 <sup>C</sup>	9,17 ± 0,44 <sup>C</sup>	0,51 ± 0,02 <sup>A</sup>	9,68 ± 0,46 <sup>A</sup>	104,54 ± 9,32 <sup>C</sup>	5,77 ± 0,45 <sup>A</sup>	110,31 ± 9,78 <sup>A</sup>

Médias seguidas de mesma letra maiúscula em cada coluna não diferem entre si à 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

O efeito da temperatura no  $x_0$  para os ensaios com etanol foi mais complexo, porque o rendimento aumentou de 9,8% para 40,6% (de 35 °C para 65 °C) e diminuiu para 24,5% a 80 °C, conforme mostrado na Figura 13. O aumento no  $x_0$  entre 35 °C e 65 °C pode ser explicado devido à melhora nas condições de extração e solubilização dos compostos, o que está relacionado com as propriedades do solvente. O aumento de temperatura resulta na redução da viscosidade, densidade e tensão superficial do solvente e no aumento da difusividade. Já a redução de  $x_0$  na temperatura mais alta pode estar associada a uma possível perda de massa por volatilização de alguns compostos quando a despressurização ocorreu, na coleta do extrato. O extrato obtido a 80 °C apresentou cor e odor diferentes dos extratos etanólicos obtidos nas outras temperaturas. Sua cor verde-oliva é devida à degradação da clorofila. O odor do extrato indica a formação de compostos voláteis, possivelmente como consequência de algumas reações causadas por altas temperaturas.

Uma vez que a constante dielétrica ( $\epsilon$ ) da água é muito alta ( $\epsilon = 80$ ) em condições ambientes, ela é um solvente extremamente pobre para compostos orgânicos de baixa polaridade (exemplo: a solubilidade do octadecano em água na temperatura ambiente é de 8 ng/mL) e apenas um solvente moderado para compostos orgânicos polares (ex.: 80 mg/mL para fenol) (YANG; HAWTHORNE; MILLER, 1997). Ainda assim, a água tem sido usada como solvente de extração de diversos compostos a partir de plantas do gênero *Phyllanthus* tais como lignanas, compostos fenólicos, alcaloides e açúcares. Markom et al. (2007); Martins, Pereira Filho e Cass (2011); Sprenger e Cass (2013) obtiveram extratos aquosos de *P. amarus* (S/F = 9,96 kg<sub>solvente</sub>/kg<sub>amostra</sub>) por Soxhlet e identificaram alguns compostos por HPLC, tais como polifenóis simples, flavonoides, antocianinas e antraquinona. Em extrações usando água pressurizada como solvente (tipicamente em pressões entre 2 e 10 MPa), diferenças na solubilidade devido às alterações na pressão são desprezíveis (MILLER; HAWTHORNE, 1998; YANG et al., 1998). Em relação aos efeitos da temperatura neste processo, a água pode ser um solvente adequado para extrair compostos orgânicos de baixa a alta polaridade dependendo da temperatura de extração (MUSTAFA; TURNER, 2011). Contudo, este efeito não foi observado no presente trabalho, uma vez que a variação do rendimento global nos extratos aquosos em função da temperatura foi ligeira (de 33,18% para 40,15%, em 35 °C e 80 °C, respectivamente).

Os rendimentos globais das extrações com etanol (50% v/v) foram próximos aos obtidos nos experimentos com água e maiores que os da extração com etanol absoluto. De acordo com Mustafa e Turner (2011), o uso de uma mistura binária como solvente melhora a

solubilização dos compostos-alvo e a sua desSORÇÃO da matriz vegetal. No entanto, isso só pode ser verificado pela análise da composição dos extratos.

No método EUT, os resultados apresentados na Tabela 13 mostram valores absolutos de  $x_0$  diferentes para cada solvente. A ANOVA (Relatório D4 do APÊNDICE D) dos resultados confirma que o efeito da concentração de etanol foi significativo e o teste de Tukey mostrou que esses valores são significativamente diferentes entre si. Logo, a mistura binária leva a maiores valores de  $x_0$  do que os outros solventes e o uso de etanol absoluto conduz aos menores valores de  $x_0$ .

A comparação dos rendimentos globais entre diferentes métodos de extração é complicada, uma vez que a temperatura tem efeito nas extrações obtidas por PLE e o processo EUT foi realizado em temperatura ambiente e sem monitoramento do aquecimento provocado pelo dispersor. Entretanto, assumindo que essas são diferenças inerentes aos métodos, uma discussão qualitativa pode ser feita a partir da Figura 14, onde foram plotados os menores valores de  $x_0$  de cada solvente no processo de PLE (35°C e 10 MPa) em comparação com os mesmos solventes do EUT.

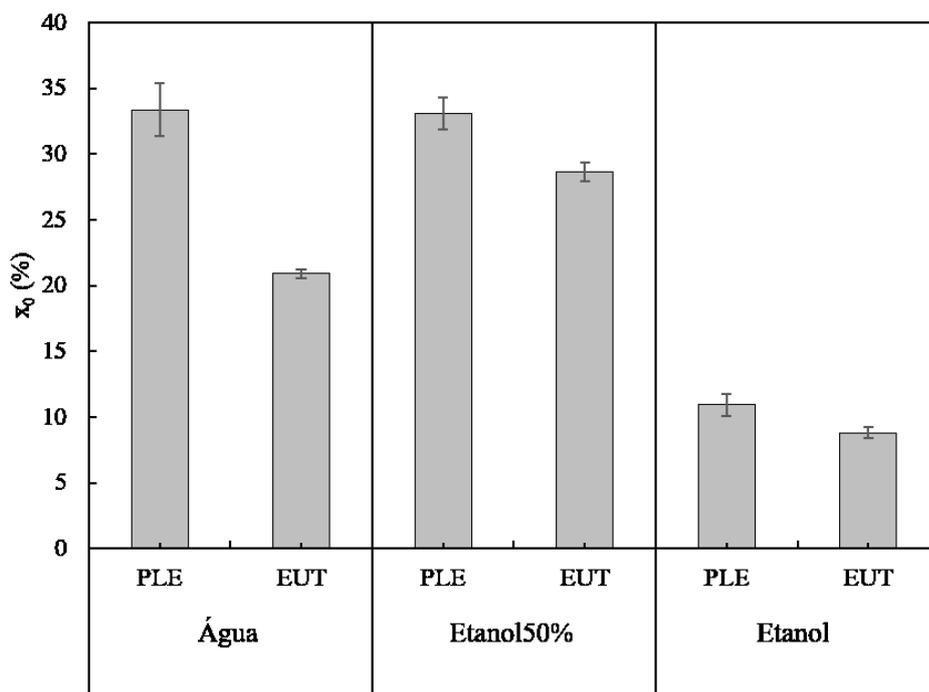


Figura 14. Comparação entre os menores  $x_0$  de cada solvente utilizado no PLE (35 °C e 10 MPa) e os  $x_0$  obtidos por EUT utilizando os mesmos solventes.

Observa-se que os valores de  $x_0$  foram maiores no processo de PLE para todos os solventes, contrariando o que era esperado, uma vez que o uso do dispersor provoca a ruptura das membrans celulares, deixando os compostos de mais fácil acesso para o solvente, o que

implicaria em um maior rendimento global. É importante ressaltar que os valores de  $x_0$  de PLE usados na comparação foram obtidos a 35 °C e 10 MPa, condição em que não se esperam grandes mudanças nas propriedades do solvente em comparação com as condições ambientes.

Contudo, os maiores rendimentos obtidos na PLE não garantem que os compostos de interesse estejam presentes em maiores quantidades nos extratos, ou seja, maior  $x_0$  não implica em maior seletividade do processo. O que acontece muitas vezes é o contrário: processos seletivos são os que têm menores rendimentos. Essa discussão é abordada na seção de quantificação das lignanas (Seção 4.2.4).

### 4.2.3 Identificação das lignanas

Os perfis cromatográficos dos extratos de PLE e EUT foram obtidos por GC-MS para cada ensaio e um cromatograma típico é apresentado para cada método nas Figura 15 e 16, no qual sete lignanas foram identificadas: 5-demetoxi-nirantina, filantina, filtetralina, 5-demetoxi-nirtetralina, nirtetralina, hipofilantina e nirantina.

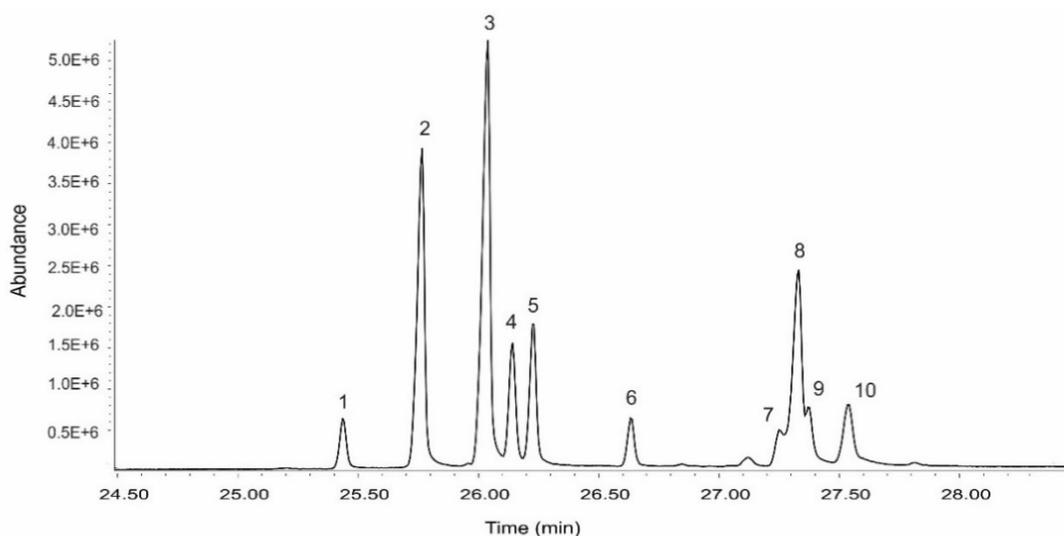


Figura 15. Janela expandida do cromatograma típico dos extratos de *P. amarus* obtidos por PLE. Os números em cada pico correspondem a: lignana 386 (1); 5-demetoxi-nirantina (2); filantina (3); filtetralina (4); 5-demetoxi-nirtetralina (5); nirtetralina (6); hipofilantina (7); nirantina (8); e lignana 430 (9); lignana 370 (10).

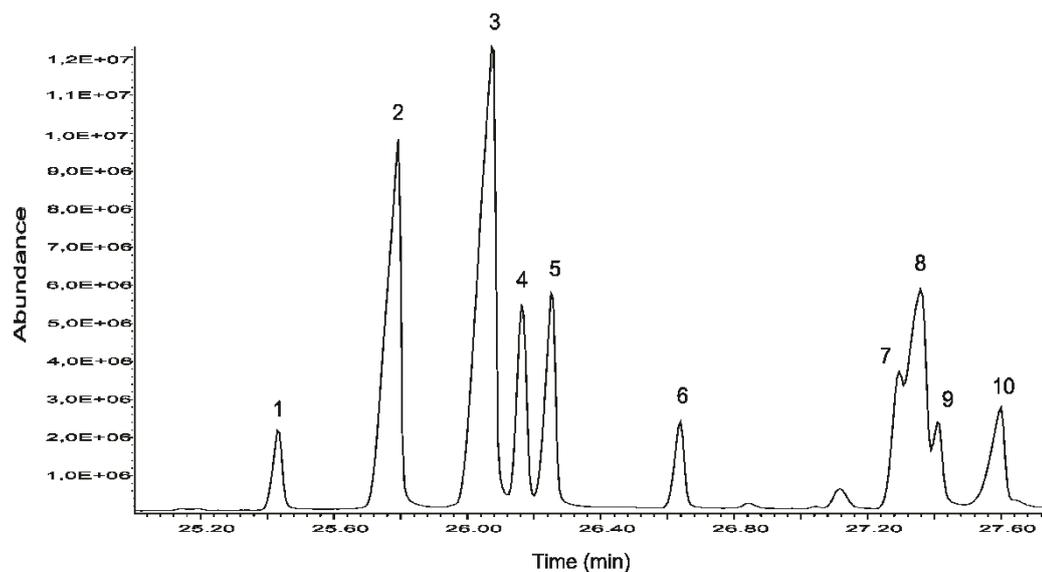


Figura 16. Janela expandida do cromatograma típico dos extratos de *P. amarus* obtidos por EUT. Os números em cada pico correspondem a: lignana 386 (1); 5-demetoxi-nirantina (2); filantina (3); filtetralina (4); 5-demetoxi-nirtetralina (5); nirtetralina (6); hipofilantina (7); nirantina (8); e lignana 430 (9); lignana 370 (10).

De acordo com a literatura, estas sete lignanas já foram encontradas em extratos e frações de *P. amarus* obtidos por diversos métodos de extração, utilizando metanol, água, etanol e misturas de etanol e água como solventes (CHOWDHURY et al., 2012; HANH; SINCHAIPANID; MITREVEJ, 2013; HUANG et al., 2003; KASSUYA et al., 2006; KASSUYA; SILVESTRE; REHDER, 2003; KHATOON et al., 2006; KRITHIKA et al., 2009; PATEL et al., 2011). Singh et al. (2009) também identificaram duas novas lignanas nas folhas de *P. amarus*: 3-(3,4-dimethoxy-benzil)-4-(7-methoxy-benzo[1,3]dioxol-5-il-metil)-dihidrofuran-2-ona e 4-(3,4-dimethoxy-phenil)-1-(7-methoxy-benzo[1,3]dioxol-5-il)-2,3-bis-methoxymetil-butan-1-ol.

Os principais fragmentos observados nos espectros de massas das lignanas identificadas nos extratos obtidos por ambos os métodos estão presentes na Tabela 14. Os fragmentogramas de todas elas são apresentados no APÊNDICE E.

Os picos (1), (9) e (10) não foram identificados porque o espectro de massas não correspondeu ao de nenhuma outra lignana da biblioteca do equipamento, mas a massa molecular e alguns fragmentos sugerem que estes picos correspondem a essa classe de compostos. De acordo com os fragmentos apresentados por Molska et al. (2014), o pico (10) (da lignana 370) pode corresponder ao composto dextroburseernina. Entretanto, mais estudos são necessários para gerar informações suficientes para a identificação destes compostos.

Tabela 14. Principais fragmentos observados no espectro de massas dos compostos presentes nos extratos de *P. amarum*

Compostos	Íons EM <sup>2</sup> (m/z) [intensidade relativa]							
Lignana 386	<b>386*</b>	218	187	173	136	135	77	45
t <sub>R</sub> = 25,436 min	[7]	[12]	[27]	[12]	[26]	[100]	[17]	[12]
5-demetoxi-nirantina	<b>402</b>	203	187	177	152	151	135	45
t <sub>R</sub> = 25,767 min	[19]	[19]	[14]	[14]	[33]	[100]	[60]	[15]
Filantina	<b>418</b>	203	189	177	152	151	107	45
t <sub>R</sub> = 26,034 min	[15]	[20]	[8]	[13]	[31]	[100]	[9]	[8]
Filtetralina	<b>416</b>	400	353	339	323	151	135	45
t <sub>R</sub> = 26,151 min	[42]	[60]	[36]	[59]	[100]	[63]	[41]	[56]
5-demetoxi-nirtetralina	<b>400</b>	337	323	308	305	296	151	45
t <sub>R</sub> = 26,237 min	[52]	[61]	[100]	[45]	[39]	[41]	[48]	[43]
Nirtetralina	<b>430</b>	367	353	222	215	208	151	45
t <sub>R</sub> = 26,644 min	[100]	[37]	[77]	[39]	[78]	[69]	[64]	[60]
Hipofilantina	<b>430</b>	367	353	215	208	151	135	45
t <sub>R</sub> = 27,262 min	[98]	[62]	[80]	[46]	[48]	[100]	[86]	[51]
Nirantina	<b>432</b>	217	203	166	165	152	151	45
t <sub>R</sub> = 27,339 min	[28]	[17]	[28]	[100]	[75]	[34]	[97]	[17]
Lignan 432	<b>432</b>	189	173	208	45	416	174	151
t <sub>R</sub> = 27,389 min	[4]	[100]	[63]	[46]	[41]	[40]	[38]	[29]
Lignan 370	<b>370</b>	371	152	151	136	135	107	77
t <sub>R</sub> = 27,548 min	[39]	[8]	[14]	[100]	[7]	[28]	[7]	[12]

\*Em negrito: Íon molecular de cada composto.

A quantificação das lignanas seria realizada por padrão interno no GC. Entretanto, o método apresentou baixa resolução para os picos (7) e (9), que aparecem como ombros do pico (8). As variações feitas no método não trouxeram melhora na separação dos picos, sendo necessário utilizar um método de quantificação por HPLC, cujos resultados estão na seção seguinte.

#### 4.2.4 Quantificação da Filantina e da Nirantina

Os rendimentos médios de filantina e nirantina ( $x_{1a}$  e  $x_{1e}$ ) para os extratos obtidos por PLE e EUT estão apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente. Os cromatogramas

obtidos por HPLC-DAD a 232 nm para padrões de filantina e nirantina e extratos de PLE e EUT são mostrados no APÊNDICE F.

A ANOVA dos resultados de  $x_{1a}$  de PLE mostrou que, para ambas lignanas, a interação entre os fatores estudados não é significativa ( $p > 0,05$ ) no intervalo estudado. Para a nirantina, a temperatura também não teve efeito significativo. Já para a filantina o efeito é significativo, mas está próximo do limite de probabilidade de 5%, o que pode significar que na análise de regressão os parâmetros associados a esse fator não tenham significância (Relatórios D5 a D7 do APÊNDICE D). Zhang et al. (2007), estudando a extração de lignanas a partir da linhaça, também descobriu que a temperatura não afeta o processo de extração, na faixa estudada. Quanto aos resultados de  $x_{1e}$ , foi observado que há efeito da temperatura, do solvente e da interação entre estes fatores.

Conforme sugerido anteriormente, a análise de regressão dos dados de rendimento de lignanas por grama de amostra revelou que a temperatura não é significativa para a extração de ambas lignanas. Os termos  $\beta_2$  e  $\beta_{22}$ , que correspondem aos efeitos linear e quadrático da concentração de etanol, são os únicos parâmetros significativos, além do intercepto  $\beta_0$  (Tabela 15) (Relatório D8 e D9 do APÊNDICE D). Contudo, pontos intermediários de concentração de etanol (por exemplo: 25% e 75% v/v) devem ser avaliados para verificar este comportamento. De acordo com Zhang et al (2007), quando o conteúdo de água no solvente excede 30%, o rendimento de lignanas é reduzido. No trabalho desses autores, a proporção de etanol no solvente de extração variou entre 50% e 90% e a condição ótima de extração foi obtida com a concentração de 70% de etanol. Ainda dos Relatórios D8 e D9, observou-se que não foi possível obter um ajuste de modelo satisfatório para os resultados de  $x_{1e}$ .

Os modelos ajustados para  $x_{1a}$  fornecem a quantidade de filantina ou nirantina (mg da lignana/g de amostra) que pode ser extraída por PLE nas condições adotadas neste trabalho. A partir dos valores preditos pelos modelos e/ou dos valores experimentais, pode ser observado que a mistura etanol+água (50% v/v) resulta em maiores rendimentos de lignanas. A mistura binária age, então, como um solvente mais seletivo do que a água, uma vez que as concentrações das lignanas obtidas para a mistura foram maiores, sem que ocorresse o aumento da extração de outros compostos ( $x_0$  igual para os solventes).

Já que a variação de temperatura não melhora a extração das lignanas analisadas, o processo de PLE pode ser conduzido em baixas temperaturas, o que resulta em menor consumo energético, tornando o processo mais barato.

Tabela 15. Parâmetros dos modelos ajustados para os resultados de rendimento de lignanas por grama de amostra dos extratos de *P. amarus* obtidos por PLE

Filantina – $R^2 = 0,93$				
Parâmetro	Valor	Erro	t	Pr >  t
$\beta_0$	4,4238	0,1356	32,63	<,0001
$\beta_2$	0,8188	0,0959	8,54	<,0001
$\beta_{22}$	-2,41	0,166	-14,52	<,0001
Nirantina – $R^2 = 0,95$				
Parâmetro	Valor	Erro	t	Pr >  t
$\beta_0$	3,0113	0,0988	30,48	<,0001
$\beta_2$	0,7794	0,0699	11,16	<,0001
$\beta_{22}$	-2,0044	0,121	-16,56	<,0001

Como não há efeito da temperatura no teor das lignanas no método de PLE empregado, os valores encontrados para cada temperatura podem ser assumidos como replicatas das extrações para cada concentração de etanol, ou seja, há apenas três condições experimentais diferentes (água, etanol 50%, etanol absoluto), com 8 replicatas, totalizando os 24 ensaios. Assim, esses valores podem ser comparados com os valores de rendimento de filantina e nirantina obtidos pelo método EUT (Figura 17).

Os maiores rendimentos de filantina por grama de amostra foram obtidos pelo método EUT, para o etanol 50% e o etanol absoluto (Figura 17A). Esse valor foi o dobro do obtido pela mistura 50% no método PLE e três vezes o valor do EtOH absoluto do método PLE. Como o rendimento global associado a estes valores é menor para o método EUT, ele se torna mais seletivo do que o PLE, já que menos impurezas foram extraídas, de modo que o extrato é obtido mais puro em filantina, como pode ser visto na Figura 17B.

Os extratos de EUT foram cerca de três vezes mais enriquecidos em filantina que os de PLE quando foi usado o etanol 50% como solvente e quase sete vezes maior quando o etanol absoluto foi usado.

Entretanto, no que diz respeito à nirantina, o maior valor encontrado de rendimento por grama de amostra foi para o etanol 50% no método PLE, que foi aproximadamente 6 vezes maior que os valores obtidos no método EUT (Figura 17C). Quando se observa a concentração de lignanas por grama de extrato (Figura 17D), os extratos de PLE são cerca de 4 vezes mais enriquecidos em nirantina do que os extratos obtidos por EUT.

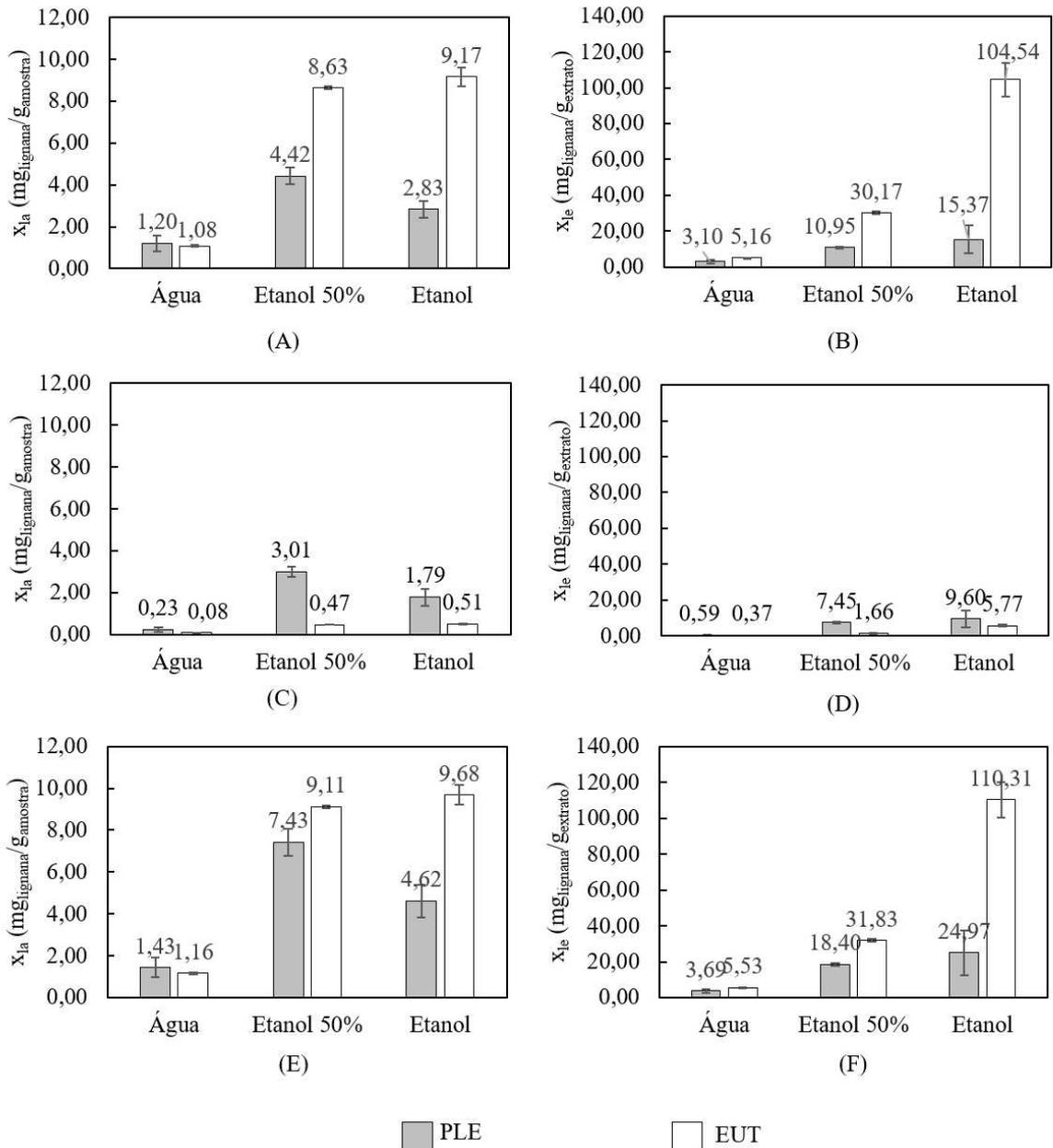


Figura 17. Comparação dos rendimentos de filantina e nirantina obtidos por PLE (valores médios de 35 °C a 80 °C e a 10 MPa) e EUT. Filantina (A) e (B), Nirantina (C) e (D), Soma (E) e (F).

Como a filantina e a nirantina pertencem a uma mesma classe de lignanas, as diarilbutanas, elas têm mesma base estrutural (Figura 2 e Tabela 1) e é difícil propor uma explicação para tal divergência de comportamento pois ambas podem estar interagindo de forma parecida com o solvente. Pode-se supor que a divergência de comportamento das duas lignanas seja pela diferença de polaridade entre elas devido a presença do grupo metoxila na filantina e/ou por uma possível competição pelo solvente. Além disso, a disponibilidade de cada lignana no interior das células pode também estar relacionada com a competição, ou seja, a filantina pode ser de mais fácil acesso para o solvente do que a nirantina no método EUT, devido

aos efeitos da agitação intensa aplicada com o dispersor Ultra-Turrax. No entanto, quando se utilizou o método PLE (que teoricamente melhora as características do solvente para a extração), o contato entre o solvente e a nirantina pode ter sido facilitado, provocando o maior rendimento.

Mudanças de estrutura química resultantes da conversão entre lignanas, ainda que pouco provável, também poderiam explicar as diferenças encontradas. Embora não existam relatos de conversões de filantina para nirantina, nem o contrário, podem ter acontecido transformações dessas duas lignanas em outras que estavam presentes nos extratos, mas que não foram quantificadas, como a 5-demetoxi-nirantina, que difere da nirantina apenas pela ausência do radical metoxi. Essas conversões podem levar a mudanças nas concentrações de nirantina e filantina nos extratos.

Observando a soma dos rendimentos de lignanas por grama de amostra (Figura 17E), o etanol 50% pode ser assumido como o melhor solvente para extrair a maior quantidade de lignanas para ambos métodos, indicando a importância da água e do etanol (como mistura binária) para a extração. Entretanto, se o objetivo é a produção de extratos concentrados, o aumento de etanol na mistura de solventes é recomendado (Figura 17F).

Apesar de o método EUT apresentar maior teor de lignanas (ou seja, ser mais seletivo), ele é um método essencialmente laboratorial, cujo uso se dá costumeiramente para obtenção qualitativa de extratos para análises. Dessa forma, ele não pode ser assumido como melhor método no que diz respeito à ampliação de escala. O método PLE já é utilizado industrialmente, com viabilidade técnica e econômica confirmada para diversos produtos.

Assim, para melhorar o desempenho do método PLE, pode-se fazer algumas sugestões:

- i. Utilização de Etanol em concentrações diferentes (entre 50% e 100%) a fim de se conhecer a região ótima de extração das lignanas por PLE e verificar se, conforme sugerido por Zhang et al. (2007), etanol 70% é o melhor solvente.
- ii. Utilização de um processo sequencial: Tendo em vista os elevados rendimentos e concentrações baixas de lignanas nos extratos de PLE utilizando água como solvente (Tabela 12), essa condição pode ser usada como uma estratégia para remover compostos indesejáveis da amostra, a fim de obter extrato com alta concentração de lignana em outras extrações com etanol. Um processo de extração sequencial com variação de solventes pode ser sugerido.

- iii. Técnicas de pré-tratamento de amostra ou de intensificação de extração, como o uso de ultrassom, podem ser consideradas a fim de aumentar o contato entre o solvente e lignanas.

### 4.3 Extração com fluido supercrítico

#### 4.3.1 Experimentos preliminares

Os testes preliminares de SFE sem cossolvente (SFE1) levaram à definição dos seguintes parâmetros de processo: tempo estático de extração de 20 min e vazão de CO<sub>2</sub> de  $1,5 \cdot 10^{-4}$  kg/s (altura de 50 mm no fluxômetro da unidade de extração).

Nos testes iniciais de cinética de extração (Figura 18), admitiu-se 40 min como o tempo de extração ( $x_0 = 1,25\%$ ), uma vez que neste tempo se consegue extrair mais de 90% da matéria extraível por este método (no tempo final de 100 min,  $x_0 = 1,34\%$ ), tendo um S/F de  $150 \text{ kg}_{\text{solvente}} / \text{kg}_{\text{amostra}}$ .

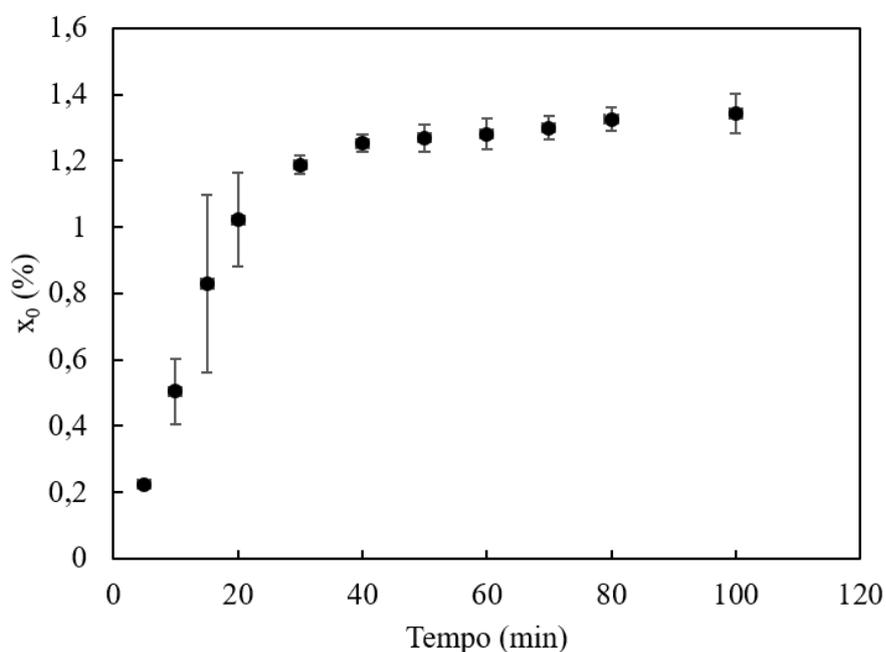


Figura 18. Cinética de extração por SFE1 a partir de *P. amarus* a 40 °C e 10 MPa, com vazão de CO<sub>2</sub> de  $1,75 \cdot 10^{-4}$  kg.s<sup>-1</sup>.

Os testes preliminares de SFE com cossolvente (SFE2) levaram à definição do tempo estático de extração de 5 min e a curva cinética está representada na Figura 19. A partir dos resultados do processo PLE, escolheu-se o etanol 50% como cossolvente nas extrações de SFE2. Este cossolvente foi usado na proporção de 10% (m/m) com o CO<sub>2</sub>. Para que S/F e a vazão do CO<sub>2</sub> no tempo dinâmico fossem mantidas iguais ao processo SFE1, as vazões de

cossolvente foram calculadas (nos tempos estático e dinâmico) e, conseqüentemente, o tempo de extração (~25 min).

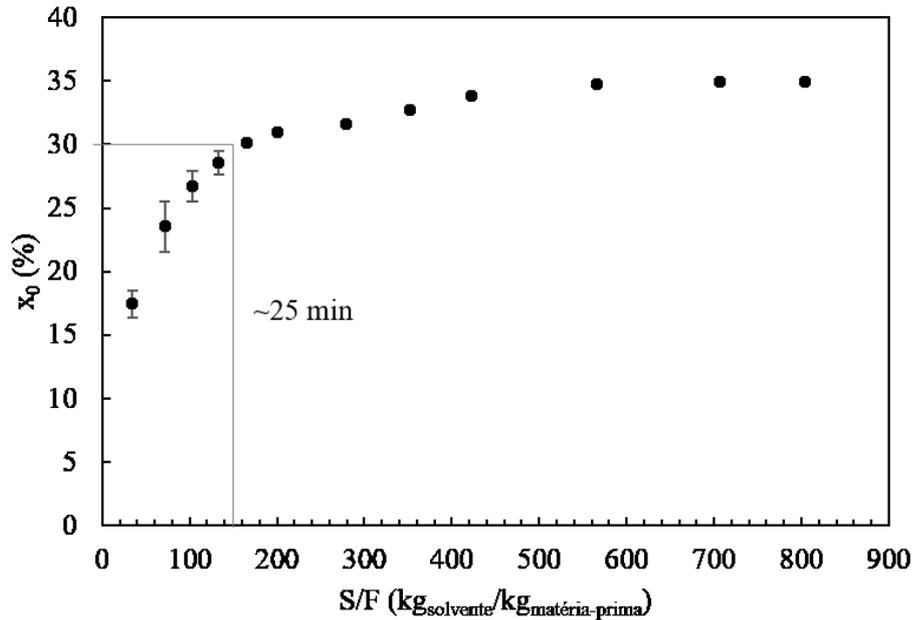


Figura 19. Cinética de extração por SFE2 a partir de *P. amarus*, à 40 °C e 10 MPa, com vazão de CO<sub>2</sub> de 1,79x10<sup>-4</sup> kg/s e vazão de cossolvente de 1,07 mL/min.

#### 4.3.2 Rendimento Global – x<sub>0</sub> (%)

Uma vez definidas as condições de processo para o planejamento através dos testes preliminares, foi possível obter os resultados de rendimento global, apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados de rendimento global por SFE1.

T (°C)	P (MPa)	Densidade CO <sub>2</sub> (kg/m <sup>3</sup> )*	x <sub>0</sub> (%)**
40	10	569	0,98 ± 0,01 <sup>c</sup>
40	20	832	2,35 ± 0,34 <sup>b</sup>
40	30	930	2,78 ± 0,03 <sup>ab</sup>
50	10	379	0,13 ± 0,09 <sup>d</sup>
50	20	766	2,35 ± 0,03 <sup>b</sup>
50	30	882	2,98 ± 0,16 <sup>a</sup>
60	10	294	0,06 ± 0,09 <sup>d</sup>
60	20	698	2,59 ± 0,09 <sup>ab</sup>
60	30	834	3,00 ± 0,01 <sup>a</sup>

\*Densidade do CO<sub>2</sub> calculada pela Equação de estado de Peng-Robinson (PENG; ROBINSON, 1976).\*\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si à 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

É possível perceber que na SFE1 são obtidos rendimentos globais menores do que com os métodos PLE e EUT, mesmo usando mais solvente (já que o S/F da SFE1 é três vezes maior). Enquanto nesses métodos foram utilizados solventes polares (etanol e/ou água), obtendo x<sub>0</sub> de 10 a 40%, a extração utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico resultou em x<sub>0</sub> de 0,1 a 3%,

podendo favorecer à extração de compostos de polaridade intermediária a baixa. Sabe-se que, quando se trabalha com solventes com polaridades diferentes, o maior rendimento global não implica necessariamente em maior capacidade de extração dos compostos de interesse. Além da diferença de rendimento inerente ao método de extração (condições de operação e tecnologia envolvida), há também a influência da massa molar dos compostos extraídos. Compostos polares obtidos com solventes mais polares têm massas molares maiores, o que não significa necessariamente que esses extratos contenham uma variedade maior de compostos.

A análise de variância (ANOVA) revelou que existe efeito dos fatores estudados e da interação entre eles (Relatório D.16 do APÊNDICE D) ( $p < 0,05$ ). Do teste de comparação entre médias (teste Tukey a 5% de probabilidade) (Relatório D.20 do APÊNDICE D), observou-se que os maiores rendimentos globais foram obtidos a 30 MPa para todas as temperaturas e os menores a 10 MPa, sendo que nas temperaturas de 50 e 60 °C, nessa pressão de 10 MPa, os rendimentos foram aproximadamente nulos.

O rendimento aumenta, para cada temperatura, à medida em que se aumenta a pressão. Porém, ao manter a pressão constante, à medida que se aumenta a temperatura, há um comportamento diferente para cada pressão, sem variação de  $x_0$  em alguns casos. Há uma evidente interação entre a pressão e temperatura na influência dos rendimentos (e esse efeito foi verificado na análise estatística), que pode ser visto mais facilmente quando se observa os resultados em função da densidade do CO<sub>2</sub> (Figura 20).

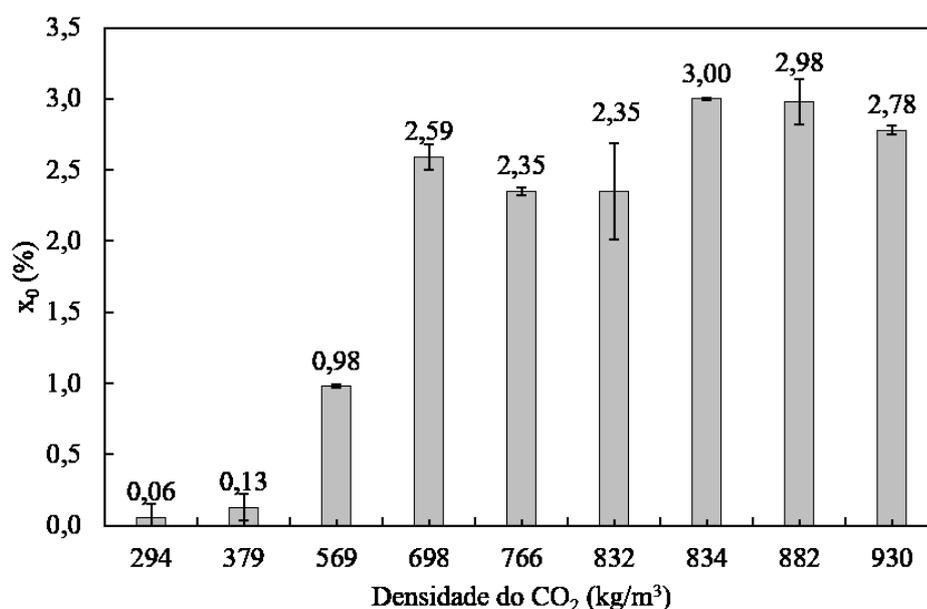


Figura 20. Rendimento global ( $x_0$ ) em função da densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico.

Há um grande aumento em  $x_0$  com a densidade, de 379 a 698 kg/m<sup>3</sup>, mostrando que abaixo de 698 kg/m<sup>3</sup> o potencial máximo de extração por SFE1 não foi alcançado. Acima de

698 kg/m<sup>3</sup> a variação de  $x_0$  é pequena, indicando que o aumento na densidade não modifica o poder de solvatação do CO<sub>2</sub> supercrítico para os compostos presentes na amostra.

A densidade do CO<sub>2</sub> está diretamente associada ao seu poder de solvatação, de modo que quanto maior a densidade, maior o poder de solvatação e maior será o rendimento global, pois uma maior quantidade matéria extraível (e não necessariamente variedade de compostos) será retirada da matriz vegetal. Contudo, a análise dos extratos deve revelar se uma maior quantidade dos compostos de interesse será obtida nas condições de maior rendimento global.

Em relação ao processo de extração com cossolvente, observou-se que os resultados experimentais de rendimento global (Tabela 17) são maiores do que os de SFE1 (variando de 10 a 400 vezes), provavelmente porque a seletividade do fluido supercrítico é reduzida devido à adição do cossolvente.

A ANOVA mostra que a temperatura é um parâmetro importante para o  $x_0$  obtido por SFE2, mas a pressão não (Relatório D24. do APÊNDICE D). Na análise pontual dos tratamentos realizados no experimento pela ANOVA one-way com teste de Tukey para comparação de médias (Relatório D25. do APÊNDICE D), observou-se que o maior  $x_0$  é obtido a 60 °C e 10 MPa, com diferença percentual de 20% ao menor rendimento (em valor absoluto), obtido a 40 °C e 10 MPa. Contudo, as concentrações de lignanas devem ser consideradas na escolha da melhor condição de extração.

Tabela 17. Resultados de rendimento global por SFE2.

T (°C)	P (MPa)	$x_0$ (%)
40	10	33,16 ± 1,39 <sup>c</sup>
40	20	35,42 ± 1,84 <sup>c</sup>
40	30	35,51 ± 0,24 <sup>bc</sup>
50	10	38,90 ± 0,01 <sup>ab</sup>
50	20	34,15 ± 1,17 <sup>c</sup>
50	30	34,08 ± 2,26 <sup>c</sup>
60	10	40,98 ± 0,41 <sup>a</sup>
60	20	37,48 ± 0,00 <sup>abc</sup>
60	30	39,05 ± 1,88 <sup>ab</sup>

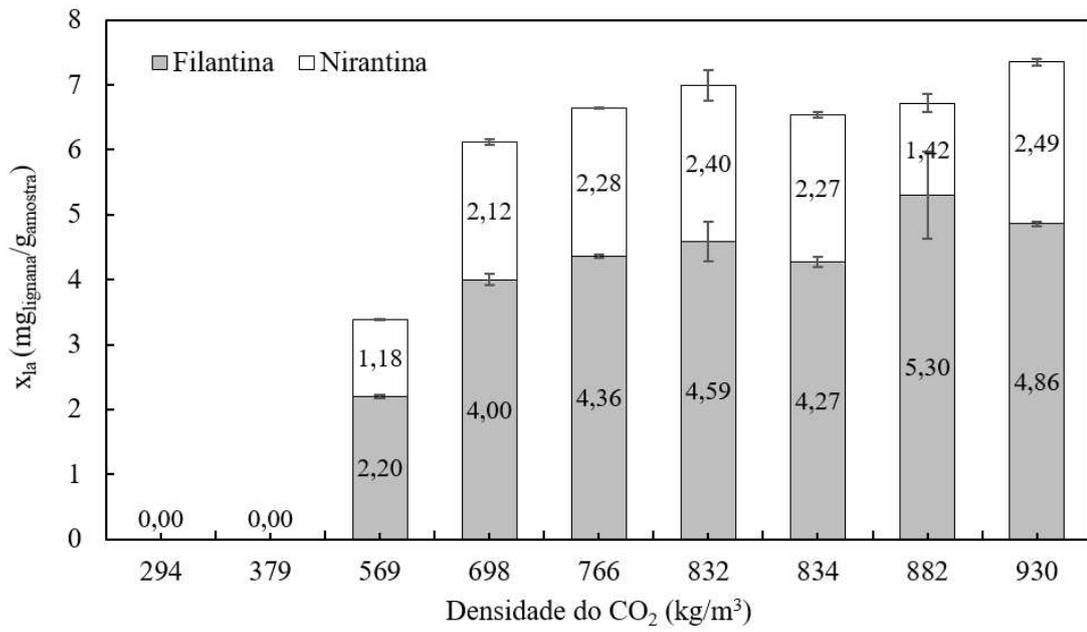
### 4.3.3 Quantificação de Filantina e Nirantina

Os cromatogramas dos extratos analisados por HPLC-DAD e dos padrões de filantina e nirantina encontram-se no APÊNDICE F. Os rendimentos de filantina e nirantina, em termos de amostra e de extrato, são mostrados na Tabela 18, para ambos métodos.

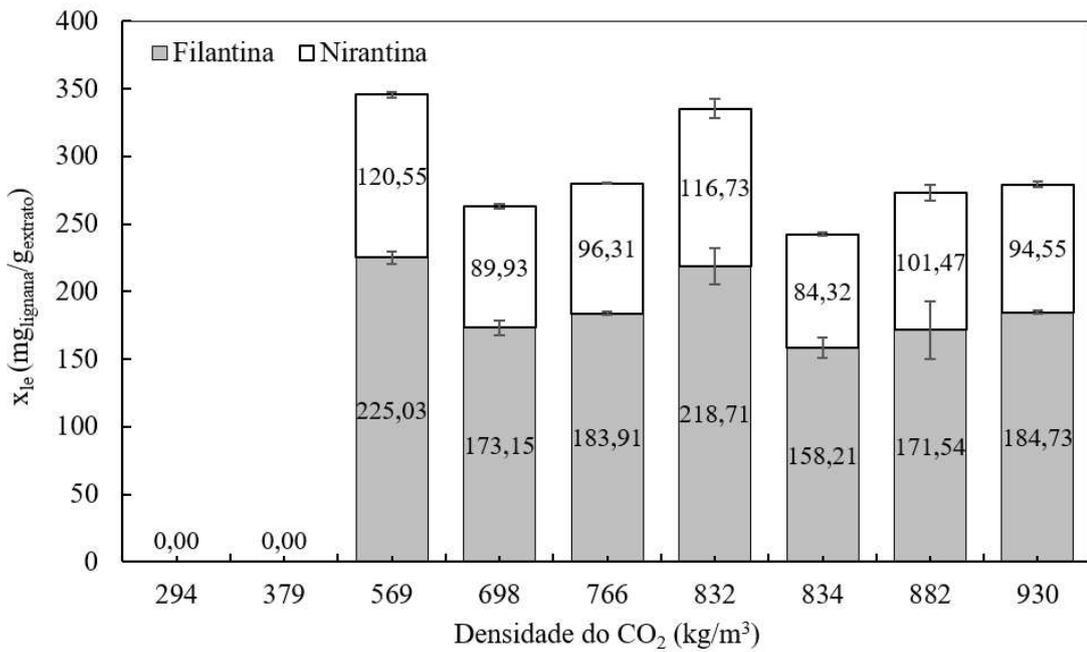
Na análise estatística, verificou-se que a temperatura e a pressão não são significativas para a extração das lignanas por SFE2 ( $p > 0,05$ ) (Relatórios D26 a D28 do APÊNDICES D). Sendo assim, a melhor condição de SFE2 é aquela onde o gasto energético foi mais baixo, isto é, 40 °C e 10 MPa, mesmo que, segundo Adil et al. (2007), se trate de uma condição subcrítica, devido à adição de cossolvente.

A análise estatística de SFE1 envolve uma discussão mais elaborada, já que a temperatura e a pressão foram significativas ( $p < 0,05$ ) (Relatórios D17 a D19. do APÊNDICE D). Da one-way ANOVA de SFE1 (Relatórios D21 a D23 do APÊNDICE D) nota-se que a pior condição para a extração de filantina por grama de amostra é de 40 °C e 10 MPa, uma vez que qualquer outra pressão (20 e 30 MPa) se alcança o dobro de filantina. Na pressão de 10 MPa e temperaturas de 50 e 60 °C não foi possível quantificar as lignanas porque a quantidade de extrato obtido nestas condições foi negligenciável, com  $x_0$  de 0,13 e 0,06%, respectivamente. Para a nirantina, o comportamento foi similar, exceto para a condição de 50 °C e 30 MPa, em que o rendimento foi igual ao obtido a 40 °C e 10MPa.

Observa-se na Figura 21A que a soma dos rendimentos das lignanas por grama de amostra ( $x_{la}$ ) aumenta em função da densidade de CO<sub>2</sub> (que, por sua vez, varia conforme a temperatura e a pressão), mostrando que o aumento no poder de solvatação do solvente leva à extração de mais lignanas. Contudo, quando se analisa a  $x_{le}$ , percebe-se que o incremento de densidade não é acompanhado por um aumento da soma dos rendimentos das lignanas (Figura 21B).



(A)



(B)

Figura 21. Rendimentos de lignanas ( $x_{1a}$  e  $x_{1e}$ ) em função da densidade de CO<sub>2</sub> no método SFE1.

Tabela 18. Resultados experimentais de rendimentos de lignanas em termos de amostra ( $x_{la}$ ) e extrato ( $x_{le}$ ) para os processos SFE1 e SFE2.

<b>SFE sem cossolvente - SFE1</b>								
T (°C)	P (MPa)	S/F	$x_{la}$ (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>amostra</sub> )			$x_{le}$ (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>extrato</sub> )		
			Filantina	Nirantina	Soma	Filantina	Nirantina	Soma
40	10	139,69 ± 0,05	2,20 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,38 ± 0,01 <sup>b</sup>	225,03 ± 4,32 <sup>a</sup>	120,55 ± 2,14 <sup>a</sup>	345,58 ± 6,46 <sup>a</sup>
40	20	155,56 ± 2,76	4,59 ± 0,3 <sup>ab</sup>	2,40 ± 0,23 <sup>a</sup>	7,00 ± 0,53 <sup>a</sup>	218,71 ± 13,62 <sup>a</sup>	116,73 ± 7,39 <sup>a</sup>	335,44 ± 21,02 <sup>a</sup>
40	30	161,91 ± 1,89	4,86 ± 0,04 <sup>ab</sup>	2,49 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,35 ± 0,09 <sup>a</sup>	184,73 ± 1,42 <sup>b</sup>	94,55 ± 2,13 <sup>bc</sup>	279,27 ± 0,71 <sup>b</sup>
50	10	146,17 ± 9,89	nq*	nq	nq	Nq	nq	nq
50	20	156,44 ± 5,60	4,36 ± 0,02 <sup>ab</sup>	2,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,65 ± 0,03 <sup>a</sup>	183,91 ± 0,99 <sup>b</sup>	96,31 ± 0,31 <sup>bc</sup>	280,23 ± 0,69 <sup>b</sup>
50	30	153,99 ± 7,93	5,30 ± 0,67 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,14 <sup>b</sup>	6,73 ± 0,80 <sup>a</sup>	171,54 ± 21,41 <sup>b</sup>	101,47 ± 5,63 <sup>b</sup>	273,01 ± 15,79 <sup>b</sup>
60	10	142,88 ± 1,90	nq	nq	nq	Nq	nq	nq
60	20	149,75 ± 3,36	4,00 ± 0,09 <sup>b</sup>	2,12 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,12 ± 0,04 <sup>a</sup>	173,15 ± 5,29 <sup>b</sup>	89,93 ± 1,69 <sup>cd</sup>	263,08 ± 6,98 <sup>bc</sup>
60	30	152,87 ± 2,85	4,27 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,27 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,54 ± 0,03 <sup>a</sup>	158,21 ± 7,47 <sup>b</sup>	84,32 ± 1,36 <sup>d</sup>	242,53 ± 8,83 <sup>c</sup>
<b>SFE com cossolvente - SFE2</b>								
T (°C)	P (MPa)	S/F	$x_{la}$ (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>amostra</sub> )			$x_{le}$ (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>extrato</sub> )		
			Filantina	Nirantina	Soma	Filantina	Nirantina	Soma
40	10	141,67 ± 8,34	7,88 ± 0,74 <sup>a</sup>	4,48 ± 0,58 <sup>a</sup>	12,36 ± 1,32 <sup>a</sup>	23,73 ± 1,23 <sup>a</sup>	13,48 ± 1,18 <sup>a</sup>	37,21 ± 2,41 <sup>a</sup>
40	20	152,75 ± 6,57	8,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,73 ± 0,01 <sup>a</sup>	12,92 ± 0,03 <sup>a</sup>	23,14 ± 1,24 <sup>a</sup>	13,38 ± 0,73 <sup>a</sup>	36,53 ± 1,97 <sup>a</sup>
40	30	150,76 ± 4,37	7,96 ± 0,09 <sup>a</sup>	4,46 ± 0,08 <sup>a</sup>	12,42 ± 0,17 <sup>a</sup>	22,41 ± 0,10 <sup>a</sup>	12,57 ± 0,14 <sup>a</sup>	34,98 ± 0,25 <sup>a</sup>
50	10	132,98 ± 7,26	9,20 ± 1,38 <sup>a</sup>	5,19 ± 0,55 <sup>a</sup>	14,39 ± 1,93 <sup>a</sup>	23,64 ± 3,53 <sup>a</sup>	13,35 ± 1,41 <sup>a</sup>	36,99 ± 4,95 <sup>a</sup>
50	20	144,68 ± 6,84	7,78 ± 1,52 <sup>a</sup>	4,52 ± 1,05 <sup>a</sup>	12,30 ± 2,58 <sup>a</sup>	22,87 ± 5,25 <sup>a</sup>	13,30 ± 3,54 <sup>a</sup>	36,16 ± 8,79 <sup>a</sup>
50	30	144,69 ± 0,59	8,58 ± 0,25 <sup>a</sup>	4,78 ± 0,16 <sup>a</sup>	13,37 ± 0,41 <sup>a</sup>	25,27 ± 2,42 <sup>a</sup>	14,08 ± 1,40 <sup>a</sup>	39,35 ± 3,82 <sup>a</sup>
60	10	136,22 ± 11,67	7,76 ± 0,25 <sup>a</sup>	4,31 ± 0,06 <sup>a</sup>	12,07 ± 0,31 <sup>a</sup>	18,93 ± 0,42 <sup>a</sup>	10,52 ± 0,05 <sup>a</sup>	29,45 ± 0,46 <sup>a</sup>
60	20	145,33 ± 9,65	7,96 ± 0,70 <sup>a</sup>	4,46 ± 0,49 <sup>a</sup>	12,41 ± 1,20 <sup>a</sup>	21,23 ± 1,88 <sup>a</sup>	11,89 ± 1,32 <sup>a</sup>	33,13 ± 3,19 <sup>a</sup>
60	30	156,23 ± 23,40	6,49 ± 2,67 <sup>a</sup>	3,68 ± 1,34 <sup>a</sup>	10,17 ± 4,01 <sup>a</sup>	16,81 ± 7,65 <sup>a</sup>	9,51 ± 3,90 <sup>a</sup>	26,31 ± 11,55 <sup>a</sup>

\*nq = não-quantificável. Médias seguidas de mesma letra nas colunas em cada método não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Comparando  $x_{1a}$  entre os métodos, observa-se que SFE2 tem os melhores resultados, sendo aproximadamente duas vezes a soma de SFE1. Isso significa que a adição de cossolvente foi favorável para a extração de uma maior quantidade de lignanas da amostra. Um resultado similar foi obtido por Kim et al. (1999) ao estudar a extração de lignanas de *Schisandra chinensis* por SFE com 10% de cossolvente (etanol). No entanto, o método SFE1 é um método mais seletivo, pois apresenta extratos mais puros em lignanas. Analisando  $x_{1e}$  de SFE1 os resultados variaram de 242-345 mg/g, enquanto que para o método SFE2 foram 26-39 mg/g. Em termos percentuais (Figura 22) para o método SFE1 foi obtido 25-35%, enquanto que para SFE2 foi de apenas 2,6 a 3,9%. Isso significa que os extratos SFE1 são, em média, dez vezes mais enriquecidos do que os extratos SFE2.

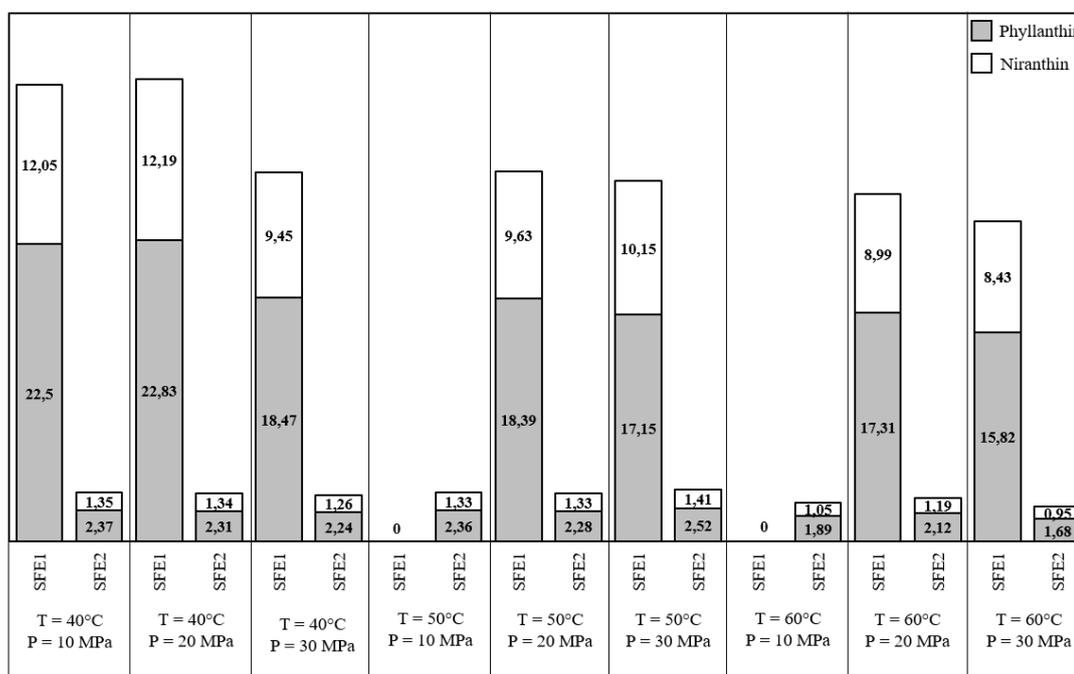


Figura 22. Percentual de cada lignana nos extratos para SFE1 e SFE2.

O extrato mais enriquecido em lignanas foi o obtido a 40 °C e 10 MPa (569 kg/m<sup>3</sup>, menor densidade de CO<sub>2</sub> com resultados quantificáveis de  $x_{1a}$  e  $x_{1e}$ ) e 40 °C e 20 MPa (832 kg/m<sup>3</sup>, densidade intermédia de CO<sub>2</sub>), em que a soma dos teores de filantina e nirantina é de cerca de 35%. Para este caso, uma análise de custo é necessária, a fim de avaliar se o aumento de pressão de 10 para 20 MPa é economicamente viável em comparação com a obtenção do dobro do rendimento global e  $x_{1a}$ .

#### 4.4 Avaliação Econômica dos processos de extração

A partir dos resultados de  $x_{1a}$  e  $x_{1e}$  de todos os processos estudados, definiu-se que as melhores condições foram:

##### Para PLE

Como a temperatura foi não-significativa, foi escolhida a menor do intervalo estudado (35 °C). Quanto ao solvente, o etanol 50% obteve os maiores rendimentos por grama de amostra ( $x_{1a}$ ), mas os extratos obtidos com etanol absoluto foram mais puros. Assim, as condições avaliadas na análise de custo foram:

- 35 °C, 10 MPa e etanol 50%,  $S/F = 46 \text{ kg}_{\text{solvente}}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ ,  $x_0 = 33,15\%$ ,  $x_{1a} = 6,92 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{amostra}}$ ;  $x_{1e} = 19,16 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ .
- 35 °C, 10 MPa e etanol absoluto,  $S/F = 46 \text{ kg}_{\text{solvente}}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ ,  $x_0 = 10,92\%$ ,  $x_{1a} = 4,17 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{amostra}}$ ;  $x_{1e} = 41,72 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ .

##### Para SFE1

Os extratos mais puros foram obtidos na menor temperatura (40 °C) e pressões de 10 e 20 MPa. A análise de custo permitirá avaliar se é viável aumentar a pressão para se conseguir o dobro de rendimento global, mantendo a concentração das lignanas.

- 40 °C, 10 MPa,  $S/F = 150 \text{ kg}_{\text{solvente}}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ ,  $x_0 = 0,98\%$ ,  $x_{1a} = 3,38 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{amostra}}$ ;  $x_{1e} = 345 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ .
- 40 °C, 20 MPa,  $S/F = 150 \text{ kg}_{\text{solvente}}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ ,  $x_0 = 2,35\%$ ,  $x_{1a} = 7,00 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{amostra}}$ ;  $x_{1e} = 335 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ .

##### Para SFE2

Não existem efeitos da pressão e da temperatura no intervalo estudado no processo de SFE com cossolvente. Assim, a condição de menor gasto energético foi a seguinte:

- 40 °C, 10 MPa, Cossolvente: etanol 50%, percentual de cossolvente: 10%,  $S/F = 150 \text{ kg}_{\text{solvente}}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ ,  $x_0 = 33,16\%$ ,  $x_{1a} = 12,36 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{amostra}}$ ;  $x_{1e} = 37,21 \text{ mg}_{\text{lignana}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ .

O custo de manufatura (COM) foi calculado para as melhores condições de cada processo (Figura 23). O COM obtido neste trabalho é maior do que os encontrados por outros autores (CARVALHO et al., 2015; OSORIO-TOBÓN et al., 2014; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012a; ZABOT et al., 2015) para outros produtos. Por exemplo, Carvalho et al. (2015) estudaram a extração de cúrcuma (*Curcuma longa L.*) e óleo de ar-turmerona por SFE e o menor COM obtido foi de US\$ 164,4/kg de extrato à 60 °C e 25 MPa, com  $S/F = 1,31$  para

um extrator de 50 L. Para esta condição, o  $x_0$  foi de 6,4%, e a concentração de ar-turmerona (composto bioativo) foi de quase 16% nos extratos. Entretanto, Veggi (2013) também obteve valores altos de COM (entre US\$ 890,00-5900,00/kg) na SFE (sem solvente) de compostos fenólicos de plantas brasileiras (S/F = 50), quando utilizou um extrator de 50L.

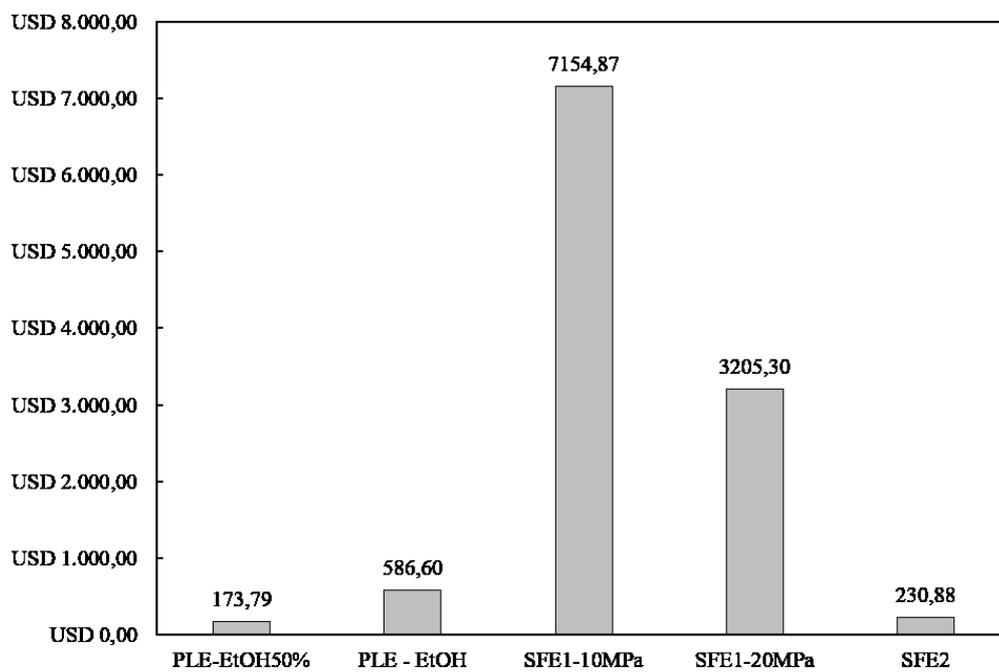


Figura 23. Custos de Manufatura (COM) para cada processo estudado.

Há, principalmente, dois fatores responsáveis pelo maior custo encontrado neste trabalho. Em primeiro lugar, para todos os experimentos, foram utilizados valores mais elevados de S/F, sobretudo nos experimentos de SFE. Portanto, uma maior quantidade de solvente foi utilizada para obter os extratos. Assim, os custos operacionais relacionados a recirculação do CO<sub>2</sub> (resfriamento, aquecimento e compressão) foram maiores do que em outras simulações.

O outro fator é o alto custo da matéria-prima, que tem impacto significativo no COM, conforme também observado por Veggi (2013). Pode-se observar (Figura 24) que o CRM (custo de matéria-prima) é responsável por mais de 90% do COM em todos os casos. Na SFE2, a planta seca e moída representa 67,91% do CRM (APÊNDICE G), enquanto nas condições de PLE avaliadas representa acima de 86% da CRM. Essa diferença é devida ao custo do CO<sub>2</sub>, que é quase duas vezes maior do que o etanol e água (Tabela 10), fazendo com que a participação da quebra-pedra na CRM diminua no processo SFE. Logo, é evidente que o custo de aquisição da planta seca e moída tem uma importante contribuição para o COM, tal como

também foi observado por outros autores (ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2012; LEAL et al., 2010; VEGGI et al., 2014; VIEIRA et al., 2013)

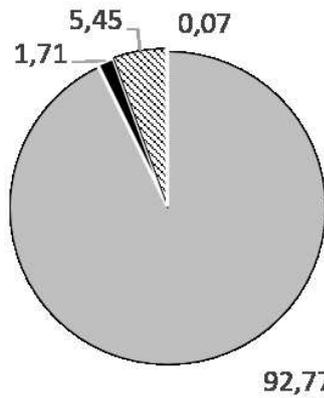
Geralmente se considera que o custo de investimento inicial é uma das desvantagens dos métodos de extração com fluidos pressurizados, e assim é atribuída ao FCI (Fixed Capital Investment) a maior contribuição ao COM. Porém, isso só é verdade quando o CRM é muito pequeno, como quando se trabalha com reaproveitamento de resíduos agroindustriais, nos quais o custo de aquisição do material de trabalho (amostra) é desprezado. A planta *P. amarus* não se encaixa nessa categoria de matéria-prima e as informações de seu custo são escassas, portanto imprecisas. Durante a pesquisa por fornecedores a maioria das lojas on-line encontradas eram varejistas com partes aéreas de *P. amarus* vendidas por até US\$ 75,98/kg, fazendo os custos serem ainda maiores (Tabela 19) do que os que foram apresentados na Figura 23, embora os percentuais dos componentes do COM não tenham sofrido grande alteração percentual.

Os aspectos agronômicos também devem ser levados em consideração quanto ao custo de aquisição da planta seca e moída. O uso de fertilizantes e outros agentes químicos é condenável devido à ausência de produtos registrados para plantas medicinais, conforme exigência legal, e pelas alterações que tais produtos podem ocasionar aos princípios ativos. Assim, o controle de pragas e doenças da planta geralmente é feito pela adoção de tecnologias agroecológicas (como inserção de barreiras de vento; uso de cobertura de solo, de adubação verde com coquetel de leguminosas) e/ou uso de pesticidas naturais. Isso afeta a produtividade e, conseqüentemente, o custo de produção. Outros fatores importantes são a densidade de plantio e resposta da planta a variações ambientais.

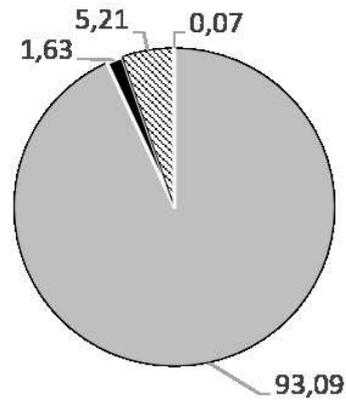
Tabela 19. Custo de Manufatura (COM) e seus componentes calculados para a planta seca e moída com custo de US\$75,98/kg

Processo	COM (US\$/kg)	CRM (%)	COL (%)	FCI (%)	CUT (%)
PLE-Etanol50%	257,65	95,03	1,25	3,67	0,05
PLE-Etanol	838,77	95,07	1,24	3,64	0,05
SFE1-10 MPa	9850,99	95,92	1,05	2,8	0,23
SFE1-20 MPa	4399,32	95,92	1,04	2,78	0,26
SFE2	323,15	95,31	0,99	3,42	0,28

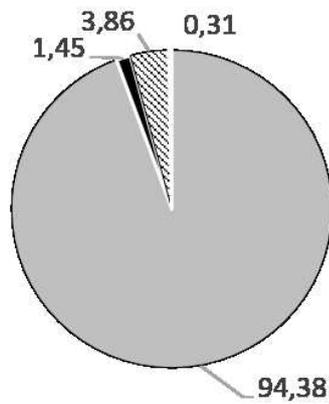
Custo de matéria-prima (CRM); Custo de mão-de-obra operacional (COL); Capital de investimento fixo (FCI); Custo de utilidades (CUT).



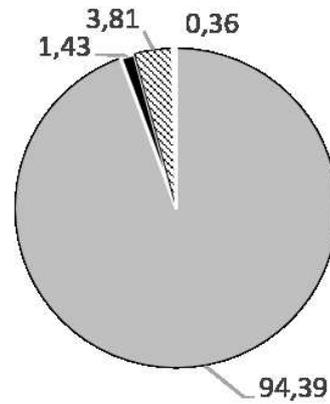
(a) PLE (35°C, 10 MPa, EtOH50%)



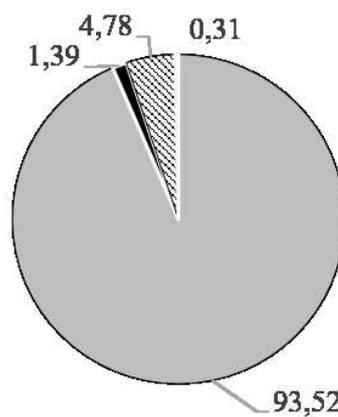
(b) PLE (35°C, 10 MPa, 100% EtOH)



(c) SFE1 (40°C, 10 Mpa)



(d) SFE1 (40°C, 20 Mpa)



(e) SFE2 (40°C, 10 MPa, 50% EtOH)

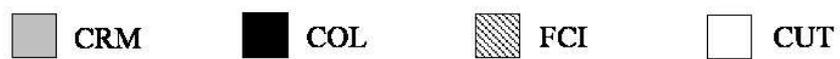


Figura 24. Componentes do custo de manufatura (COM) para as condições ótimas de cada processo. Custo de matéria-prima (CRM); Custo de mão-de-obra operacional (COL); Capital de investimento fixo (FCI); Custo de utilidades (CUT).

Uma preocupação adicional em relação a esses fornecedores é que eles muitas vezes identificam o produto como “folhas de quebra-pedra” e este nome está relacionado às espécies *P. amarus* e *P. niruri*, ficando difícil saber com qual matéria-prima se está trabalhando, uma vez que essas plantas são muito parecidas. Apenas um fornecedor atacadista foi encontrado, a TROPILAB ([www.tropilab.com](http://www.tropilab.com)), exportadora de plantas e sementes tropicais, com diversas faixas de valores para determinadas quantidades de material. Por exemplo, 100 lb (~45 kg) de plantas custam US\$ 2193,95, o que dá US\$ 48,39/kg, que foi o valor utilizado no trabalho.

Comparando os processos estudados, percebe-se (Figura 23) que o menor COM (US\$ 173,79/kg) foi obtido por PLE-Etanol50%, seguido do SFE2 (US\$ 230,88/kg). Isso ocorre porque o COM é inversamente proporcional à massa de extrato produzido, então quanto maior o rendimento global, menor o custo do processo. A diferença percentual entre o COM de SFE2 e o de PLE-Etanol50% é de 24% porque, no primeiro caso, se usou cerca de 3 vezes mais solvente do que no segundo. Entretanto, para os processos de SFE1 também se utilizou 3 vezes mais solvente que na PLE-Etanol50%, e o COM foi cerca de 41 e 18 vezes maior para SFE1-10MPa e SFE1-20MPa, respectivamente. As razões entre os valores calculados de COM de cada processo estão apresentadas na Tabela 20 e as razões entre as concentrações de lignanas dos extratos para cada um dos processos estão apresentadas na Tabela 21.

Tabela 20. Razão entre os valores de COM de cada processo

Denominador	Numerador				
	PLE-EtOH50%	PLE - EtOH	SFE1-10MPa	SFE1-20MPa	SFE2
PLE-EtOH50%	1,00	3,38	41,17	18,44	1,33
PLE - EtOH	0,30	1,00	12,20	5,46	0,39
SFE1-10MPa	0,02	0,08	1,00	0,45	0,03
SFE1-20MPa	0,05	0,18	2,23	1,00	0,07
SFE2	0,75	2,54	30,99	13,88	1,00

Tabela 21. Razão entre as somas das concentrações das lignanas para cada processo

Denominador	Numerador				
	PLE-EtOH50%	PLE - EtOH	SFE1-10MPa	SFE1-20MPa	SFE2
PLE-EtOH50%	1,00	2,17	17,97	17,45	1,94
PLE - EtOH	0,46	1,00	8,27	8,03	0,89
SFE1-10MPa	0,06	0,12	1,00	0,97	0,11
SFE1-20MPa	0,06	0,12	1,03	1,00	0,11
SFE2	0,52	1,12	9,27	9,00	1,00

Ente os processos de PLE, observa-se que o uso de etanol absoluto faz o COM ser três vezes maior, porque o custo de etanol é maior do que o da água. Além disso, a concentração

das lignanas é apenas o dobro para o caso do etanol absoluto (Tabela 21), tornando o uso da mistura binária mais viável.

Os processos de SFE1 obtiveram os maiores COM, de US\$ 7154,87/kg para SFE1-10 MPa e US\$ 3205,30/kg para SFE1-20 MPa. No caso do processo realizado a 10 MPa, tem-se o menor  $x_0$ . Ao aumentar a pressão para 20 MPa o  $x_0$  duplica e o COM é reduzido à metade. Esse resultado evidencia a maior influência do rendimento global no COM em comparação com o gasto energético provocado pelo aumento de pressão. Além disso, nessas duas condições foram obtidas as maiores concentrações de lignana por grama de extrato, o que implica que o processo SFE1 a 20 MPa é o melhor entre os dois e o SFE1 a 10 MPa é o menos vantajoso entre todos os avaliados.

O processo SFE2-10 MPa apresentou COM de US\$ 230.88/kg, que é 14-31 vezes menor do que os processos SFE1. Este resultado é devido ao processo de SFE2 ter rendimento global tão alto quanto a PLE. Além disso, o custo do etanol é quase metade do custo de CO<sub>2</sub>. Portanto, a utilização de etanol como cossolvente contribui para tornar menos dispendioso o processo, bem como permitindo a extração de uma maior quantidade de lignanas por grama de matéria-prima ( $x_{1a}$ ). Resultado similar foi encontrado por Veggi (2013) ao utilizar etanol e água como cossolventes no processo de SFE de diversas plantas, sendo que em uma delas a redução foi de 95% do COM. Porém, conforme visto nas seções de quantificação das lignanas para todos os processos (Seções 4.2.4 e 4.3.3), quanto maior o rendimento global, menor a seletividade.

O COM da SFE1-20 MPa é cerca de 14 vezes mais elevado do que o da SFE2 e 18 vezes o de PLE-Etanol50%. No entanto, a concentração de lignanas do extrato SFE1-20 MPa é nove vezes maior do que o SFE2 e 17 vezes a de PLE-Etanol50%.

Assim, a relação entre custos e concentração de lignanas se equilibra entre os processos, uma vez que é preferível obter um extrato mais rico em lignanas que minimize etapas posteriores de purificação e de isolamento, que são consideradas dispendiosas, mesmo que no caso do PLE-Etanol50% se utilize um terço da quantidade de solvente dos outros processos.

Os resultados do custo de manufatura também podem ser expressos por grama de lignana extraída (COM-lig), apenas dividindo o COM (US\$/kg<sub>extrato</sub>) pelo  $x_{le}(g_{lignana}/kg_{extrato})$  (Figura 25).

Para SFE1, trabalhar a 20 MPa reduz o COM-Lig a metade. Assim,  $x_0$  e  $x_{1a}$  baixos têm maior impacto sobre a COM do que a energia necessária para recomprimir o solvente. Em relação ao PLE, o custo para se obter cada grama de lignana é menor quando se usa a mistura, porque o preço do etanol é maior do que o da água. É possível perceber também que os custos

para SFE1-20 MPa, SFE2 e PLE-EtOH50% são próximos, o que reforça a viabilidade do processo SFE1-20MPa, que obtém os extratos mais enriquecidos.

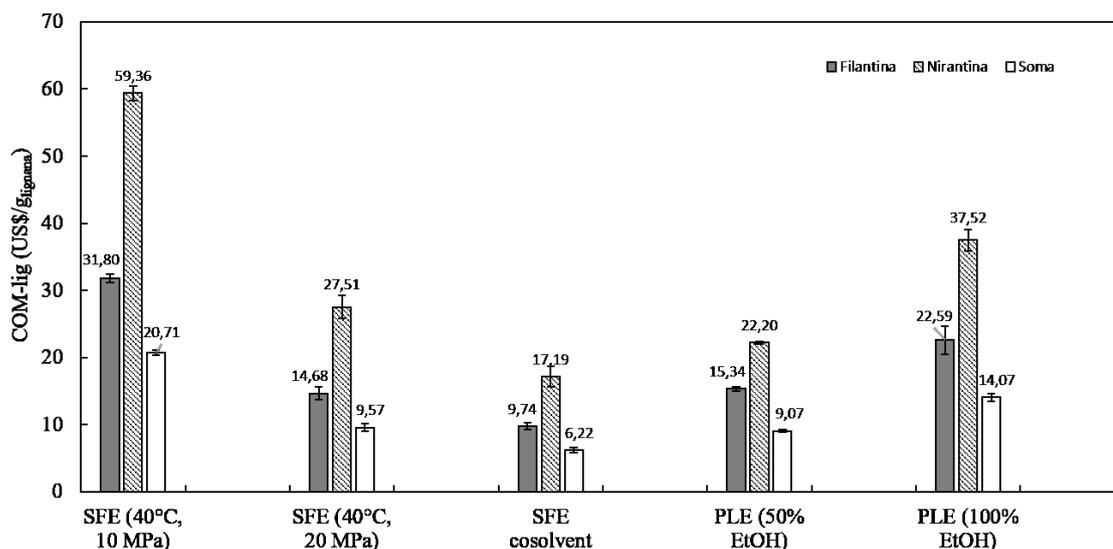


Figura 25. Custo de manufatura calculado por grama de lignana extraída (COM-Lig) para cada processo.

É necessário considerar ainda que outras lignanas já reportadas para esta espécie podem estar presentes nos extratos de SFE, tornando-os ainda mais enriquecidos. Pensando nisso foi realizada uma análise cromatográfica por CG-EM nos extratos de SFE1-20MPa e SFE2-10MPa (Figuras 26 e 27). Os resultados mostraram que todas as lignanas que estão presentes nos extratos de PLE e UT (Figura 16 e Tabela 14) estão também presentes nos extratos de SFE1-20MPa e SFE2-10MPa, com exceção da filtetralina (pico 4) que não aparece em SFE1-20MPa. Além disso, os picos A, B, C e D (Fragmentogramas no APÊNDICE E) que aparecerem nos cromatogramas, podem ser outras lignanas, em função da fragmentação obtida. Portanto, a concentração de lignanas nos extratos é maior do que o que foi possível quantificar no atual trabalho, confirmando a riqueza do produto obtido pelos processos estudados, mas revelando a necessidade futura de realizar a quantificação de tais compostos.

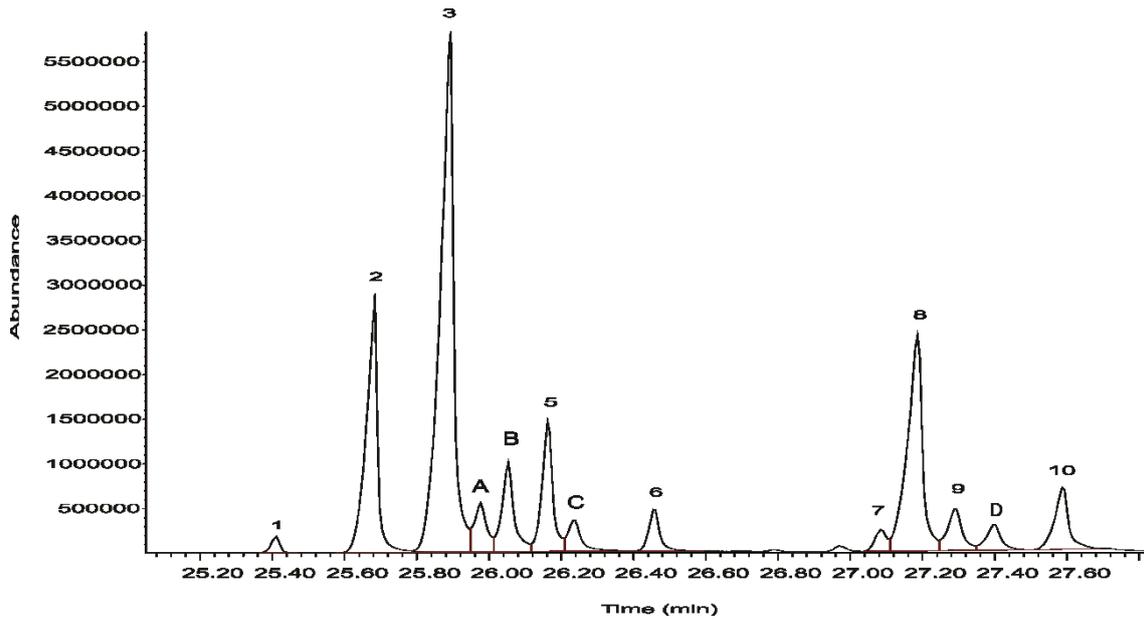


Figura 26. Janela expandida do cromatograma do extrato de *P. amarus* obtido por SFE1, a 40 °C e 20 MPa e analisado por GC/MS. Os números em cada pico correspondem a: lignana 386 (1); 5-demetoxi-nirantina (2); filantina (3); 5-demetoxi-nirtetralina (5); nirtetralina (6); hipofilantina (7); nirantina (8); e lignana 430 (9); lignana 370 (10). Os picos A, B, C e D correspondem a lignanas ausentes nos cromatogramas de PLE e EUT.

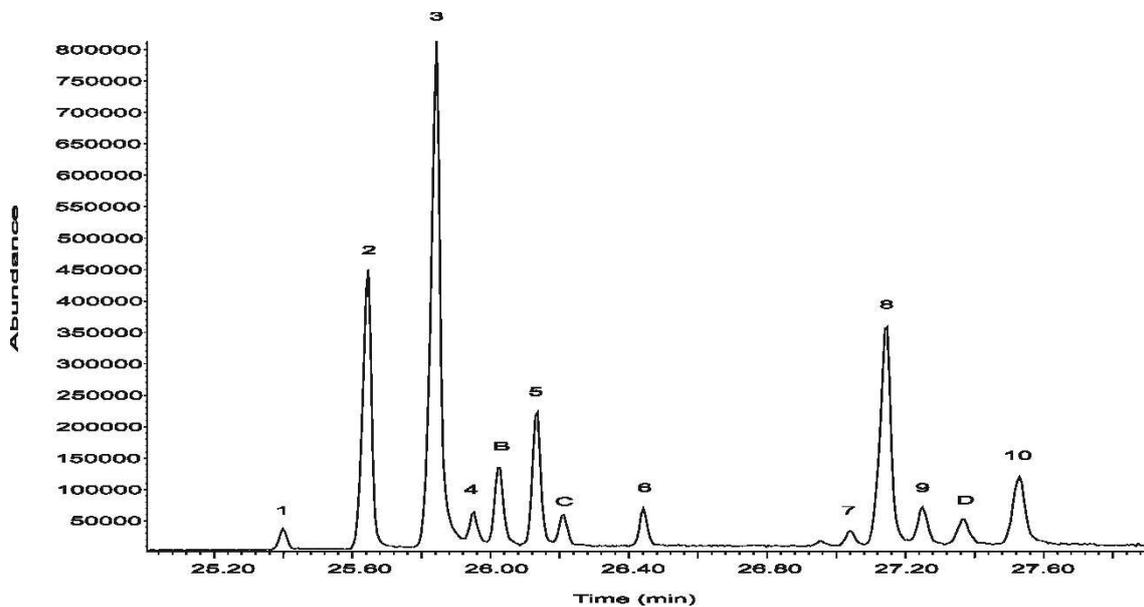


Figura 27. Janela expandida do cromatograma do extrato de *P. amarus* obtido por SFE2, a 40 °C e 10 MPa e analisado por GC/MS. Os números em cada pico correspondem a: lignana 386 (1); 5-demetoxi-nirantina (2); filantina (3); filtetralina (4); 5-demetoxi-nirtetralina (5); nirtetralina (6); hipofilantina (7); nirantina (8); e lignana 430 (9); lignana 370 (10). Os picos B, C e D correspondem a lignanas ausentes nos cromatogramas de PLE e EUT.

## 5 CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, pode-se concluir que é possível extrair lignanas a partir de *P. amarus* pelos métodos empregados e obter sete lignanas já identificadas por GC-MS, entre elas a filantina e a nirantina, que podem ser quantificadas por HPLC pelo método apresentado.

No método PLE, a temperatura não é um fator significativo, então temperaturas baixas podem ser empregadas para realizar o processo, economizando energia.

A mistura binária de água e etanol foi considerada o melhor solvente para obter maiores quantidades das lignanas filantina e nirantina pelos métodos PLE e EUT. Contudo, o uso de etanol puro como solvente no método EUT leva a um extrato mais enriquecido em filantina.

Em relação aos processos de SFE, verificou-se que a temperatura e a pressão são parâmetros importantes para a extração de lignanas por SFE1, mas não por SFE2. Portanto, para SFE2 a condição de menor temperatura e pressão pode ser assumida como a melhor em termos de menor gasto energético, obtendo os mesmos rendimentos das outras condições.

Ainda nas extrações supercríticas, observou-se que a utilização de etanol 50% (v/v) como cossolvente proporcionou um aumento na quantidade de lignanas obtidas a partir das partes aéreas de *P. amarus*, mas diminuiu a seletividade do processo, já que a concentração de lignanas no extrato ficou entre 2,5 e 4,0%, enquanto em SFE1 foi de 25 a 35%.

Da análise econômica verificou-se que a PLE é uma técnica menos dispendiosa, com altos rendimentos, mas com extratos com baixa concentração de lignanas. Os processos de SFE com cossolvente aumentam a pureza dos extratos, mas também os custos. Já quando se utilizou SFE sem cossolvente, foram obtidos rendimentos baixos, provocando elevados valores de Custo de Manufatura (COM). No entanto, na melhor condição de SFE1 se obtém extratos 9 e 17 vezes mais puros que os obtidos nas melhores condições de SFE2 e PLE, respectivamente.

Além de verificar a viabilidade técnica e fornecer informações iniciais a cerca da viabilidade econômica dos processos extração de filantina e nirantina a partir de *P. amarus*, esse trabalho proporcionou indagações interessantes para possíveis novos trabalhos que venham a ser realizados por nosso grupo de pesquisa.

## 6 DIFICULDADES ENCONTRADAS

Diversos obstáculos surgiram no decorrer da realização deste trabalho, que prejudicaram ou adiaram a obtenção dos resultados, tais como:

- i. A demora no processo de obtenção de orçamentos e compra de equipamentos e peças que compõem a unidade de extração, bem como a montagem da unidade de extração e os testes iniciais para verificação de vazamento nas conexões de tubulação;
- ii. Durante os experimentos de extração aconteceram diversos vazamentos nas “gaxetas” (vedação de teflon) das células de 50 mL e 100 mL, que culminaram na troca de célula para os últimos experimentos. Nos processos de SFE2 foram utilizadas as células de 10 mL cuja vedação era metal-metal;
- iii. Na análise de custos, o objetivo foi apresentar um custo geral para auxiliar na escolha do melhor método de extração, por isso foi utilizado apenas um aumento de escala (50 L). Além disso, como as cinéticas de extração não estariam disponíveis no trabalho, não se avaliou ponto a ponto a viabilidade econômica.
- iv. Agenda de utilização da unidade de extração do LAPEA e de todos os equipamentos usados em laboratórios parceiros;
- v. A adequação de metodologia para preparo das amostras a serem analisadas por cromatografia gasosa e, posteriormente a mudança de método da análise cromatográfica para HPLC-DAD. Com a mudança de método, o monitoramento/quantificação das lignanas presentes no extrato passou a ser apenas da filantina e nirantina, por serem os únicos padrões disponíveis no laboratório;
- vi. A não-utilização do método sequencial de extração para separação das lignanas: Uma das propostas do trabalho era obter condições diferentes que favorecessem o enriquecimento do extrato em lignanas diferentes, de modo que alguma separação fosse realizada já na etapa de extração. Entretanto, por terem estruturas parecidas, as lignanas se apresentavam em todos os cromatogramas dos extratos analisados por CG-EM e os percentuais de área relativas não mudavam entre os diferentes cromatogramas. Com a mudança de método de análise, ficou ainda mais difícil verificar alguma condição que favorecesse uma das lignanas porque a filantina sempre era extraída em maior quantidade do que a nirantina.
- vii. Cinéticas de extração foram realizadas para as melhores condições (aquelas utilizadas nas análises de custo), mas apenas os resultados de rendimento global ficaram satisfatórios. Como a massa obtida de extrato em cada alíquota coletada por

tempo era muito pequena para os casos de SFE1 e SFE2 não foi possível quantificar os compostos de interesse. Assim, optou-se por não apresentar dados incompletos de cinética;

- viii. Outra proposta era realizar um teste de atividade esquistosomicida que não foi concluído até o momento de impressão desse texto, por problemas de agenda do laboratório parceiro.

Entretanto, todas estas adversidades foram importantes para o meu desenvolvimento profissional, sobretudo no que diz respeito ao entendimento de que nem todas as variáveis podem ser controladas pelo pesquisador e que algumas concessões devem ser feitas para o melhor andamento do trabalho.

## 7 PERSPECTIVAS

Ainda há muito que investigar nos processos de extração a partir de *P. amarus*, como:

- i. A utilização de outros percentuais de etanol entre 50 e 100% no processo de PLE. A condição de etanol 50% levou a rendimentos globais maiores e maior quantidade de lignanas retiradas da matéria-prima, enquanto o uso de etanol absoluto apresentou menor rendimento, mas com maior concentração de lignanas no extrato. Então, o uso de percentuais intermediários pode unir o objetivo de manter a quantidade de lignanas retiradas da amostra e aumentar a concentração de lignanas nos extratos;
- ii. O uso de outros percentuais de cossolvente no SFE abaixo de 10% (m/m) ou outros cossolventes baseados na sugestão i, para verificar a influência nos rendimentos alcançados;
- iii. A quantificação das outras lignanas presentes nos extratos, como hipofilantina e filtetralina, que apresentam algumas atividades biológicas já reportadas;
- iv. Investigação de atividades biológicas que já são comumente descritas para extratos e frações de *P. amarus* (como atividade anti-inflamatória e atividade hepatoprotetora), com o intuito de averiguar se a tecnologia empregada (PLE e SFE) interfere na atividade biológica;
- v. Avaliação do acoplamento de outros processos, compondo um único processo de extração sequencial no mesmo leito a fim de otimizar a capacidade da matéria-prima em fornecer compostos bioativos de interesse, além de lignanas. Nesse último caso, pode-se sugerir que uma primeira etapa seja composta de SFE a 20 MPa e 40 °C para obtenção do extrato mais puro em lignanas. Em seguida pode ser realizada uma etapa de PLE utilizando água como solvente, a 35 °C e 10 MPa, que corresponde a extratos de *P. amarus* pobres em lignanas, mas podendo ser rico em outros compostos bioativos, como os polifenóis simples, flavonoides, antocianinas e antraquinona. Uma terceira etapa poderia ser composta de PLE ou SFE com cossolvente (utilizando etanol 50%), para obtenção de mais lignanas (uma vez que a primeira etapa não esgota as lignanas da matéria-prima) e alguns outros compostos fenólicos. *Observação:* Ainda que o acoplamento destas tecnologias tenha um impacto sobre os custos do processo, o fato de se utilizar como matéria-prima nas etapas seguintes o resíduo da etapa anterior tem influência positiva na avaliação econômica;

- vi. Tendo em vista que a pureza dos extratos é um fator importante na escolha do melhor método de extração, há a necessidade de se estudar também os processos de fracionamento e purificação das lignanas que possam ser usados após a obtenção dos extratos;

Por fim, há um longo caminho, que passa por estudos farmacológicos e clínicos, para se vislumbrar a obtenção de um fármaco composto das lignanas isoladas a partir das tecnologias propostas.

## 8 REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A. et al. A Review on Supercritical Fluid Extraction as New Analytical Method. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 345–353, 2008.

ADENEYE, A. A. The leaf and seed aqueous extract of *Phyllanthus amarus* improves insulin resistance diabetes in experimental animal studies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 705–11, 18 dez. 2012.

ADIL, I. H. et al. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 1, p. 55–63, 2007.

AGUIAR, A. C. DE et al. Encapsulation of pepper oleoresin by supercritical fluid extraction of emulsions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 112, p. 37–43, 2016.

ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 86–95, 2012.

ARAÚJO, M. E.; MEIRELES, M. A. A. Improving phase equilibrium calculation with the Peng–Robinson EOS for fats and oils related compounds/supercritical CO<sub>2</sub> systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 169, n. 1, p. 49–64, 2000.

ARUNA KUMAR, R. et al. Integrated Nutrient Management on Growth , Yield , Quality and Economics of Bhumyamalaki (*Phyllanthus amarus*) – An Anti-jaundice Plant. **Jornal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 1, n. 2, p. 34–39, 2010.

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

BARRALES, F. M.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of passion fruit (*Passiflora edulis sp.*) seed oil assisted by ultrasound. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 104, p. 183–192, 2015.

BARROS, M. E.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. **Urological Research**, v. 30, n. 6, p. 374–379,

2003.

BRASIL. **Relação de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_mediciniais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_mediciniais_sus_0603.pdf)>. Acesso em: 5 set. 2016.

BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. [s.l.] Steinkopff, 1994.

CALIXTO, J. B. et al. A Review of the Plants of the Genus *Phyllanthus*: and Therapeutic Potential. **Medicinal Research Reviews**, v. 18, n. 4, p. 225–258, 1998.

CARR, A. G.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N. R. A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, n. 1, p. 1–17, 2011.

CARVALHO, P. I. N. et al. Techno-economic evaluation of the extraction of turmeric (*Curcuma longa L.*) oil and ar-turmerone using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 105, p. 44–54, 2015.

CAVALCANTI, R. N. **Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (Myrciaria cauliflora) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática**. [s.l.] UNICAMP, 2013.

CHIRDCHUPUNSEREE, H.; PRAMYOTHIN, P. Protective activity of phyllanthin in ethanol-treated primary culture of rat hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 172–176, 2010.

CHOWDHURY, S. et al. The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 10, p. 1126–1143, 2 out. 2012.

DE AGUIAR, A. C. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of Capsicum peppers: Global yield and capsaicinoid content. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 210–216, 2013.

DE AGUIAR, A. C. et al. Supercritical fluid extraction and low pressure extraction of Biquinho pepper (*Capsicum chinense*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1239–1246, 2014.

DEL PILAR GARCIA-MENDOZA, M. et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis Mart.*) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9–16, 2017.

DIAS, A. L. B. et al. Effect of ultrasound on the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. pendulum). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 284–294, 2016.

DOS SANTOS, P. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of cumbaru oil (*Dipteryx alata* Vogel) assisted by ultrasound: Global yield, kinetics and fatty acid composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 75–83, 2016.

DOS SANTOS, P.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 170–178, 2016.

ESPINOSA-PARDO, F. A.; MARTINEZ, J.; MARTINEZ-CORREA, H. A. Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (*Bactris gasipaes*) using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 2–6, 2014.

EZURUIKE, U. F.; PRIETO, J. M. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 857–924, 2013.

FDA. **Generally Recognized as Safe (GRAS)**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/ucm2006850.htm>>. Acesso em: 5 out. 2016.

GAROFULIĆ, I. E. et al. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 437–442, ago. 2013.

GERSTENMEYER, E. et al. Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. **Food chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1847–55, 1 jun. 2013.

GREEN, D.; PERRY, R. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. 8th. ed. [s.l.] McGraw-Hill Education, 2007.

- HANH, N. D.; SINCHAIPANID, N.; MITREVEJ, A. Physicochemical characterization of phyllanthin from *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 9045, p. 1–10, 17 abr. 2013.
- HAWORTH, R. D. The Chemistry of the Lignan Group of Natural Products. **The Tilden Lecture Delivered Before The Chemical Society at Brsitol and London**, p. 448–456, 1942.
- HUANG, R.-L. et al. Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human hepatitis B virus in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 449–453, 1 maio 2003.
- IKA. **Manual Ultra-Turrax T18 digital**. Disponível em: <<http://goo.gl/yR03fo>>. Acesso em: 3 ago. 2016.
- INCHOO, M. et al. Endothelium-independent effects of phyllanthin and hypophyllanthin on vascular tension. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1231–1236, 2011.
- KASSUYA, C. A. L. et al. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. **Planta medica**, v. 71, n. 8, p. 721–6, 2005.
- KASSUYA, C. A. L. et al. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*: Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 546, n. 1, p. 182–188, 2006.
- KASSUYA, C. A. L.; SILVESTRE, A. A.; REHDER, V. L. G. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, p. 145–153, 2003.
- KHATOON, S. et al. Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 104, n. 1–2, p. 79–86, 8 mar. 2006.
- KIM, Y. et al. Effect of plant matrix and fluid ethanol concentration on supercritical fluid extraction efficiency of schisandrin derivatives. **Journal of chromatographic science**, v. 37, n. 12, p. 457–461, 1999.
- KRITHIKA, R. et al. Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in HepG2 cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, n. 3, p. 351–358, 30 out. 2009.

- KUMARAN, A.; JOEL KARUNAKARAN, R. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 344–352, mar. 2007.
- LEAL, P. F. et al. Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 38–45, 2010.
- LEE, Y.-N. et al. Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extractions. **Separation and Purification Technology**, v. 54, n. 1, p. 130–138, 15 mar. 2007.
- LEITE, D. F. et al. The cytotoxic effect and the multidrug resistance reversing action of lignans from *Phyllanthus amarus*. **Planta medica**, v. 72, n. 15, p. 1353–8, dez. 2006.
- LEVENSPIEL, O.; LÓPEZ, J. C. **Flujo de fluidos e intercambio de calor**. [s.l.] Reverté, 1996.
- LEWIS, N. G.; DAVIN, L. B. Lignans: Biosynthesis and Function. In: **Comprehensive Natural Products Chemistry**. [s.l: s.n.]. p. 639–712.
- LI, H. et al. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 928–936, 2012.
- LIM, Y. Y. Ñ.; MURTIJAYA, J. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. v. 40, p. 1664–1669, 2007.
- LIU, S. et al. In vitro and in vivo anti-hepatitis B virus activities of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus niruri* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1061–1067, set. 2014.
- LONDHE, J. S. et al. Radioprotective Properties of Polyphenols from *Phyllanthus amarus* Linn. **Journal of radiation Research**, v. 50, n. 4, p. 303–309, jul. 2009.
- LUQUE-GARCÍA, J. .; LUQUE DE CASTRO, M. . Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.
- LUTHRIA, D. L. Optimization of extraction of phenolic acids from a vegetable waste product using a pressurized liquid extractor. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 842–850, out.

2012.

MACHADO, A. P. D. F. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675–683, 2015a.

MAHOMOODALLY, M. F.; MUTHOORA, D. D. Kinetic of inhibition of carbohydrate-hydrolysing enzymes, antioxidant activity and polyphenolic content of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (*Phyllanthaceae*). **Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 208–223, 2014.

MAITY, S. et al. Evaluation of antioxidant activity and characterization of phenolic constituents of *Phyllanthus amarus* root. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 14, p. 3443–50, 2013a.

MAITY, S. et al. Bilirubin clearance and antioxidant activities of ethanol extract of *Phyllanthus amarus* root in phenylhydrazine-induced neonatal jaundice in mice. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 467–76, 2013b.

MARAN, J. P. et al. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. **Carbohydrate polymers**, v. 97, n. 2, p. 703–9, 2013.

MARKOM, M. et al. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 487–496, jan. 2007.

MARTÍNEZ, J.; AGUIAR, A. C. DE. Extraction of Triacylglycerols and Fatty Acids Using Supercritical Fluids-Review. **Current Analytical Chemistry**, p. 67–77, 2014.

MARTINS, L.; PEREIRA-FILHO, E.; CASS, Q. Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 2, p. 469–481, 2011.

MAZUMDER, A.; MAHATO, A.; MAZUMDER, R. Antimicrobial potentiality of *Phyllanthus amarus* against drug resistant pathogens. **Natural product research**, v. 20, n. 4, p. 323–326, 2006.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach

(*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10–16, nov. 2009.

MILLER, D. J.; HAWTHORNE, S. B. Method for Determining the Solubilities of Hydrophobic Organics in Subcritical Water. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 8, p. 1618–1621, 1 abr. 1998.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica chimica acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, 3 out. 2011.

NAHAR, L.; SARKER, S. D.; DELAZAR, A. Phytochemistry of the Genus *Phyllanthus*. In: KUTTAN, R.; HARIKUMAR, K. B. (Eds.). ***Phyllanthus Species: Scientific Evaluation and Medicinal Applications***. [s.l.] Taylor & Francis, 2012. p. 119–138.

NISHIURA, J. L. et al. *Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients. **Urological Research**, v. 32, n. 5, p. 362–366, 2004.

NOTKA, F.; MEIER, G. R.; WAGNER, R. Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by *Phyllanthus amarus*. **Antiviral Research**, v. 58, p. 175–186, 2003.

NOTKA, F.; MEIER, G.; WAGNER, R. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. **Antiviral Research**, v. 64, p. 93–102, 2004.

OLIVEIRA, C. N. F. DE. **Avaliação in vitro e in vivo da atividade de frações e compostos isolados de *Phyllanthus amarus* contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2012.

OSORIO-TOBÓN, J. F. et al. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 167–174, 2014.

PAES, J. et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 8–16, 2014.

PASQUEL REÁTEGUI, J. L. et al. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> assisted by ultrasound. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 223–233, 2014.

- PATEL, J. R. et al. *Phyllanthus amarus*: ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 286–313, 2011.
- PENG, D.-Y.; ROBINSON, D. B. A New Two-Constant Equation of State. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals**, v. 15, n. 1, p. 59–64, 1 fev. 1976.
- PEREIRA, R. G. et al. Extraction of lignans from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn using pressurized liquids and low pressure methods. **Separation and Purification Technology**, v. 158, p. 204–211, 2016.
- PÉRES, V. F. et al. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1–2, p. 115–118, 10 fev. 2006.
- PERRUT, M. Supercritical Fluid Applications : Industrial Development and Economic Issues. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 12, p. 4531–4535, 2000.
- PETERS, M. S.; TIMMERHAUS, K. D.; WEST, R. E. **Plant Design and Economics for Chemical Engineers**. [s.l.] McGraw-Hill, 2003.
- PRADO, J. M. et al. Manufacturing cost of supercritical-extracted oils and carotenoids from amazonian plants. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, p. 348–369, 2010.
- PRONYK, C.; MAZZA, G. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 215–226, nov. 2009.
- RAVIKUMAR, Y. S. et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by herbal extract : *Phyllanthus amarus* as potent natural source. **Virus Research**, v. 158, n. 1–2, p. 89–97, 2011.
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.
- RICHTER, B. E. et al. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 6, p. 1033–1039, 1996.
- ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1, p. 235–240, 2005.

- ŞAHİN, S.; SAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 595–602, 2013.
- SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 444–452, 2012.
- SANTOS, P. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens* L.) assisted by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 78–88, 2014.
- SHEN, J.; SHAO, X. A comparison of accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction, and ultrasonic-assisted extraction for analysis of terpenoids and sterols in tobacco. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 6, p. 1003–1008, 2005.
- SILLA, H. **Chemical Process Engineering: Design And Economics**. [s.l.] Taylor & Francis, 2003.
- SILVA, L. P. S.; MARTÍNEZ, J. Mathematical modeling of mass transfer in supercritical fluid extraction of oleoresin from red pepper. **Journal of Food Engineering**, v. 133, p. 30–39, 2014.
- SILVA, L. V. et al. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. **Food Research International**, v. 38, n. 8, p. 1087–1096, 2005.
- SINGH, M. et al. Two new lignans from *Phyllanthus amarus*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 6, p. 562–568, 1 jun. 2009.
- SMITH, R. **Chemical Process Design**. [s.l.] McGraw-Hill, 1995.
- SOUSA, A. D. et al. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 91–103, 2016.
- SPRENGER, R. D. F.; CASS, Q. B. Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1291, p. 97–103, 2013.

SYAMASUNDAR, K. V. et al. Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 41–44, 1985.

TERAMOTO, J. R. S. et al. Avaliação dos teores das lignanas filantina, hipofilantina e nirantina em quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumacher & Thonn.), sob condições de deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 10, n. 4, p. 67–75, 2008.

TORRES, D. S. C.; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A. M. O gênero *Phyllanthus* L. (*Euphorbiaceae*) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 2, p. 265–278, 2003.

TURTON, R.; BAILIE, R. C.; WHITING, W. B. **Analysis, synthesis, and design of chemical processes**. [s.l.] Prentice Hall, 2009.

UMEZAWA, T.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with *forsythia intermedia* cell-free extracts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 16, p. 10210–10217, 1991.

VANKAR, P. S. Essential oils and fragrances from natural sources. **Resonance**, v. 9, n. 4, p. 30–41, 2004.

VASSÃO, D. G. et al. Lignans (Neolignans) and Allyl/Propenyl Phenols: Biogenesis, Structural Biology, and Biological/Human Health Considerations. In: MANDER, E.; LIU, H.-W. (Eds.). **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**. [s.l.: s.n.]. p. 7388.

VEGGI, P. C. **Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom**. [s.l.] Universidade de Campinas, 2013.

VEGGI, P. C. et al. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 89, p. 68–77, maio 2014.

VIEIRA, G. S. et al. Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 2, p. 196–204, nov. 2013.

VIGANÓ, J. et al. Exploring the selectivity of supercritical CO<sub>2</sub> to obtain nonpolar fractions of

- passion fruit bagasse extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 1–10, 2016a.
- VIGANÓ, J. et al. Sequential high pressure extractions applied to recover piceatannol and scirpusin B from passion fruit bagasse. **Food Research International**, v. 85, p. 51–58, jul. 2016b.
- VIGANÓ, J.; MACHADO, A. P. D. F.; MARTÍNEZ, J. Sub- and supercritical fluid technology applied to food waste processing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 272–286, 2015.
- WANG, X. et al. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 3, p. 846–54, 2013.
- WEBSTER, G. L. Synopsis of the Genera and Suprageneric Taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 1, p. 33–144, 1 jan. 1994.
- WIJNGAARD, H. et al. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **FRIN**, v. 46, n. 2, p. 505–513, 2012.
- WINK, M. Phytochemical Diversity of Secondary Metabolites. In: GOODMAN, R. M. (Ed.). . **Encyclopedia of plant and crop science**. New York: [s.n.]. p. 915–919.
- YANG, Y. et al. Elution of organic solutes from different polarity sorbents using subcritical water. **Journal of Chromatography A**, v. 810, n. 1–2, p. 149–159, jun. 1998.
- YANG, Y.; HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J. Class-Selective Extraction of Polar, Moderately Polar, and Nonpolar Organics from Hydrocarbon Wastes Using Subcritical Water. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 430–437, 1 fev. 1997.
- YUANDANI et al. Inhibitory Effects of Standardized Extracts of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus urinaria* and Their Marker Compounds on Phagocytic Activity of Human Neutrophils. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, p. 1–9, jan. 2013.
- ZABOT, G. L. et al. New proposal for extracting rosemary compounds: Process intensification and economic evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 77, n. October, p. 758–771, 2015.

ZHANG, Z.-S. et al. Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 1, p. 17–24, out. 2007.

## MEMÓRIA

Rúbner Gonçalves Pereira é engenheiro de Alimentos (2005-2010) graduado pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e Mestre em Engenharia de Alimentos (2010-2012) pela mesma instituição. Em 2013, iniciou o curso de Doutorado em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) realizando as atividades de pesquisa apresentadas neste documento no Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos (LAPEA), com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com vigência de março de 2013 a fevereiro de 2017.

O trabalho do doutorado foi realizado sob orientação do Professor Dr Julian Martínez (FEA/UNICAMP) e co-orientação da Professora Dra Vera Lúcia Garcia, da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da UNICAMP.

Foram cursados 26 créditos que incluem três participações no Estágio de Capacitação Docente – PED C (CD003) e as disciplinas Termodinâmica (TP320), Fenômenos de Transporte I (TP322), Fenômenos de Transporte II (TP323), Seminários (TP199), Planejamento e Otimização de Experimentos (QP268) e Métodos Matemáticos na Engenharia de Alimentos (TP132).

As participações no Programa de Estágio Docente (PED C) ocorreram do primeiro semestre de 2014 ao primeiro semestre de 2015 com atividades de apoio parcial à docência nas disciplinas: Fundamentos de Cálculos de Processos (TA332), atuando como bolsista; Operações Unitárias II (TA731), como voluntário; e Instalações Industriais (TA734), como bolsista.

Em setembro de 2014, participou do I Workshop da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP. Tal evento realizou uma discussão sobre a dificuldade de desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas.

Em outubro de 2016 participou do VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer que ocorreram na cidade de Itajaí-SC com o objetivo de intercambiar experiências acadêmico-científicas que possibilitarão solidificar estratégias de pesquisa-desenvolvimento e formas de cooperação interinstitucionais em projetos sobre plantas medicinais, valorizando-se a multidisciplinaridade.

Os resultados do projeto de doutorado renderam: um artigo intitulado de “Extraction of lignans from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn using pressurized liquids and low pressure methods”, publicado na revista “Separation and Purification Technology”, com autorização de divulgação dos resultados apresentada no ANEXO; um artigo intitulado de Supercritical Fluid Extraction of Phyllanthin and Niranthin from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn, que será submetido para a revista “Journal of Supercritical Fluids”; e um resumo (Obtenção de filantina e nirantina a partir de *Phyllanthus amarus*: Comparação entre métodos de extração) apresentado no VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Mediciniais.

Parte dos resultados da pesquisa de doutorado foram obtidos pela participação de um estudante de iniciação científica (Renato Naohiro Nakamura) do curso de graduação em Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP) com o projeto "Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de lignanas a partir da *Phyllanthus amarus*: Efeito do uso de etanol como cossolvente”.

# APÊNDICES

## APÊNDICE A – Equipamentos e Reagentes

Tabela A 1. Equipamentos utilizados no trabalho

Equipamento	Laboratório	Marca	Modelo	Uso
Estufa com circulação de ar	LAPEA	FANEM		Determinação de Umidade Secagem de extratos para determinação de rendimento global
Moinho de facas (malha de 10 mesh)	LASEFI	Marconi	MA340	Diminuição de tamanho da matéria-prima
Peneiras	LAPEA	a bronzinox	-	Distribuição de tamanho do material moído
Unidade Experimental de Extração	LAPEA	Produzida no LAPEA		
<i>Compressor</i>		<i>Schulz</i>	<i>MSV 6/30</i>	
<i>Banho Ultratermostatizado</i>		<i>Marconi</i>	<i>MA 184/BX</i>	
<i>Banho Aquecimento</i>		<i>Marconi</i>	<i>MA 126/BO</i>	
<i>Bomba CO<sub>2</sub></i>		<i>Maximator</i>	<i>M111CO</i>	
<i>Bomba HPLC</i>		<i>Jasco</i>	<i>PU 2080 Plus</i>	
<i>Válvulas Bloqueio</i>		<i>Autoclave Engineers</i>	<i>30VM Series</i>	Processos de Extração
<i>Válvula Micrométrica</i>		<i>Autoclave Engineers</i>	<i>Metric Series - 2 way Angle</i>	
<i>Manômetros</i>		<i>Zurick</i>	<i>Z 10B A2 12B</i>	
<i>Controlador de temperatura</i>		<i>Marconi</i>	<i>MA 152</i>	
<i>Célula de Extração</i>		<i>Autic Automação – Campinas</i>		
<i>Fluxômetro</i>		<i>Cole Parmer</i>	<i>PMR1 010423</i>	
<i>Rotâmetro</i>		<i>Itron</i>	<i>ACD G1</i>	
Destilador	LAPEA	Quimis	0341-22	Produção da água destilada usada como solvente
Ultraturrax	DQOF/CPQBA	IKA	T18 Basic	Processo de Extração
Centrífuga	DQOF/CPQBA	FANEM	Excelsa Baby II - 206R	Preparo das amostras do CG

Equipamento	Laboratório	Marca	Modelo	Uso
Rotaevaporador	LAPEA	Marconi	MA100E	Evaporação de solventes
<i>Bomba a vácuo</i>		<i>Tecnal</i>	<i>TE058</i>	
<i>Banho Ultratermostatizado</i>		<i>Nova Técnica</i>	<i>NT281</i>	
Rotaevaporador	DQOF/CPQBA			Evaporação de solventes
Refrigerador	LAPEA	Consul	Facilite CRB36ABNA	Armazenagem dos extratos até o momento das análises
Freezer	LAPEA	Prosdocimo		Conservação dos extratos após as análises
Balança Semi-analítica	LAPEA	Radwag	AS 220/C/2	Medida da massa de matéria-prima, dos extratos e padrões
Deionizador	DQOF/CPQBA	Milipore	Simplicity	Fase móvel no HPLC
HPLC-DAD	DQOF/CPQBA	Waters	Alliance	Identificação e quantificação de Filantina e Nirantina nos extratos obtidos em todos os processos
<i>Detector de Arranjo de Diodo</i>		<i>Waters</i>	<i>2996</i>	
<i>Coluna</i>		<i>Xbridge</i>	<i>Shield RP 18</i>	
GC-MS	DQOF/CPQBA	Agilent	6890N	Identificação das lignanas nos extratos obtidos por PLE e EUT
<i>Detector Seletivo de Massas</i>		<i>Agilent</i>	<i>5975</i>	
<i>Coluna Capilar</i>		<i>Agilent</i>	<i>HP-5</i>	

Tabela A 2. Reagentes utilizados no trabalho

<b>Reagente</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Marca</b>	<b>Uso</b>
Água destilada	LAPEA	-	Solvente nos métodos de extração
Etanol PA	LAPEA	Synth	Solvente nos métodos de extração Preparo das amostras para CG e HPLC
Metanol PA	LAPEA	Synth	Preparo das amostras para CG
Metanol grau HPLC	DQOF/CPQBA	Merck	Preparo das amostras para HPLC Fase móvel HPLC
Ácido Fórmico 98-100%	DQOF/CPQBA	Merck	Fase móvel HPLC
Acetato de Etila PA	DQOF/CPQBA	Synth	Preparo das amostras para CG
Dioxido de Carbono 99%	LAPEA	White Martins	Solvente nos métodos de extração
Padrão Filantina (>98%)	DQOF/CPQBA	Isolada em projetos anteriores do CPQBA	Quantificação de Filantina por HPLC-DAD
Padrão Nirantina (>98%)	DQOF/CPQBA	Isolada em projetos anteriores do CPQBA	Quantificação de Nirantina por HPLC-DAD

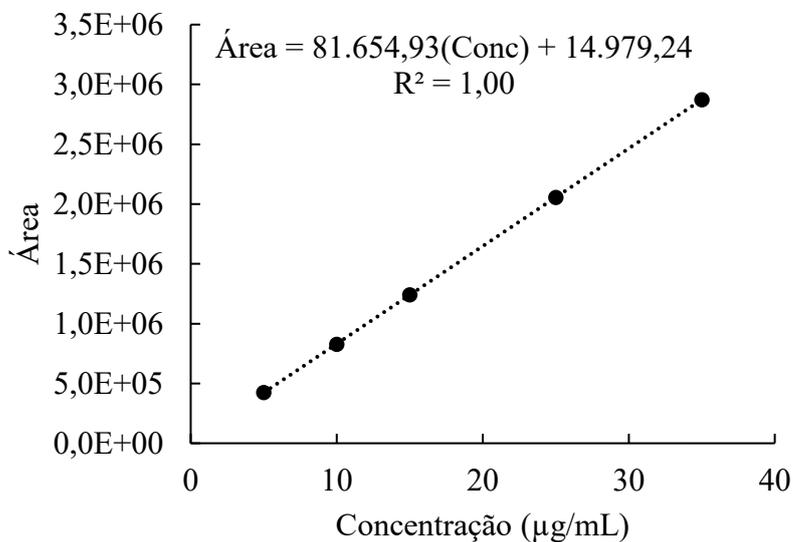
APÊNDICE B – Curvas de Calibração

Curvas de Calibração obtidas no HPLC

FILANTINA

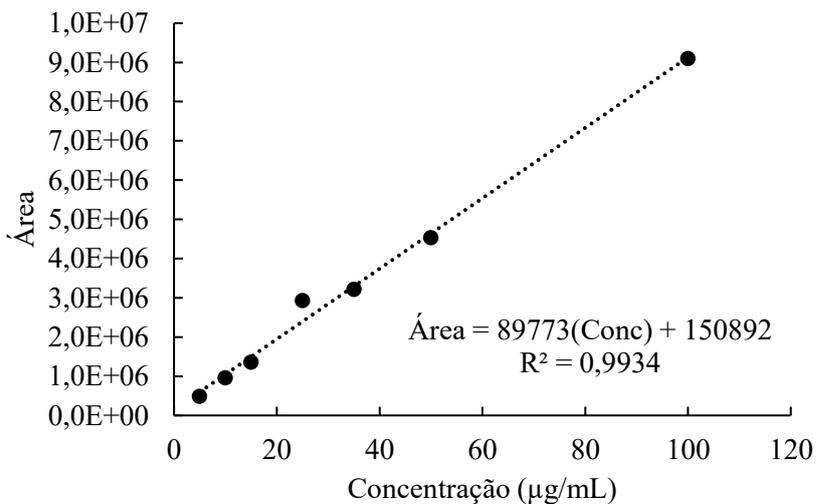
Curva 1 – Jun/2015

Conc (µg/mL)	Área
5	425386
10	827204
15	1241919
25	2056536
35	2872795



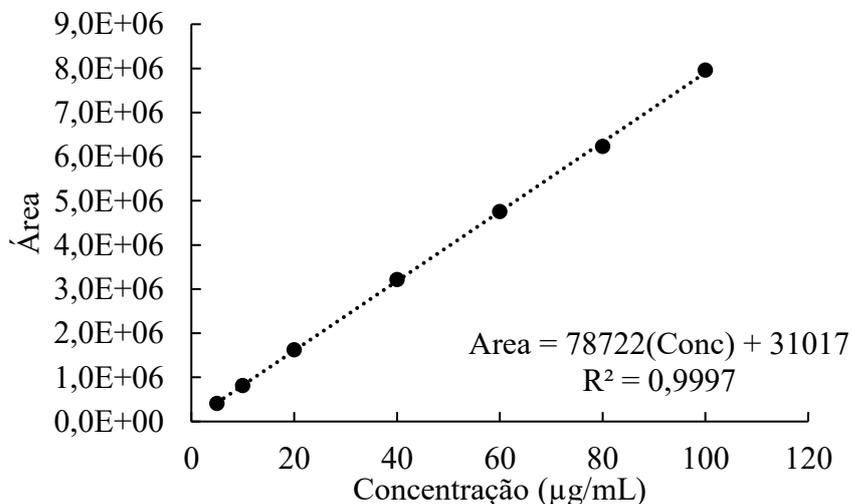
Curva 2 – Fev/2016

Conc (µg/mL)	Área
5	487885
10	960381
15	1359025
25	2933212
35	3217891
50	4536875
100	9106463



Curva 3 – Mai/2016

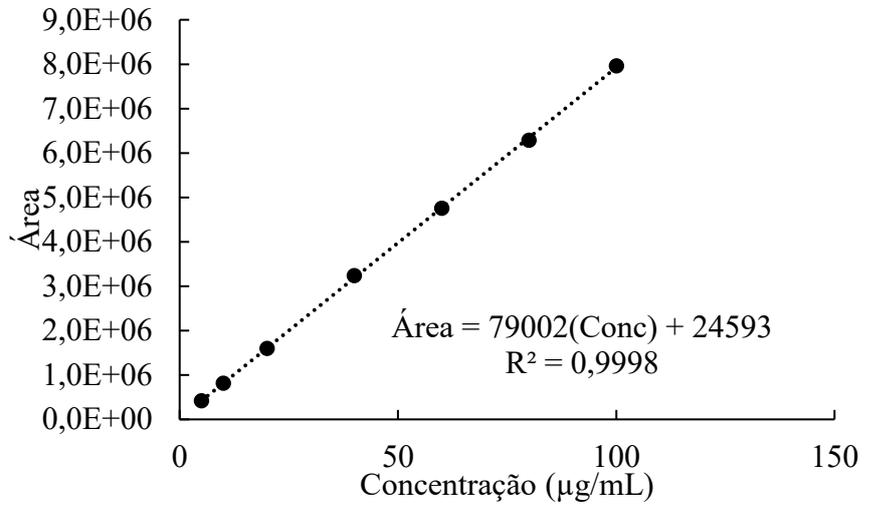
Conc (µg/mL)	Área
5	406354
10	817132
20	1623116
40	3218462
60	4754833
80	6233439
100	7961360



*Apêndice B – Curvas de Calibração*

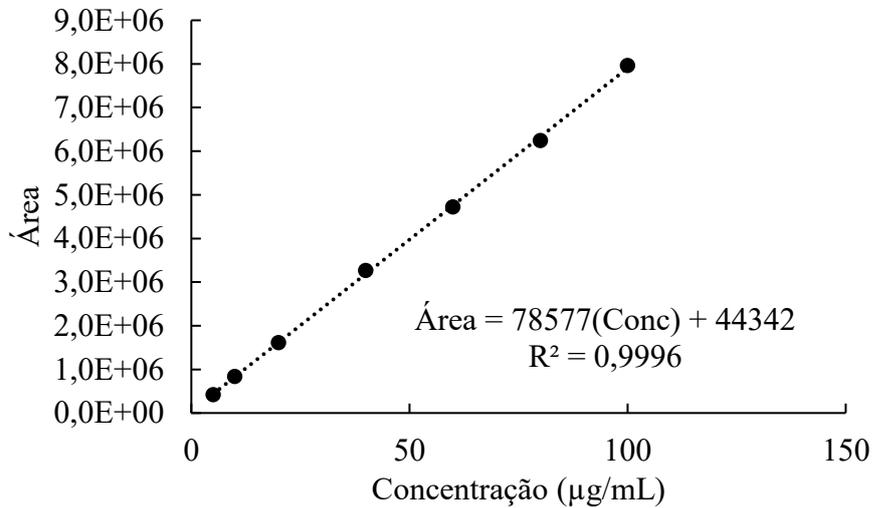
Curva 4 – Mai/2016

Conc (µg/mL)	Área
5	415475
10	812517
20	1593547
40	3235813
60	4754289
80	6285368
100	7960638



Curva 5 – Mai/2016

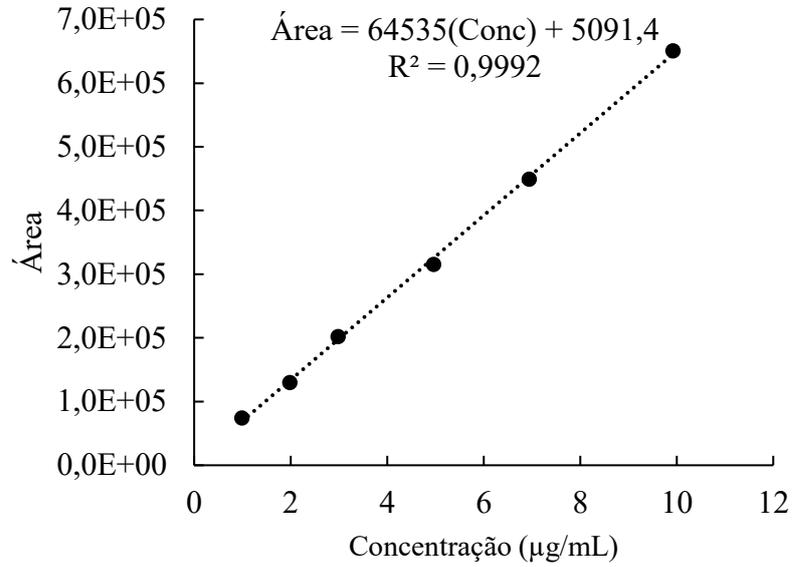
Conc (µg/mL)	Área
5	417012
10	836305
20	1612316
40	3268366
60	4722285
80	6243406
100	7962434



**NIRANTINA**

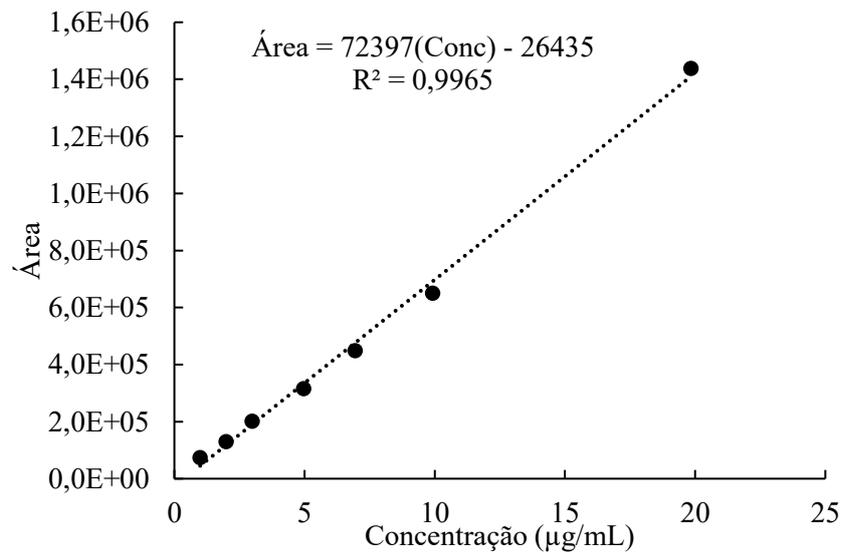
Curva 1 – Jun/2015

Conc (µg/mL)	Área
0,99	74487
1,98	129807
2,98	202041
4,96	315740
6,94	449562
9,92	651056



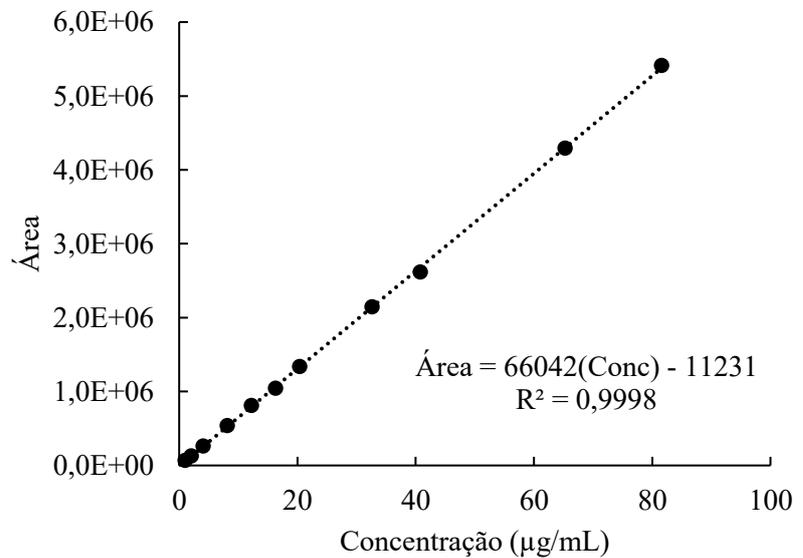
Curva 2 – Fev/2016

Conc (µg/mL)	Área
0,99	74487
1,98	129807
2,98	202041
4,96	315740
6,94	449562
9,92	651056
19,84	1439080,5



Curva 4 – Mai/2016

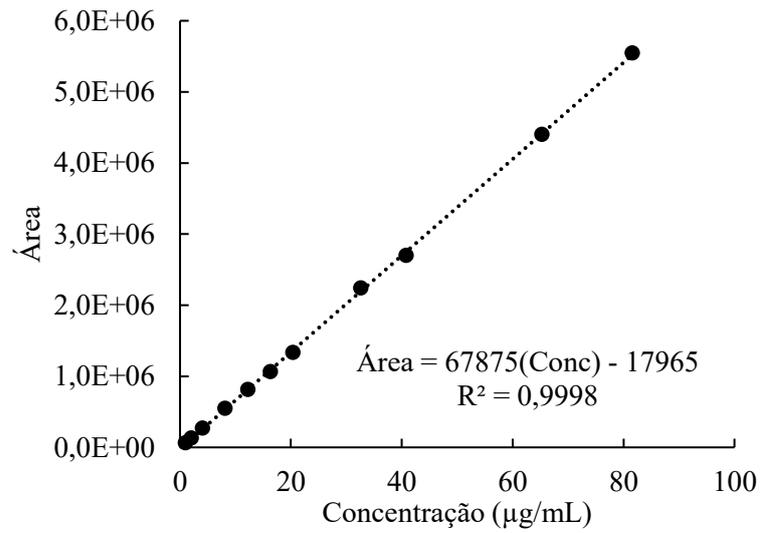
Conc (µg/mL)	Área
1,02	67724
2,04	130253
4,08	262328
8,16	538528
12,24	811994
16,32	1046180
20,4	1340266
32,64	2148180
40,8	2619427
65,28	4291991
81,6	5413734



*Apêndice B – Curvas de Calibração*

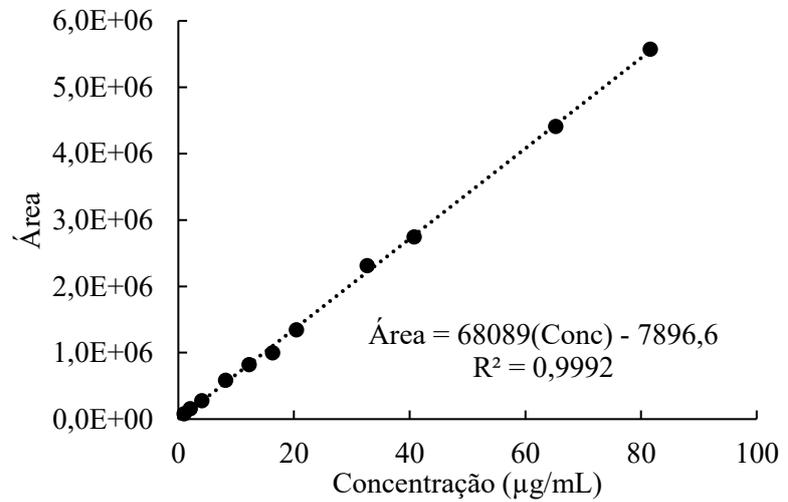
Curva 4 – Mai/2016

Conc (µg/mL)	Área
1,02	63471
2,04	132620
4,08	269331
8,16	547935
12,24	813743
16,32	1064109
20,4	1333684
32,64	2243588
40,8	2700458
65,28	4401245
81,6	5547964



Curva 5 – Mai/2016

Conc (µg/mL)	Área
1,02	81067
2,04	153459
4,08	275408
8,16	582787
12,24	818291
16,32	996431
20,4	1344537
32,64	2312659
40,8	2745467
65,28	4409627
81,6	5570049



### APÊNDICE C – Resultados Experimentais com replicatas

Tabela C 1. Resultados Experimentais de Rendimento Global por PLE

Ensaio	T (°C)	%EtOH	X1	X2	Massa de Amostra (g)	t <sub>d</sub> (min)	Vazão (mL/min)	S/F (kg/kg)	x <sub>0</sub> (%)		
1	35	0	-2	-1	3,0089	60	2,3136	46,0004	31,39	31,63	35,73
1	35	0	-2	-1	3,0075	60	2,3125	46,0000	31,21	35,34	33,53
2	50	0	-1	-1	3,0104	60	2,3147	45,9994	32,30	33,62	34,53
2	50	0	-1	-1	3,0008	60	2,3073	45,9990	36,29	37,20	37,92
3	65	0	0	-1	3,0049	60	2,3105	45,9999	37,04	38,68	39,21
3	65	0	0	-1	3,0083	60	2,3131	45,9996	38,64	39,72	40,42
4	80	0	1	-1	3,0055	60	2,3109	45,9987	39,73	41,34	42,80
4	80	0	1	-1	3,0013	60	2,3077	45,9993	38,57	38,60	39,88
5	35	50	-2	-1	3,0058	60	2,5328	46,0004	31,74	31,64	34,74
5	35	50	-2	-1	3,0008	60	2,5286	46,0007	34,00	34,16	32,65
6	50	50	-1	-1	3,0049	60	2,5320	45,9997	42,80	45,21	45,58
6	50	50	-1	-1	3,0009	60	2,5286	45,9991	37,34	39,84	40,71
7	65	50	0	-1	3,0107	60	2,5228	45,9448	39,81	36,98	41,49
7	65	50	0	-1	3,0046	60	2,5207	45,9998	41,19	42,61	42,87
8	80	50	1	-1	3,0040	60	2,5313	46,0007	39,51	40,20	40,67
8	80	50	1	-1	3,0013	60	2,5289	45,9985	37,26	39,34	39,80
9	35	100	-2	-1	3,0039	60	2,9335	45,9997	11,35	11,22	11,99
9	35	100	-2	-1	3,0010	60	2,9307	46,0000	10,32	10,98	9,65
10	50	100	-1	-1	3,0052	60	2,9348	46,0001	16,14	11,17	17,79
10	50	100	-1	-1	3,0042	60	2,9338	45,9998	16,45	21,95	21,73
11	65	100	0	-1	3,0042	60	2,9338	45,9998	38,11	36,74	37,42
11	65	100	0	-1	3,0043	60	2,9339	45,9998	41,20	42,36	43,94
12	80	100	1	-1	3,0033	60	2,9329	45,9995	22,70	22,68	22,35
12	80	100	1	-1	3,0056	60	2,9352	46,0003	25,61	27,06	27,67

X1 é a variável Temperatura codificada; X2 é a variável %EtOH codificada; t<sub>d</sub> é o tempo dinâmico de extração; S/F é a razão entre a massa de solvente (Solvent – S) usado na extração e a massa de amostra colocada no leito (Feed – F), x<sub>0</sub> (%) é o rendimento global de extração.

Tabela C 2. Resultados Experimentais de rendimentos de lignanas por PLE

Ensaio	T (°C)	%EtOH	X1	X2	x <sub>la</sub> (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>amostra</sub> )			x <sub>le</sub> (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>extrato</sub> )		
					Filantina	Nirantina	Soma	Filantina	Nirantina	Soma
1	35	0	-2	-1	0,80	0,14	0,94	2,23	0,38	2,61
1	35	0	-2	-1	0,75	0,12	0,87	2,11	0,35	2,46
2	50	0	-1	-1	1,16	0,23	1,39	3,37	0,68	4,05
2	50	0	-1	-1	0,87	0,20	1,07	2,29	0,53	2,82
3	65	0	0	-1	1,78	0,44	2,22	4,54	1,12	5,66
3	65	0	0	-1	1,25	0,26	1,51	3,09	0,63	3,72
4	80	0	1	-1	1,44	0,21	1,65	3,37	0,49	3,86
4	80	0	1	-1	1,51	0,22	1,73	3,80	0,55	4,35
5	35	50	-2	0	4,04	2,82	6,86	11,15	7,78	18,93
5	35	50	-2	0	4,15	2,84	6,99	11,51	7,88	19,39
6	50	50	-1	0	5,14	3,54	8,68	11,28	7,76	19,04
6	50	50	-1	0	4,63	2,94	7,57	11,38	7,22	18,60
7	65	50	0	0	4,42	2,87	7,29	10,64	6,92	17,56
7	65	50	0	0	4,61	3,17	7,78	10,75	7,39	18,14
8	80	50	1	0	4,46	3,10	7,56	10,96	7,61	18,57
8	80	50	1	0	3,94	2,81	6,75	9,89	7,06	16,95
9	35	100	-2	1	2,92	1,93	4,85	24,36	16,12	40,48
9	35	100	-2	1	2,25	1,23	3,48	27,79	15,18	42,97
10	50	100	-1	1	3,39	2,51	5,90	19,05	14,11	33,16
10	50	100	-1	1	2,61	1,83	4,44	11,99	8,42	20,41
11	65	100	0	1	2,58	1,61	4,19	7,04	4,38	11,42
11	65	100	0	1	2,58	1,61	4,19	7,04	4,38	11,42
12	80	100	1	1	3,26	1,46	4,72	14,58	6,55	21,13
12	80	100	1	1	3,07	2,11	5,18	11,09	7,64	18,73

X1 é a variável Temperatura codificada; X2 é a variável %EtOH codificada; x<sub>la</sub> é o rendimento de lignanas na amostra; x<sub>le</sub> é o rendimento de lignanas no extrato.

Tabela C 3. Resultados Experimentais obtidos por EUT

%EtOH	Massa amostra (g)	S/F	$x_0$ (%)	$x_{1a}$ (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>amostra</sub> )			$x_{1e}$ (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>extrato</sub> )		
				Filantina	Nirantina	Soma	Filantina	Nirantina	Soma
0	0,5131	46	20,89	1,11	0,08	1,18	5,30	0,36	5,66
0	0,5376	46	21,27	1,09	0,08	1,17	5,12	0,37	5,49
0	0,5362	46	20,55	1,04	0,08	1,12	5,05	0,39	5,45
50	0,5139	46	28,78	8,56	0,47	9,02	29,73	1,62	31,35
50	0,5517	46	29,28	8,70	0,48	9,18	29,70	1,64	31,34
50	0,5232	46	27,84	8,65	0,48	9,13	31,07	1,71	32,78
100	0,5494	46	8,96	8,70	0,48	9,18	97,09	5,40	102,49
100	0,5465	46	9,11	9,25	0,51	9,77	101,54	5,62	107,16
100	0,5334	46	8,32	9,57	0,52	10,09	115,00	6,28	121,27

S/F é a razão entre a massa de solvente (Solvent – S) usado na extração e a massa de amostra colocada no leito (Feed – F),  $x_0$  (%) é o rendimento global de extração;  $x_{1a}$  é o rendimento de lignanas na amostra;  $x_{1e}$  é o rendimento de lignanas expresso no extrato.

Tabela C 4. Resultados Experimentais de Rendimento Global por SFE1

Ensaio	T (°C)	P (MPa)	$\rho$ CO <sub>2</sub> (kg/m)	X1	X2	Massa amostra (g)	Vazão de CO <sub>2</sub> (kg/s)	S/F (kg/kg)	x <sub>0</sub> (%)
1	40	100	569,2892	-1	-1	3,0106	1,40E-04	139,6492	0,99
1	40	100	569,2892	-1	-1	3,0063	1,40E-04	139,7240	0,97
2	40	200	832,0828	-1	0	3,0114	1,58E-04	157,5111	2,11
2	40	200	832,0828	-1	0	3,0090	1,54E-04	153,6010	2,59
3	40	300	930,0484	-1	1	3,0038	1,63E-04	163,2471	2,80
3	40	300	930,0484	-1	1	3,0065	1,61E-04	160,5684	2,75
4	50	100	379,4731	0	-1	3,0015	1,53E-04	153,1614	0,19
4	50	100	379,4731	0	-1	3,0053	1,39E-04	139,1707	0,06
5	50	200	765,9422	0	0	3,0054	1,61E-04	160,3998	2,32
5	50	200	765,9422	0	0	3,0049	1,53E-04	152,2767	2,37
6	50	300	882,3895	0	1	3,0186	1,60E-04	159,5982	3,09
6	50	300	882,3895	0	1	3,0047	1,54E-04	153,5370	2,86
7	60	100	294,3956	1	-1	3,0061	1,42E-04	141,5325	0,13
7	60	100	294,3956	1	-1	3,0000	1,44E-04	144,2240	0,00
8	60	200	697,5804	1	0	3,0176	1,48E-04	146,9674	2,52
8	60	200	697,5804	1	0	3,0117	1,53E-04	152,1262	2,65
9	60	300	833,8999	1	1	3,0030	1,55E-04	154,8859	2,99
9	60	300	833,8999	1	1	3,0049	8,59E-05	150,8575	3,00

$\rho$  CO<sub>2</sub> é a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico calculada de acordo com a equação de estado de Peng e Robinson (PENG; ROBINSON, 1976). X1 é a temperatura codificada; X2 é a pressão codificada; Q é a vazão volumétrica de CO<sub>2</sub>; S/F é a razão entre a massa de solvente (Solvent – S) usado na extração e a massa de amostra colocada no leito (Feed – F), x<sub>0</sub> (%) é o rendimento global de extração.

Tabela C 5. Resultados Experimentais de Rendimentos de Lignanas por SFE1

Ensaio	T (°C)	P (MPa)	$\rho$ CO <sub>2</sub> (kg/m <sup>3</sup> )	x <sub>la</sub> (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>amostra</sub> )			x <sub>le</sub> (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>extrato</sub> )		
				Filantina	Nirantina	Soma	Filantina	Nirantina	Soma
1	40	100	569,2892	2,19	1,19	3,38	221,98	119,03	341,01
1	40	100	569,2892	2,22	1,17	3,39	228,09	122,06	350,15
2	40	200	832,0828	4,38	2,24	6,62	228,35	121,96	350,31
2	40	200	832,0828	4,81	2,57	7,38	209,08	111,5	320,58
3	40	300	930,0484	4,83	2,45	7,28	185,73	93,04	278,77
3	40	300	930,0484	4,88	2,53	7,41	183,72	96,05	279,77
5	50	100	379,4731	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	50	100	379,4731	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	50	200	765,9422	4,38	2,29	6,67	184,62	96,10	280,72
4	50	200	765,9422	4,34	2,29	6,63	183,21	96,53	279,74
6	50	300	882,3895	4,83	1,33	6,16	186,68	97,50	284,18
6	50	300	882,3895	5,77	1,52	7,29	156,40	105,45	261,85
7	60	100	294,3956	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	60	100	294,3956	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	60	200	697,5804	4,06	2,09	6,15	176,89	91,13	268,02
8	60	200	697,5804	3,94	2,15	6,09	169,41	88,74	258,15
9	60	300	833,8999	4,33	2,23	6,56	152,92	83,36	236,28
9	60	300	833,8999	4,22	2,30	6,52	163,49	85,28	248,77

$\rho$  CO<sub>2</sub> é a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico calculada de acordo com a equação de estado de Peng-Robinson (PENG; ROBINSON, 1976). x<sub>la</sub> é o rendimento de lignanas na amostra; x<sub>le</sub> é o rendimento de no extrato.

Tabela C 6. Condições Experimentais de SFE2.

Ensaio	T (°C)	P (MPa)	%Cossolvente*	Massa de amostra (g)	Va cossolvente no t <sub>e</sub> (mL/min)	t <sub>inj</sub> ; t <sub>e</sub> e t <sub>d</sub> (min)	Va CO <sub>2</sub> no t <sub>d</sub> (kg/s)	Va cossolvente no t <sub>d</sub> (mL/min)	S/F (kg/kg)
1	40	10	10,00%	1,7019	3,4009	2; 5 e 24	1,54E-04	1,07	139,6674
1	40	10	9,98%	1,699	3,4009	2; 5 e 24	1,73E-04	1,07	139,6704
2	40	20	10,02%	1,7013	4,1689	2; 5 e 27	1,50E-04	1,062	155,5281
2	40	20	10,02%	1,7011	4,1689	2; 5 e 27	1,62E-04	1,062	155,5464
3	40	30	10,00%	1,7028	3,4009	2; 5 e 26	1,62E-04	1,177	163,6716
3	40	30	10,01%	1,7024	3,4009	2; 5 e 26	1,62E-04	1,177	163,6513
4	50	10	9,97%	1,7045	2,9621	2; 5 e 25	1,67E-04	1,09	145,7319
4	50	10	9,99%	1,7042	2,9621	2; 5 e 25	1,57E-04	1,09	145,9923
5	50	20	10,03%	1,6955	3,0718	2; 5 e 25	1,55E-04	1,103	150,7520
5	50	20	10,01%	1,7046	3,0718	2; 5 e 25	1,70E-04	1,103	149,1259
6	50	30	10,01%	1,7024	1,4262	2; 5 e 26	1,60E-04	1,14	156,8374
6	50	30	10,02%	1,7037	1,4262	2; 5 e 26	1,59E-04	1,14	156,6003
7	60	10	10,00%	1,7031	2,7427	2; 5 e 25	1,63E-04	1,074	142,7397
7	60	10	9,99%	1,7034	2,7427	2; 5 e 25	1,70E-04	1,074	142,7733
8	60	20	10,01%	1,7013	4,0591	2; 5 e 25	1,69E-04	1,124	152,8831
8	60	20	10,02%	1,7059	4,0591	2; 5 e 25	1,50E-04	1,124	152,8812
9	60	30	10,02%	1,7029	3,6203	2; 5 e 25	2,11E-04	1,174	154,7948
9	60	30	10,01%	1,7059	3,6203	2; 5 e 25	1,67E-04	1,174	154,8156

\*Percentual da razão entre a massa de cossolvente e a massa de mistura de solventes. Va é a vazão volumétrica; t<sub>e</sub> é o tempo estático; t<sub>inj</sub> é o tempo de injeção do cossolvente antes do tempo estático; t<sub>d</sub> é o tempo dinâmico de extração; S/F é a razão entre a massa de solvente (Solvent – S) usado na extração e a massa de amostra colocada no leito (Feed – F).

Tabela C 7. Resultados Experimentais de Rendimento Global por SFE2.

Ensaio	T (°C)	P (MPa)	X1	X2	x <sub>0</sub> (%)	x <sub>1a</sub> (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>amostra</sub> )			x <sub>1e</sub> (mg <sub>lignana</sub> /g <sub>extrato</sub> )		
						Filantina	Nirantina	Soma	Filantina	Nirantina	Amostra
1	40	100	-1	-1	32,18	7,36	4,07	11,43	22,86	12,64	35,51
1	40	100	-1	-1	34,14	8,40	4,89	13,29	24,60	14,32	38,92
2	40	200	-1	0	36,72	8,18	4,73	12,90	22,27	12,87	35,14
2	40	200	-1	0	34,12	8,20	4,74	12,94	24,02	13,90	37,92
3	40	300	-1	1	35,68	8,02	4,52	12,54	22,48	12,67	35,15
3	40	300	-1	1	35,34	7,89	4,41	12,30	22,33	12,47	34,80
4	50	100	0	-1	38,89	8,22	4,80	13,03	21,14	12,35	33,49
4	50	100	0	-1	38,91	10,17	5,58	15,75	26,14	14,35	40,49
5	50	200	0	0	34,98	6,70	3,78	10,48	19,16	10,79	29,95
5	50	200	0	0	33,32	8,86	5,26	14,12	26,58	15,80	42,38
6	50	300	0	1	32,48	8,76	4,90	13,66	26,98	15,07	42,05
6	50	300	0	1	35,68	8,41	4,67	13,08	23,56	13,10	36,65
7	60	100	1	-1	41,27	7,93	4,36	12,29	19,22	10,56	29,78
7	60	100	1	-1	40,69	7,58	4,27	11,85	18,63	10,49	29,12
8	60	200	1	0	37,48	7,46	4,11	11,57	19,91	10,96	30,87
8	60	200	1	0	37,48	8,45	4,81	13,26	22,56	12,82	35,38
9	60	300	1	1	40,38	4,60	2,73	7,33	11,40	6,75	18,15
9	60	300	1	1	37,72	8,38	4,63	13,01	22,22	12,27	34,48

X1 é a temperatura codificada; X2 é a pressão codificada; x<sub>0</sub> (%) é o rendimento global de extração; x<sub>1a</sub> é o rendimento de lignanas na amostra; x<sub>1e</sub> é o rendimento de lignanas no extrato.

## APÊNDICE D – Relatórios do SAS

### ALGORITMO

Para as análises estatísticas dos resultados de rendimento global e rendimentos de lignanas de todos os processos estudados foram criados alguns algoritmos a partir do pacote estatístico SAS 9.0<sup>®</sup>. Um exemplo do algoritmo é mostrado a seguir com os resultados de rendimentos de lignanas por grama de amostra no processo de PLE:

```
OPTIONS PS=102 LS=80 NODATE CENTER PAGENO=1 FORMDLIM='*';
```

```
Title 'Lignanas por grama de amostra - PLE';
```

```
DATA lignanas_amo;
```

```
Input FAj temp solv x1temp x2solv filamo niramom;
```

```
Datalines;
```

1	35	0	-2	-1	0.80	0.14
1	35	0	-2	-1	0.75	0.12
2	50	0	-1	-1	1.16	0.23
2	50	0	-1	-1	0.87	0.20
3	65	0	0	-1	1.78	0.44
3	65	0	0	-1	1.25	0.26
4	80	0	1	-1	1.44	0.21
4	80	0	1	-1	1.51	0.22
5	35	50	-2	0	4.04	2.82
5	35	50	-2	0	4.15	2.84
6	50	50	-1	0	5.14	3.54
6	50	50	-1	0	4.63	2.94
7	65	50	0	0	4.42	2.87
7	65	50	0	0	4.61	3.17
8	80	50	1	0	4.46	3.10
8	80	50	1	0	3.94	2.81
9	35	100	-2	1	2.92	1.93
9	35	100	-2	1	2.25	1.23
10	50	100	-1	1	3.39	2.51
10	50	100	-1	1	2.61	1.83
11	65	100	0	1	2.58	1.61
11	65	100	0	1	2.58	1.61
12	80	100	1	1	3.26	1.46
12	80	100	1	1	3.07	2.11;

```
Proc GLM;
```

```
Class x1temp x2solv;
```

```
Model filamo niramom = x1temp x2solv x1temp*x2solv/ SS1;
```

```
Run;
```

```
Proc GLM;
```

```
Class FAj;
```

```
Model filamo niramom = x2solv x2solv*x2solv FAj/ SS1;
```

```
Run;
```

```
Proc GLM;
```

```
Model filamo niramom = x2solv x2solv*x2solv/ SS1;
```

```
Run;
```

```
Proc GLM;
```

```
Class FAj;
```

```
Model filamo niramom = FAj/ SS1;
```

```
means FAj / tukey;
```

```
Run;
```

- No comando **OPTIONS** são inseridas as configurações de página do arquivo de resposta. PS é o tamanho da página na vertical; LS é o tamanho da página na horizontal; NODATE inibe a exibição da data de execução do programa; CENTER centraliza todo o documento; PAGENO reinicia a numeração de página a cada corrida; FORMDLIM é o separador entre páginas.
- Cada linha de comando deve ser finalizada com “;” para que um novo comando possa seja iniciado.
- O título do documento deve ser inserido em **Title**, entre apóstrofes: 'Lignanas por grama de amostra - PLE'
- O nome do arquivo executável pelo SAS é inserido em **DATA**, sem caracteres especiais ou espaços: lignanas\_amo;
- As variáveis devem ser nomeadas em **Input**, separadas por espaço: FAj temp solv x1temp x2solv filamo niram
- Em **Datalines** estão os dados a serem analisados, organizados em colunas, na ordem em que foram nomeadas as variáveis.
- A ANOVA e a análise de regressão podem ser realizadas no procedimento **Proc GLM**:
  - >Para ANOVA
  - As variáveis são apresentadas em **Class**;
  - O modelo é descrito em **Model**;
  - O comando para rodar o procedimento é **Run**;
  - >Para análise de regressão
  - Não se deve apresentar as variáveis, ou seja, não se usa o comando **Class**;
- No algoritmo do exemplo o **Proc GLM** foi utilizado 4 vezes:
  - >No primeiro caso para a ANOVA dos dados com o objetivo de se verificar a significância dos fatores estudados (temp, solv e a interação entre eles temp\*solv);
  - >No segundo caso para calcular a falta de ajuste do modelo que é apresentado também na análise de regressão do terceiro caso.
  - >No quarto caso para realizar a ANOVA one-way dos dados seguida do teste de comparação entre médias (tukey). Para isso, utilizou-se a variável FAj que, nesse caso, é igual ao número de tratamentos diferentes utilizado no experimento. O comando **means** é usado para calcular as médias da variável de interesse (FAj) e o teste de comparação é escolhido (sendo que o nível de propabilidade é 5%, por padrão)

**RELATÓRIOS**

**Relatório D1. ANOVA dos resultados de Rendimento Global obtidos por PLE.**

```

Rendimento Global - PLE
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
xltemp         4      -2 -1 0 1
x2solv         3      -1 0 1
Number of observations  72
*****
Rendimento Global - PLE
The GLM Procedure
Dependent Variable: Rendimento Global - PLE

```

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	6712.815978	610.255998	117.15	<.0001
Error	60	312.540800	5.209013		
Corrected Total	71	7025.356778			

```

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
0.955512      6.916024      2.282326      33.00056

```

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
xltemp	3	1901.620844	633.873615	121.69	<.0001
x2solv	2	3451.364078	1725.682039	331.29	<.0001
xltemp*x2solv	6	1359.831056	226.638509	43.51	<.0001

**Relatório D2. Análise de Regressão dos resultados de Rendimento Global obtidos por PLE.**

```

Rendimento Global - PLE
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
FAj            12      1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Number of observations  72
*****
Rendimento Global - PLE
The GLM Procedure
Dependent Variable: Rendimento Global - PLE

```

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	6712.815978	610.255998	117.15	<.0001
Error	60	312.540800	5.209013		
Corrected Total	71	7025.356778			

```

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
0.955512      6.916024      2.282326      33.00056

```

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
xltemp	1	1128.410471	1128.410471	216.63	<.0001
x2solv	1	2224.146408	2224.146408	426.98	<.0001
xltemp*x2solv	1	228.345042	228.345042	43.84	<.0001
xltemp*xltemp	1	544.280022	544.280022	104.49	<.0001
x2solv*x2solv	1	1227.217669	1227.217669	235.60	<.0001
FAj	6	1360.416365	226.736061	43.53	<.0001

```

*****
Rendimento Global - PLE
The GLM Procedure
Dependent Variable: Rendimento Global - PLE

```

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	5352.399613	1070.479923	42.23	<.0001
Error	66	1672.957165	25.347836		
Corrected Total	71	7025.356778			

```

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
0.761869      15.25630      5.034663      33.00056

```

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
xltemp	1	1128.410471	1128.410471	44.52	<.0001

x2solv	1	2224.146408	2224.146408	87.75	<.0001
x1temp*x2solv	1	228.345042	228.345042	9.01	0.0038
x1temp*x1temp	1	544.280022	544.280022	21.47	<.0001
x2solv*x2solv	1	1227.217669	1227.217669	48.42	<.0001

Parameter	Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	43.35905556	1.21598674	35.66	<.0001
x1temp	0.79144444	0.79605018	0.99	0.3237
x2solv	-5.83166667	0.79605018	-7.33	<.0001
x1temp*x2solv	1.95083333	0.64997225	3.00	0.0038
x1temp*x1temp	-2.74944444	0.59334078	-4.63	<.0001
x2solv*x2solv	-8.75791667	1.25866586	-6.96	<.0001

\*\*\*\*\*

**Relatório D3. Teste de comparação entre médias dos resultados de Rendimento Global obtidos por PLE.**

Rendimento Global - PLE

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Rendimento Global - PLE

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 60  
 Error Mean Square 5.209013  
 Critical Value of Studentized Range 4.80850  
 Minimum Significant Difference 4.4803  
 Means with the same letter are not significantly different.

Group	Mean	N	FAj
A	41.913	6	6
A	40.825	6	7
A	40.153	6	4
A	39.962	6	11
AB	39.463	6	8
AB	38.952	6	3
BC	35.310	6	2
C	33.155	6	5
C	33.138	6	1
D	24.678	6	12
E	17.538	6	10
F	10.918	6	9

\*\*\*\*\*

**Relatório D4. ANOVA com teste de comparação entre médias dos resultados de Rendimento Global obtidos por EUT**

Rendimento Global - EUT

The GLM Procedure

Class Level Information

Class Levels Values  
 Solv 3 0 50 100  
 Number of observations 9

Rendimento Global - EUT

The GLM Procedure

Dependent Variable: Rendimento Global - EUT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	599.8176222	299.9088111	1070.72	<.0001
Error	6	1.6806000	0.2801000		
Corrected Total	8	601.4982222			

Source	DF	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Solv	2	0.997206	2.721830	0.529245	19.44444	599.8176222	299.9088111	1070.72	<.0001

\*\*\*\*\*

Rendimento Global - EUT

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Rendimento Global - PLE

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.  
 Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 6  
 Error Mean Square 0.2801  
 Critical Value of Studentized Range 4.33902  
 Minimum Significant Difference 1.3258  
 Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Solv
A	28.6333	3	50
B	20.9033	3	0
C	8.7967	3	100

\*\*\*\*\*

**Relatório D5. ANOVA dos resultados de Rendimento de Filantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por PLE.**

Filantina por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
x1temp	4	-2 -1 0 1
x2solv	3	-1 0 1

Number of observations 24

\*\*\*\*\*

Filantina por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Dependent Variable: Filantina por grama de amostra

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	43.76704583	3.97882235	46.71	<.0001
Error	12	1.02225000	0.08518750		
Corrected Total	23	44.78929583			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.977176	10.36068	0.291869	2.817083

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	3	0.91347917	0.30449306	3.57	0.0470
x2solv	2	41.70215833	20.85107917	244.77	<.0001
x1temp*x2solv	6	1.15140833	0.19190139	2.25	0.1090

\*\*\*\*\*

Filantina por grama de extrato - PLE

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
x1temp	4	-2 -1 0 1
x2solv	3	-1 0 1

Number of observations 24

\*\*\*\*\*

Filantina por grama de extrato - PLE

The GLM Procedure

Dependent Variable: Filantina por grama de extrato

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	1003.080683	91.189153	27.86	<.0001
Error	12	39.276700	3.273058		
Corrected Total	23	1042.357383			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.962319	18.45297	1.809160	9.804167

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	3	114.5059500	38.1686500	11.66	0.0007
x2solv	2	617.5842333	308.7921167	94.34	<.0001
x1temp*x2solv	6	270.9905000	45.1650833	13.80	<.0001

\*\*\*\*\*

**Relatório D6. ANOVA dos resultados de Rendimento de Nirantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por PLE.**

Nirantina por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
x1temp	4	-2 -1 0 1
x2solv	3	-1 0 1

Number of observations 24

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nirantina por grama de amostra

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	31.81380000	2.89216364	35.72	<.0001
Error	12	0.97160000	0.08096667		
Corrected Total	23	32.78540000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.970365	16.98785	0.284546	1.675000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	3	0.40143333	0.13381111	1.65	0.2297
x2solv	2	31.14557500	15.57278750	192.34	<.0001
x1temp*x2solv	6	0.26679167	0.04446528	0.55	0.7620

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de extrato - PLE

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
x1temp	4	-2 -1 0 1
x2solv	3	-1 0 1

Number of observations 24

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de extrato - PLE

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nirantina por grama de extrato - PLE

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	500.6701458	45.5154678	30.74	<.0001
Error	12	17.7699500	1.4808292		
Corrected Total	23	518.4400958			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.965724	20.69400	1.216893	5.880417

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	3	50.6996125	16.8998708	11.41	0.0008
x2solv	2	354.1075083	177.0537542	119.56	<.0001
x1temp*x2solv	6	95.8630250	15.9771708	10.79	0.0003

\*\*\*\*\*

**Relatório D7. ANOVA dos resultados Soma de Lignanas por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por PLE.**

Soma de Lignanas por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
x1temp	4	-2 -1 0 1
x2solv	3	-1 0 1

Number of observations 24

\*\*\*\*\*

Soma de Lignanas por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Dependent Variable: Soma de Lignanas por grama de amostra - PLE

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	149.1934458	13.5630405	46.61	<.0001
Error	12	3.4915500	0.2909625		
Corrected Total	23	152.6849958			

```

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
0.977132      12.00800      0.539409      4.492083

Source          DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
xltemp          3          2.2723458      0.7574486        2.60      0.1002
x2solv          2          144.7931583      72.3965792      248.82     <.0001
xltemp*x2solv   6          2.1279417      0.3546569        1.22     0.3615

*****
Soma de Lignanas por grama de extrato - PLE
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels      Values
xltemp          4          -2 -1 0 1
x2solv          3          -1 0 1
Number of observations      24
*****
Soma de Lignanas por grama de extrato - PLE
The GLM Procedure
Dependent Variable: Soma de Lignanas por grama de extrato - PLE
Sum of
Source          DF      Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model           11      2892.739946      262.976359      34.41     <.0001
Error           12          91.713850        7.642821
Corrected Total 23      2984.453796

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
0.969269      17.62600      2.764565      15.68458

Source          DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
xltemp          3          313.933379      104.644460      13.69     0.0004
x2solv          2          1898.608758      949.304379      124.21     <.0001
xltemp*x2solv   6          680.197808      113.366301      14.83     <.0001
*****

```

**Relatório D8. Análise de Regressão dos resultados de rendimento de Filantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por PLE.**

```

Filantina por grama de amostra - PLE
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels      Values
FAj            12          1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Number of observations      24
*****
Filantina por grama de amostra - PLE
The GLM Procedure
Dependent Variable: Filantina por grama de amostra - PLE
Sum of
Source          DF      Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model           11      43.76704583      3.97882235      46.71     <.0001
Error           12          1.02225000      0.08518750
Corrected Total 23      44.78929583

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
0.977176      10.36068      0.291869      2.817083

Source          DF      Type III SS      Mean Square      F Value      Pr > F
x2solv          0          0.00000000      .                .          .
x2solv*x2solv   0          0.00000000      .                .          .
FAj             9          2.06488750      0.22943194      2.69      0.0563
*****
Filantina por grama de amostra - PLE
The GLM Procedure
Dependent Variable: Filantina por grama de amostra - PLE
Sum of
Source          DF      Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model           2          41.70215833      20.85107917      141.84     <.0001
Error           21          3.08713750      0.14700655
Corrected Total 23      44.78929583

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
0.931074      13.61033      0.383414      2.817083

```

```

Source              DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
x2solv              1      10.72562500     10.72562500     72.96      <.0001
x2solv*x2solv      1      30.97653333     30.97653333     210.72     <.0001

Parameter              Estimate      Standard
                        Error      t Value      Pr > |t|
Intercept              4.423750000     0.13555744     32.63      <.0001
x2solv                 0.818750000     0.09585358     8.54      <.0001
x2solv*x2solv         -2.410000000     0.16602327     -14.52     <.0001
*****

Filantina por grama de extrato - PLE
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels      Values
Trat           12       1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Number of observations      24
*****

Filantina por grama de extrato - PLE
The GLM Procedure
Dependent Variable: filext

Source              DF      Sum of
                        Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model              11      1003.080683     91.189153     27.86      <.0001
Error              12      39.276700      3.273058
Corrected Total    23      1042.357383

R-Square          Coeff Var      Root MSE      Mean
0.962319          18.45297      1.809160      9.804167

Source              DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
x2solv              1      601.9662250     601.9662250     183.92     <.0001
x2solv*x2solv      1      15.6180083     15.6180083     4.77      0.0495
Trat                9      385.4964500     42.8329389     13.09     <.0001
*****

Filantina por grama de extrato - PLE
The GLM Procedure
Dependent Variable: Filantina por grama de extrato - PLE

Source              DF      Sum of
                        Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model              2      617.584233     308.792117     15.27     <.0001
Error              21      424.773150     20.227293
Corrected Total    23      1042.357383

R-Square          Coeff Var      Root MSE      Mean
0.592488          45.87311      4.497476      9.804167

Source              DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
x2solv              1      601.9662250     601.9662250     29.76     <.0001
x2solv*x2solv      1      15.6180083     15.6180083     0.77      0.3895

Parameter              Estimate      Standard
                        Error      t Value      Pr > |t|
Intercept              10.94500000     1.59009799     6.88      <.0001
x2solv                 6.13375000     1.12436907     5.46      <.0001
x2solv*x2solv         -1.71125000     1.94746435     -0.88     0.3895
*****

```

**Relatório D9. Análise de Regressão dos resultados de rendimento de Nirantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por PLE.**

```

Nirantina por grama de amostra - PLE
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels      Values
Trat           12       1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Number of observations      24
*****

Nirantina por grama de amostra - PLE
The GLM Procedure
Dependent Variable: Nirantina por grama de amostra - PLE

Source              DF      Sum of
                        Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model              11      31.81380000     2.89216364     35.72     <.0001

```

```
Error                12      0.97160000      0.08096667
Corrected Total      23      32.78540000
```

```
          R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
          0.970365      16.98785      0.284546      1.675000
```

```
Source                DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
x2solv                1      9.71880625      9.71880625      120.03      <.0001
x2solv*x2solv        1      21.42676875      21.42676875      264.64      <.0001
Trat                  9      0.66822500      0.07424722      0.92      0.5419
```

\*\*\*\*\*  
Nirantina por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nirantina por grama de amostra - PLE

```
Source                DF      Sum of
                    Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model                2      31.14557500      15.57278750      199.43      <.0001
Error                21      1.63982500      0.07808690
Corrected Total      23      32.78540000
```

```
          R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
          0.949983      16.68301      0.279440      1.675000
```

```
Source                DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
x2solv                1      9.71880625      9.71880625      124.46      <.0001
x2solv*x2solv        1      21.42676875      21.42676875      274.40      <.0001
```

```
Parameter              Estimate      Standard
                    Error      t Value      Pr > |t|
Intercept              3.011250000      0.09879708      30.48      <.0001
x2solv                 0.779375000      0.06986009      11.16      <.0001
x2solv*x2solv         -2.004375000      0.12100122      -16.56      <.0001
```

\*\*\*\*\*  
Nirantina por grama de extrato - PLE

The GLM Procedure

Class Level Information

```
Class      Levels      Values
FAj         12      1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Number of observations      24
```

\*\*\*\*\*  
Nirantina por grama de extrato - PLE

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nirantina por grama de extrato - PLE

```
Source                DF      Sum of
                    Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model                11      500.6701458      45.5154678      30.74      <.0001
Error                12      17.7699500      1.4808292
Corrected Total      23      518.4400958
```

```
          R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
          0.965724      20.69400      1.216893      5.880417
```

```
Source                DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
x2solv                1      324.4501563      324.4501563      219.10      <.0001
x2solv*x2solv        1      29.6573521      29.6573521      20.03      0.0008
FAj                   9      146.5626375      16.2847375      11.00      0.0002
```

\*\*\*\*\*  
Nirantina por grama de extrato - PLE

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nirantina por grama de extrato - PLE

```
Source                DF      Sum of
                    Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model                2      354.1075083      177.0537542      22.63      <.0001
Error                21      164.3325875      7.8253613
Corrected Total      23      518.4400958
```

```
          R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
          0.683025      47.57120      2.797385      5.880417
```

```
Source                DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
x2solv                1      324.4501563      324.4501563      41.46      <.0001
x2solv*x2solv        1      29.6573521      29.6573521      3.79      0.0651
```

```
Parameter              Estimate      Standard
                    Error      t Value      Pr > |t|
Intercept              7.452500000      0.98902485      7.54      <.0001
```

```

x2solv          4.503125000      0.69934618      6.44      <.0001
x2solv*x2solv  -2.358125000      1.21130312     -1.95      0.0651
*****

```

**Relatório D10.** Teste de comparação entre médias dos resultados de rendimento de Filantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por PLE.

Filantina por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Filantina por grama de amostra - PLE

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

```

Alpha          0.05
Error Degrees of Freedom      12
Error Mean Square          0.085187
Critical Value of Studentized Range  5.61464
Minimum Significant Difference      1.1588
Means with the same letter are not significantly different.

```

Tukey Grouping	Mean	N	Trat
A	4.8850	2	6
A	4.5150	2	7
B	4.2000	2	8
B A C	4.0950	2	5
B D C	3.1650	2	12
D C	3.0000	2	10
E D	2.5850	2	9
E D	2.5800	2	11
E F	1.5150	2	3
E F	1.4750	2	4
F	1.0150	2	2
F	0.7750	2	1

\*\*\*\*\*

Filantina por grama de extrato - PLE

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Filantina por grama de extrato - PLE

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

```

Alpha          0.05
Error Degrees of Freedom      12
Error Mean Square          3.273058
Critical Value of Studentized Range  5.61464
Minimum Significant Difference      7.1826
Means with the same letter are not significantly different.

```

Tukey Grouping	Mean	N	Trat
A	26.075	2	9
B	15.520	2	10
C B	12.835	2	12
C B	11.330	2	5
C B	11.330	2	6
C B D	10.695	2	7
C B D	10.425	2	8
C E D	7.040	2	11
E D	3.815	2	3
E D	3.585	2	4
E	2.830	2	2
E	2.170	2	1

\*\*\*\*\*

**Relatório D11.** Teste de comparação entre médias dos resultados de rendimento de Nirantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por PLE.

Nirantina por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Nirantina por grama de amostra - PLE

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

```

Alpha          0.05
Error Degrees of Freedom      12
Error Mean Square          0.080967

```

Critical Value of Studentized Range 5.61464  
 Minimum Significant Difference 1.1297

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Trat
A	3.2400	2	6
A	3.0200	2	7
A	2.9550	2	8
B A	2.8300	2	5
B A C	2.1700	2	10
B C	1.7850	2	12
C	1.6100	2	11
C	1.5800	2	9
D	0.3500	2	3
D	0.2150	2	2
D	0.2150	2	4
D	0.1300	2	1

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de extrato - PLE

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Nirantina por grama de extrato - PLE

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 12  
 Error Mean Square 1.480829  
 Critical Value of Studentized Range 5.61464  
 Minimum Significant Difference 4.8313

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	FAj
A	15.650	2	9
B A	11.265	2	10
B C	7.830	2	5
B C	7.490	2	6
B C	7.335	2	8
B C	7.155	2	7
B C	7.095	2	12
D C	4.380	2	11
D	0.875	2	3
D	0.605	2	2
D	0.520	2	4
D	0.365	2	1

\*\*\*\*\*

**Relatório D12. Teste de comparação entre médias dos resultados de Soma de Lignanas por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por PLE.**

\*\*\*\*\*

Soma de Lignanas por grama de amostra - PLE

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Soma de Lignanas por grama de amostra - PLE

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 12  
 Error Mean Square 0.290963  
 Critical Value of Studentized Range 5.61464  
 Minimum Significant Difference 2.1415

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	FAj
A	8.1250	2	6
A	7.5350	2	7
B A	7.1550	2	8
B A C	6.9250	2	5
B D C	5.1700	2	10
D C	4.9500	2	12
D	4.1900	2	11
D	4.1650	2	9
E	1.8650	2	3

```

E          1.6900      2    4
E          1.2300      2    2
E          0.9050      2    1

```

\*\*\*\*\*

Soma de Lignanas por grama de extrato - PLE

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Soma de Lignanas por grama de extrato - PLE

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally

has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05

Error Degrees of Freedom 12

Error Mean Square 7.642821

Critical Value of Studentized Range 5.61464

Minimum Significant Difference 10.976

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	FAj
A	41.725	2	9
B	26.785	2	10
C B	19.930	2	12
C B	19.160	2	5
C B	18.820	2	6
C B	17.850	2	7
C B	17.760	2	8
C D	11.420	2	11
D	4.690	2	3
D	4.105	2	4
D	3.435	2	2
D	2.535	2	1

\*\*\*\*\*

**Relatório D13. ANOVA com teste de comparação entre médias dos resultados de Filantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por EUT.**

Filantina por grama de amostra - EUT

The GLM Procedure

Class Level Information

```

Class          Levels  Values
Solv           3      0 50 100
Number of observations 9

```

\*\*\*\*\*

Filantina por grama de amostra - EUT

The GLM Procedure

Dependent Variable: Filantina por grama de amostra - EUT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	122.8932667	61.4466333	921.85	<.0001
Error	6	0.3999333	0.0666556		
Corrected Total	8	123.2932000			

```

R-Square      Coeff Var      Root MSE      filamo Mean
0.996756      4.100223      0.258177      6.296667

```

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Solv	2	122.8932667	61.4466333	921.85	<.0001

\*\*\*\*\*

Filantina por grama de amostra - EUT

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Filantina por grama de amostra - EUT

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally

has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05

Error Degrees of Freedom 6

Error Mean Square 0.066656

Critical Value of Studentized Range 4.33902

Minimum Significant Difference 0.6468

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Solv
A	9.1733	3	100

```

                A      8.6367      3      50
                B      1.0800      3      0
*****
Filantina por grama de extrato - EUT
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
Solv           3      0 50 100
Number of observations      9
*****
Filantina por grama de extrato - EUT
The GLM Procedure
Dependent Variable: filext

                Sum of
Source          DF      Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model           2      16035.09816      8017.54908      274.62      <.0001
Error           6       175.17180       29.19530
Corrected Total 8      16210.26996

                R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
                0.989194      11.58947      5.403268      46.62222

Source          DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
Solv            2      16035.09816      8017.54908      274.62      <.0001
*****
Filantina por grama de extrato - EUT
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Filantina por grama de extrato - EUT
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally
      has a higher Type II error rate than REGWQ.
      Alpha                                0.05
      Error Degrees of Freedom              6
      Error Mean Square                     29.1953
      Critical Value of Studentized Range   4.33902
      Minimum Significant Difference        13.536
      Means with the same letter are not significantly different.

      Tukey Grouping      Mean      N      Solv
                A      104.543      3      100
                B       30.167      3      50
                C        5.157      3      0
*****

```

**Relatório D14. ANOVA com teste de comparação entre médias dos resultados de Nirantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por EUT.**

```

Nirantina por grama de amostra - EUT
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
Solv           3      0 50 100
Number of observations      9
*****
Nirantina por grama de amostra - EUT
The GLM Procedure
Dependent Variable: Nirantina por grama de amostra - EUT

                Sum of
Source          DF      Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model           2      0.33726667      0.16863333      1084.07      <.0001
Error           6      0.00093333      0.00015556
Corrected Total 8      0.33820000

                R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
                0.997240      3.529865      0.012472      0.353333

Source          DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
Solv            2      0.33726667      0.16863333      1084.07      <.0001
*****
Nirantina por grama de amostra - EUT
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Nirantina por grama de amostra - EUT

```

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 6  
 Error Mean Square 0.000156  
 Critical Value of Studentized Range 4.33902  
 Minimum Significant Difference 0.0312

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Solv
A	0.50333	3	100
A	0.47667	3	50
B	0.08000	3	0

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de extrato - EUT

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Solv	3	0 50 100

Number of observations 9

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de extrato - EUT

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nirantina por grama de extrato - EUT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	47.62708889	23.81354444	336.67	<.0001
Error	6	0.42440000	0.07073333		
Corrected Total	8	48.05148889			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.991168	10.23350	0.265957	2.598889

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Solv	2	47.62708889	23.81354444	336.67	<.0001

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de extrato - EUT

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Nirantina por grama de extrato - EUT

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 6  
 Error Mean Square 0.070733  
 Critical Value of Studentized Range 4.33902  
 Minimum Significant Difference 0.6663

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Solv
A	5.7667	3	100
B	1.6567	3	50
C	0.3733	3	0

\*\*\*\*\*

**Relatório D15. ANOVA com teste de comparação entre médias dos resultados de Soma de Lignanas por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por EUT.**

Soma de Lignanas por grama de amostra - EUT

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Solv	3	0 50 100

Number of observations 9

\*\*\*\*\*

Soma de Lignanas por grama de amostra - EUT

The GLM Procedure

Dependent Variable: Soma de Lignanas por grama de amostra - EUT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	136.2276222	68.1138111	925.32	<.0001
Error	6	0.4416667	0.0736111		
Corrected Total	8	136.6692889			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
Solv	0.996768	4.080587	0.271314	6.648889

Source DF Type I SS Mean Square F Value Pr > F  
Solv 2 136.2276222 68.1138111 925.32 <.0001

\*\*\*\*\*

Soma de Lignanas por grama de amostra - EUT  
The GLM Procedure  
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Soma de Lignanas por grama de amostra - EUT  
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 6  
Error Mean Square 0.073611  
Critical Value of Studentized Range 4.33902  
Minimum Significant Difference 0.6797  
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Solv
A	9.6800	3	100
A	9.1100	3	50
B	1.1567	3	0

\*\*\*\*\*

Soma de Lignanas por grama de extrato - EUT  
The GLM Procedure  
Class Level Information  
Class Levels Values  
Solv 3 0 50 100  
Number of observations 9

\*\*\*\*\*

Soma de Lignanas por grama de extrato - EUT  
The GLM Procedure  
Dependent Variable: Soma de Lignanas por grama de extrato - EUT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	17828.24909	8914.12454	277.71	<.0001
Error	6	192.59420	32.09903		
Corrected Total	8	18020.84329			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	somext Mean
Solv	0.989313	11.51051	5.665601	49.22111

Source DF Type I SS Mean Square F Value Pr > F  
Solv 2 17828.24909 8914.12454 277.71 <.0001

\*\*\*\*\*

Soma de Lignanas por grama de extrato - EUT  
The GLM Procedure  
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Soma de Lignanas por grama de extrato - EUT  
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 6  
Error Mean Square 32.09903  
Critical Value of Studentized Range 4.33902  
Minimum Significant Difference 14.193  
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Solv
A	110.307	3	100
B	31.823	3	50
C	5.533	3	0

\*\*\*\*\*

**Relatório D16. ANOVA dos resultados de Rendimento Global obtidos por SFE1.**

Rendimento Global - SFE1  
The GLM Procedure  
Class Level Information  
Class Levels Values  
x1temp 3 -1 0 1  
x2pre 3 -1 0 1

```

Number of observations      18
*****
Rendimento Global - SFE1
The GLM Procedure
Dependent Variable: Rendimento Global - SFE1

Source              DF          Sum of
                    Squares    Mean Square  F Value    Pr > F
Model                8      22.70654444      2.83831806   150.49    <.0001
Error                9       0.16975000      0.01886111
Corrected Total     17      22.87629444

                    R-Square    Coeff Var    Root MSE    Mean
                    0.992580     7.188263     0.137336     1.910556

Source              DF          Type I SS    Mean Square  F Value    Pr > F
xltemp              2       0.15271111     0.07635556    4.05    0.0557
x2pre               2      21.52421111    10.76210556   570.60    <.0001
xltemp*x2pre       4       1.02962222     0.25740556   13.65    0.0007
*****

```

**Relatório D17. ANOVA dos resultados de Rendimento de Filantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por SFE1.**

```

Filantina por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
xltemp         3      -1 0 1
x2pre          3      -1 0 1
Number of observations      18
*****
Filantina por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Dependent Variable: Filantina por grama de amostra - SFE1

Source              DF          Sum of
                    Squares    Mean Square  F Value    Pr > F
Model                8      67.27391111     8.40923889   137.61    <.0001
Error                9       0.55000000     0.06111111
Corrected Total     17      67.82391111

                    R-Square    Coeff Var    Root MSE    Mean
                    0.991891     7.518958     0.247207     3.287778

Source              DF          Type I SS    Mean Square  F Value    Pr > F
xltemp              2      3.84947778     1.92473889   31.50    <.0001
x2pre               2     59.37527778    29.68763889   485.80    <.0001
xltemp*x2pre       4      4.04915556     1.01228889   16.56    0.0004
*****

```

```

Filantina por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
xltemp         3      -1 0 1
x2pre          3      -1 0 1
Number of observations      18
*****
Filantina por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Dependent Variable: Filantina por grama de extrato - SFE1

Source              DF          Sum of
                    Squares    Mean Square  F Value    Pr > F
Model                8     120244.7062    15030.5883   239.87    <.0001
Error                9      563.9570      62.6619
Corrected Total     17     120808.6632

                    R-Square    Coeff Var    Root MSE    Mean
                    0.995332     5.377180     7.915926    147.2133

Source              DF          Type I SS    Mean Square  F Value    Pr > F
xltemp              2     38794.06423    19397.03212   309.55    <.0001
x2pre               2     48595.45703    24297.72852   387.76    <.0001
xltemp*x2pre       4     32855.18493     8213.79623   131.08    <.0001
*****

```

**Relatório D18.** ANOVA dos resultados de Rendimento de Nirantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por SFE1.

```

Nirantina por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
xltemp         3      -1 0 1
x2pre          3      -1 0 1
Number of observations    18
*****
Nirantina por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Dependent Variable: Nirantina por grama de amostra - SFE1

Source          DF          Sum of Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model            8      15.90050000      1.98756250     223.18    <.0001
Error            9        0.08015000      0.00890556
Corrected Total  17      15.98065000

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
0.994985      5.991698      0.094369      1.575000

Source          DF          Type I SS    Mean Square    F Value    Pr > F
xltemp         2        1.97213333      0.98606667     110.72    <.0001
x2pre          2       12.70143333      6.35071667     713.12    <.0001
xltemp*x2pre   4        1.22693333      0.30673333      34.44    <.0001
*****
Nirantina por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
FAj            9      1 2 3 4 5 6 7 8 9
Number of observations    18
*****
Nirantina por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Dependent Variable: Nirantina por grama de extrato - SFE1

Source          DF          Sum of Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model            8     34493.48111     4311.68514     852.61    <.0001
Error            9        45.51345        5.05705
Corrected Total  17     34538.99456

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
0.998682      2.854255      2.248789      78.78722

Source          DF          Type I SS    Mean Square    F Value    Pr > F
xltemp         2     10320.75888     5160.37944     1020.43    <.0001
x2pre          2     13672.22681     6836.11341     1351.80    <.0001
xltemp*x2pre   4     10500.49542     2625.12386     519.10    <.0001
*****

```

**Relatório D19.** ANOVA dos resultados de Soma de Lignanas por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por SFE1.

```

Soma de Lignanas por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
xltemp         3      -1 0 1
x2pre          3      -1 0 1
Number of observations    18
*****
Soma de Lignanas por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Dependent Variable: Soma de Lignanas por grama de amostra - SFE1

Source          DF          Sum of Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model            8     142.5238111     17.8154764     170.73    <.0001

```

```

Error                9          0.9391500        0.1043500
Corrected Total      17          143.4629611

                R-Square    Coeff Var      Root MSE      Mean
                0.993454    6.642963      0.323033      4.862778

Source              DF          Type I SS      Mean Square    F Value    Pr > F
xltemp              2           10.0404778      5.0202389     48.11     <.0001
x2pre               2          125.7498778     62.8749389    602.54     <.0001
xltemp*x2pre       4           6.7334556      1.6833639     16.13     0.0004
*****
Soma de Lignanas por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class              Levels    Values
xltemp              3        -1 0 1
x2pre               3        -1 0 1
Number of observations 18
*****
Soma de Lignanas por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Dependent Variable: Soma de Lignanas por grama de extrato - SFE1

Source              DF          Sum of Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model                8          283078.4705      35384.8088     760.47     <.0001
Error                9           418.7729        46.5303
Corrected Total      17          283497.2435

                R-Square    Coeff Var      Root MSE      Mean
                0.998523    3.018273      6.821314      226.0006

Source              DF          Type I SS      Mean Square    F Value    Pr > F
xltemp              2          89053.4964      44526.7482     956.94     <.0001
x2pre               2          113758.3071     56879.1536    1222.41     <.0001
xltemp*x2pre       4           80266.6670      20066.6667     431.26     <.0001
*****

```

**Relatório D20. Teste de comparação entre médias dos resultados de Rendimento Global obtidos por SFE1.**

```

Rendimento Global - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class              Levels    Values
FAj                9        1 2 3 4 5 6 7 8 9
Number of observations 18
*****
Rendimento Global - SFE1
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Rendimento Global - SFE1

```

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

```

Alpha                0.05
Error Degrees of Freedom 9
Error Mean Square    0.018861
Critical Value of Studentized Range 5.59471
Minimum Significant Difference 0.5433
Means with the same letter are not significantly different.

```

```

Tukey Grouping      Mean      N    FAj
                   A      2.9950  2     9
                   A      2.9750  2     6
                   B      2.7750  2     3
                   B      2.5850  2     8
                   B      2.3500  2     2
                   B      2.3450  2     5
                   C      0.9800  2     1
                   D      0.1250  2     4
                   D      0.0650  2     7

```

\*\*\*\*\*

**Relatório D21.** Teste de comparação entre médias dos resultados de Rendimento de Filantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por SFE1.

```
Filantina por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
FAj            9      1 2 3 4 5 6 7 8 9
Number of observations  18
*****
```

```
Filantina por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Filantina por grama de amostra - SFE1
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally
      has a higher Type II error rate than REGWQ.
      Alpha                                0.05
      Error Degrees of Freedom              9
      Error Mean Square                     0.061111
      Critical Value of Studentized Range   5.59471
      Minimum Significant Difference        0.978
```

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping		Mean	N	FAj
	A	5.3000	2	6
B	A	4.8550	2	3
B	A	4.5950	2	2
B	A	4.3600	2	5
B		4.2750	2	9
B		4.0000	2	8
	C	2.2050	2	1
	D	0.0000	2	4
	D	0.0000	2	7

```
*****
Filantina por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
FAj            9      1 2 3 4 5 6 7 8 9
Number of observations  18
*****
```

```
Filantina por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Filantina por grama de extrato - SFE1
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally
      has a higher Type II error rate than REGWQ.
      Alpha                                0.05
      Error Degrees of Freedom              9
      Error Mean Square                     5.05705
      Critical Value of Studentized Range   5.59471
      Minimum Significant Difference        8.8963
```

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping		Mean	N	FAj
	A	121.950	2	2
	A	120.545	2	1
	B	101.475	2	6
C	B	96.315	2	5
C	B	94.545	2	3
C	D	89.935	2	8
	D	84.320	2	9
	E	0.000	2	4
	E	0.000	2	7

```
*****
```

**Relatório D22.** Teste de comparação entre médias dos dos resultados de Rendimento de Nirantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por SFE1.

```
Nirantina por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
```

```

Class Level Information
Class          Levels  Values
FAj            9      1 2 3 4 5 6 7 8 9
Number of observations  18
*****
Nirantina por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Nirantina por grama de amostra - SFE1
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally
      has a higher Type II error rate than REGWQ.
      Alpha                               0.05
      Error Degrees of Freedom             9
      Error Mean Square                    0.008906
      Critical Value of Studentized Range  5.59471
      Minimum Significant Difference       0.3733
  
```

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	FAj
A	2.49000	2	3
A	2.40500	2	2
A	2.29000	2	5
A	2.26500	2	9
A	2.12000	2	8
B	1.42500	2	6
B	1.18000	2	1
C	0.00000	2	4
C	0.00000	2	7

```

*****
Nirantina por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
FAj            9      1 2 3 4 5 6 7 8 9
Number of observations  18
*****
Nirantina por grama de extrato - SFE1
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Nirantina por grama de extrato - SFE1
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally
      has a higher Type II error rate than REGWQ.
      Alpha                               0.05
      Error Degrees of Freedom             9
      Error Mean Square                    5.05705
      Critical Value of Studentized Range  5.59471
      Minimum Significant Difference       8.8963
      Means with the same letter are not significantly different.
  
```

Tukey Grouping	Mean	N	FAj
A	121.950	2	2
A	120.545	2	1
B	101.475	2	6
C B	96.315	2	5
C B	94.545	2	3
C D	89.935	2	8
D	84.320	2	9
E	0.000	2	4
E	0.000	2	7

**Relatório D23.** Teste de comparação entre médias dos resultados de Soma de Lignanas por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por SFE1.

```

Soma de lignanas por grama de amostra - SFE1
The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels  Values
FAj            9      1 2 3 4 5 6 7 8 9
Number of observations  18
*****
Soma de lignanas por grama de amostra - SFE1
  
```

The GLM Procedure  
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Soma de lignanas por grama de amostra - SFE1  
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally  
 has a higher Type II error rate than REGWQ.  
 Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 9  
 Error Mean Square 0.10435  
 Critical Value of Studentized Range 5.59471  
 Minimum Significant Difference 1.2779  
 Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	FAj
A	7.3450	2	3
A	7.0000	2	2
A	6.7250	2	6
A	6.6500	2	5
A	6.5400	2	9
A	6.1200	2	8
B	3.3850	2	1
C	0.0000	2	4
C	0.0000	2	7

\*\*\*\*\*

Soma de lignanas por grama de extrato - SFE1

The GLM Procedure  
 Class Level Information  
 Class Levels Values  
 FAj 9 1 2 3 4 5 6 7 8 9  
 Number of observations 18

\*\*\*\*\*

Soma de lignanas por grama de extrato - SFE1

The GLM Procedure  
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Soma de lignanas por grama de extrato - SFE1  
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally  
 has a higher Type II error rate than REGWQ.  
 Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 9  
 Error Mean Square 46.53033  
 Critical Value of Studentized Range 5.59471  
 Minimum Significant Difference 26.986  
 Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	FAj
A	350.300	2	2
A	345.580	2	1
B	280.230	2	5
B	279.270	2	3
B	273.015	2	6
C B	263.085	2	8
C	242.525	2	9
D	0.000	2	4
D	0.000	2	7

\*\*\*\*\*

**Relatório D24. ANOVA dos resultados de Rendimento Global obtidos por SFE2.**

Rendimento Global - SFE2

The GLM Procedure  
 Class Level Information  
 Class Levels Values  
 x1temp 3 -1 0 1  
 x2pre 3 -1 0 1  
 Number of observations 18

\*\*\*\*\*

Rendimento Global - SFE2

The GLM Procedure  
 Dependent Variable: Rendimento Global - SFE2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	115.9368444	14.4921056	8.38	0.0022
Error	9	15.5626000	1.7291778		
Corrected Total	17	131.4994444			

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean

	0.881653	3.600170	1.314982	36.52556	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	2	66.01831111	33.00915556	19.09	0.0006
x2pre	2	12.83737778	6.41868889	3.71	0.0667
x1temp*x2pre	4	37.08115556	9.27028889	5.36	0.0173

**Relatório D25. Teste de comparação entre médias dos resultados de Rendimento Global obtidos por SFE2.**

```

*****
Rendimento Global - SFE2
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Rendimento Global - SFE2
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally
      has a higher Type II error rate than REGWQ.
      Alpha                                0.05
      Error Degrees of Freedom              9
      Error Mean Square                     1.729178
      Critical Value of Studentized Range   5.59471
      Minimum Significant Difference        5.2021
Means with the same letter are not significantly different.

      Tukey Grouping      Mean      N      FAj
      A                   40.980    2      7
      B A                  39.050    2      9
      B A                  38.900    2      4
      B A C                 37.480    2      8
      B C                   35.510    2      3
      B C                   35.420    2      2
      B C                   34.150    2      5
      B C                   34.080    2      6
      C                     33.160    2      1
*****

```

**Relatório D26. ANOVA dos resultados de Rendimento de Filantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por SFE2.**

```

Filantina por grama de amostra - SFE2
The GLM Procedure
Class Level Information
x1temp      3      -1 0 1
x2pre      3      -1 0 1
Number of observations      18
*****
Filantina por grama de amostra - SFE2
The GLM Procedure
Dependent Variable: Filantina por grama de amostra - SFE2
Sum of
Source      DF      Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
Model      8      8.41637778      1.05204722      0.76      0.6486
Error      9      12.54025000      1.39336111
Corrected Total      17      20.95662778

      R-Square      Coeff Var      Root MSE      Mean
      0.401609      14.79928      1.180407      7.976111

Source      DF      Type I SS      Mean Square      F Value      Pr > F
x1temp      2      3.77254444      1.88627222      1.35      0.3062
x2pre      2      1.08001111      0.54000556      0.39      0.6895
x1temp*x2pre      4      3.56382222      0.89095556      0.64      0.6476
*****
Filantina por grama de extrato - SFE2
The GLM Procedure
Class Level Information
x1temp      3      -1 0 1
x2pre      3      -1 0 1
Number of observations      18
*****

```

Filantina por grama de extrato - SFE2

The GLM Procedure

Dependent Variable: Filantina por grama de extrato - SFE2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	111.1684000	13.8960500	1.13	0.4284
Error	9	111.1542000	12.3504667		
Corrected Total	17	222.3226000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.500032	15.97178	3.514323	22.00333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	2	83.80493333	41.90246667	3.39	0.0798
x2pre	2	2.62963333	1.31481667	0.11	0.9001
x1temp*x2pre	4	24.73383333	6.18345833	0.50	0.7365

\*\*\*\*\*

**Relatório D27. ANOVA dos resultados de Rendimento de Nirantina por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por SFE2.**

Nirantina por grama de amostra - SFE2

The GLM Procedure

Class Level Information

x1temp	3	-1 0 1
x2pre	3	-1 0 1

Number of observations 18

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de amostra - SFE2

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nirantina por grama de amostra - SFE2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	2.64184444	0.33023056	0.78	0.6333
Error	9	3.82220000	0.42468889		
Corrected Total	17	6.46404444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.408698	14.43548	0.651682	4.514444

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	2	1.40587778	0.70293889	1.66	0.2443
x2pre	2	0.40047778	0.20023889	0.47	0.6387
x1temp*x2pre	4	0.83548889	0.20887222	0.49	0.7424

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de extrato - SFE2

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
x1temp	3	-1 0 1
x2pre	3	-1 0 1

Number of observations 18

\*\*\*\*\*

Nirantina por grama de extrato - SFE2

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nirantina por grama de extrato - SFE2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	37.61884444	4.70235556	1.19	0.3953
Error	9	35.41960000	3.93551111		
Corrected Total	17	73.03844444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.515055	15.92855	1.983812	12.45444

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	2	30.13447778	15.06723889	3.83	0.0626
x2pre	2	1.92807778	0.96403889	0.24	0.7878
x1temp*x2pre	4	5.55628889	1.38907222	0.35	0.8358

\*\*\*\*\*

**Relatório D28.** ANOVA dos resultados de Soma de Lignanas por grama de amostra e por grama de extrato obtidos por SFE2.

Soma de Lignanas por grama de amostra - SFE2  
 The GLM Procedure  
 Class Level Information

Class	Levels	Values
x1temp	3	-1 0 1
x2pre	3	-1 0 1
Number of observations		18

\*\*\*\*\*  
Soma de Lignanas por grama de amostra - SFE2

The GLM Procedure

Dependent Variable: Soma de Lignanas por grama de amostra - SFE2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	20.38324444	2.54790556	0.77	0.6406
Error	9	29.90765000	3.32307222		
Corrected Total	17	50.29089444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.405307	14.59446	1.822930	12.49056

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	2	9.79014444	4.89507222	1.47	0.2796
x2pre	2	2.75321111	1.37660556	0.41	0.6728
x1temp*x2pre	4	7.83988889	1.95997222	0.59	0.6786

\*\*\*\*\*  
Soma de Lignanas por grama de extrato - SFE2

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
x1temp	3	-1 0 1
x2pre	3	-1 0 1
Number of observations		18

\*\*\*\*\*  
Soma de Lignanas por grama de amostra - SFE2

The GLM Procedure

Dependent Variable: Soma de Lignanas por grama de amostra - SFE2

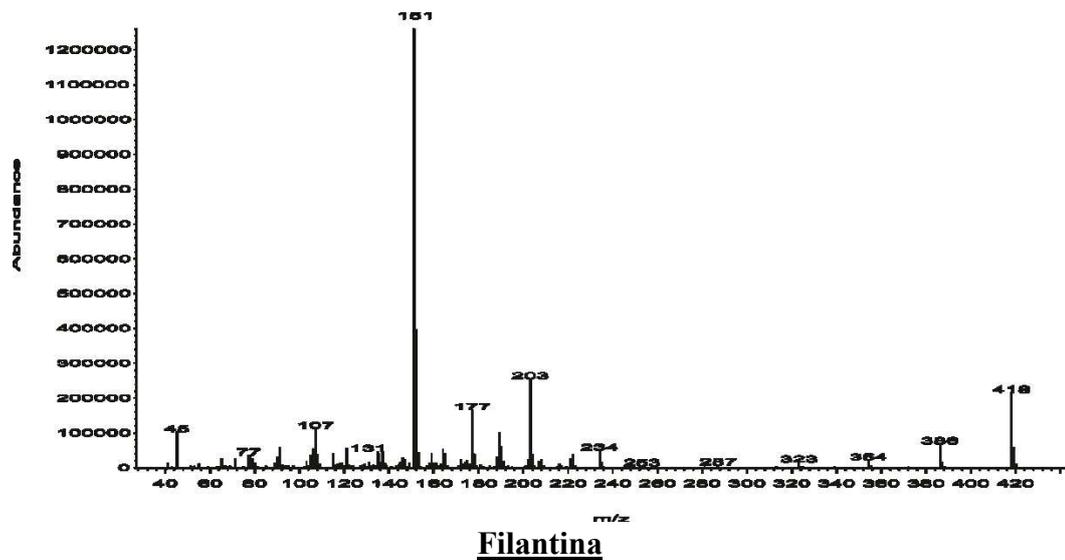
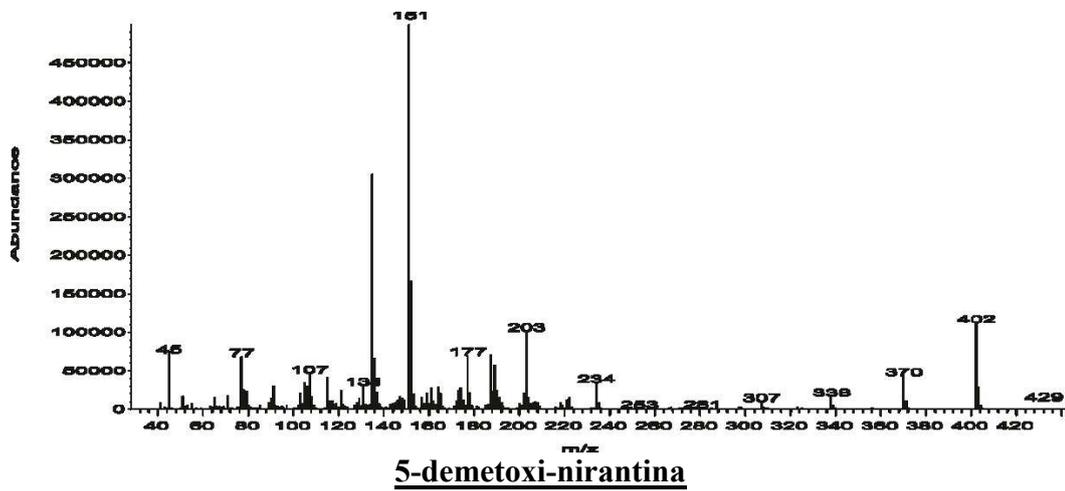
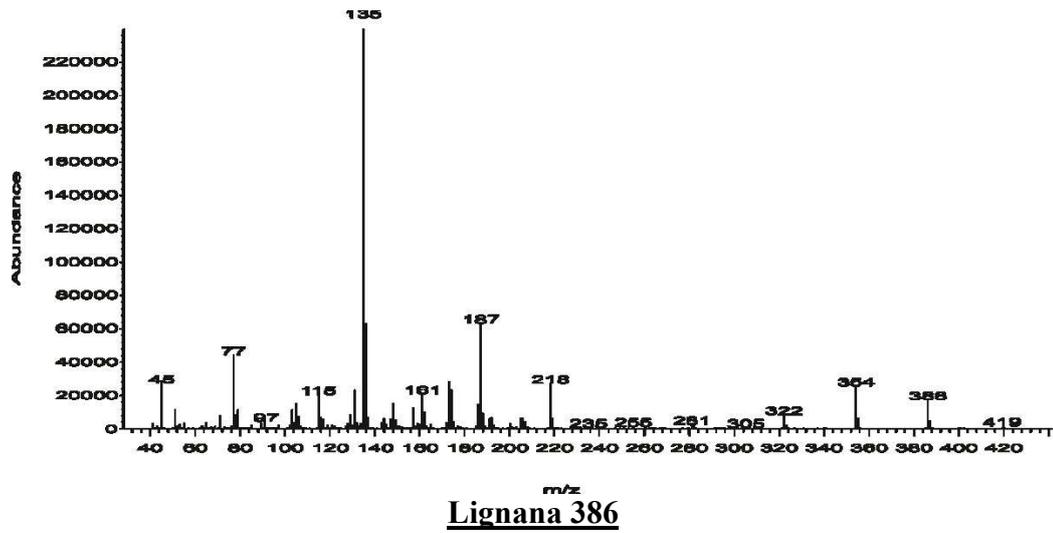
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	277.1669111	34.6458639	1.16	0.4136
Error	9	269.7942500	29.9771389		
Corrected Total	17	546.9611611			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.506740	15.88967	5.475138	34.45722

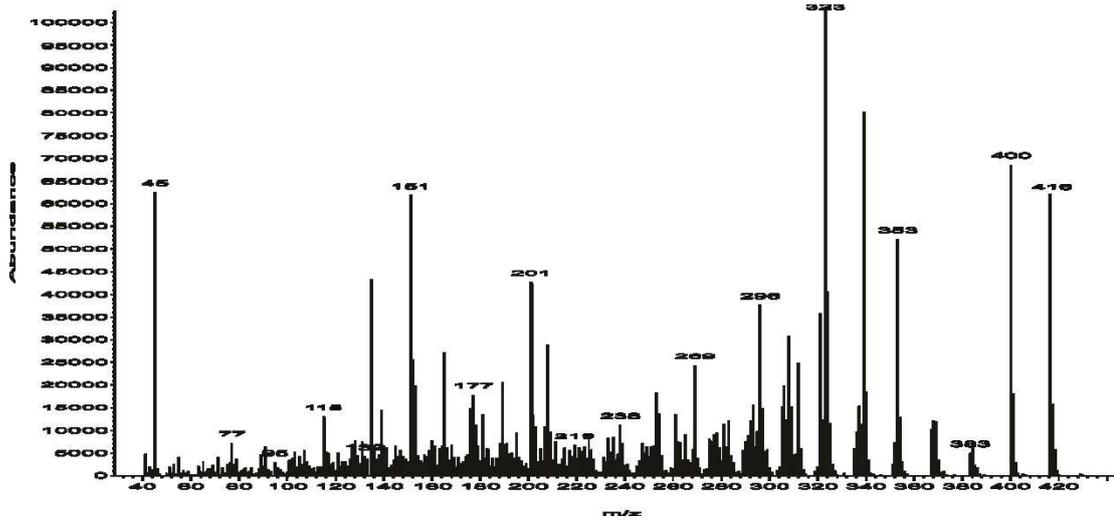
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
x1temp	2	214.4940778	107.2470389	3.58	0.0719
x2pre	2	9.0244111	4.5122056	0.15	0.8624
x1temp*x2pre	4	53.6484222	13.4121056	0.45	0.7722

\*\*\*\*\*

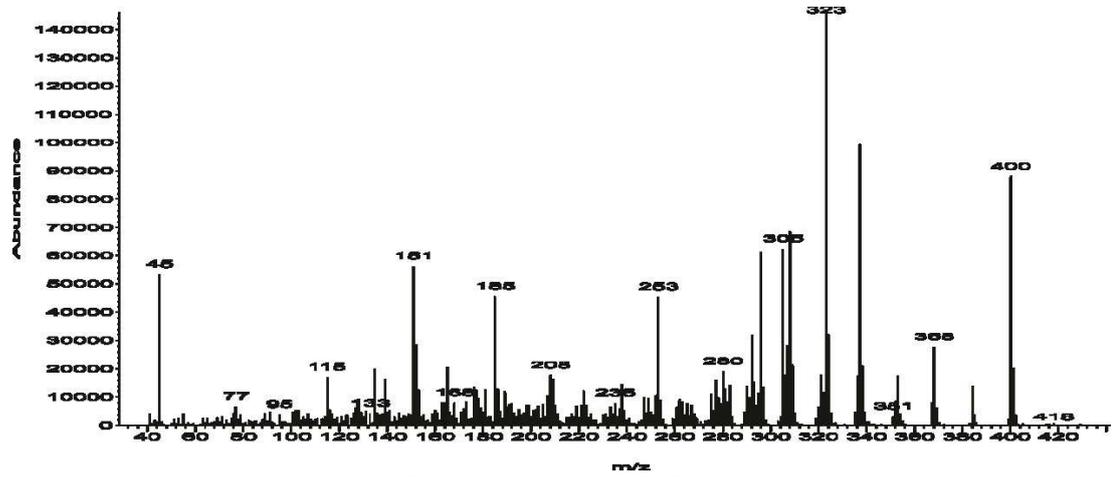
**APÊNDICE E – Fragmentogramas das lignanas obtidos por CG/EM**



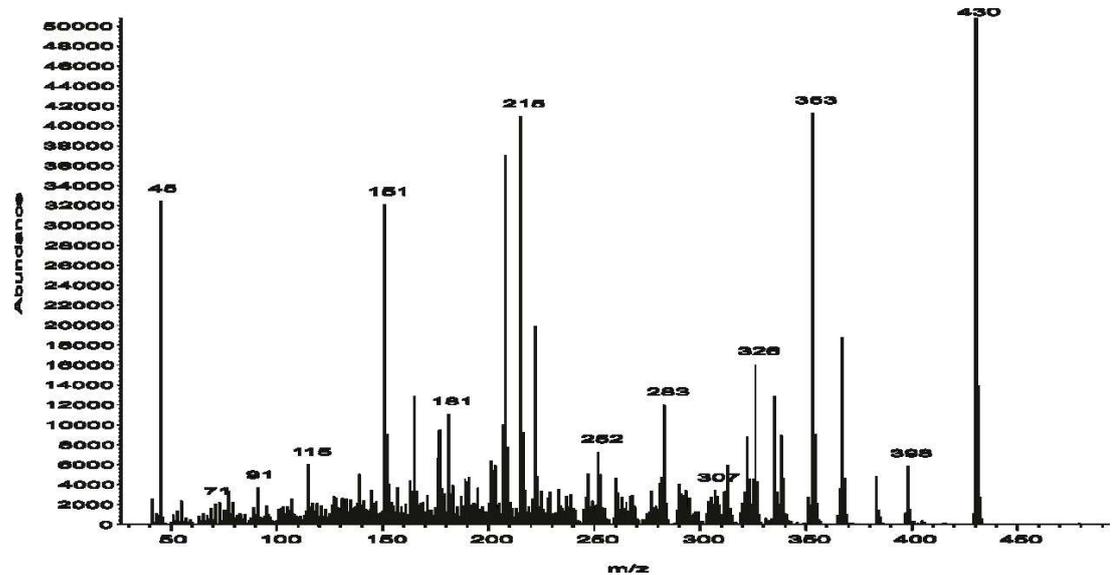
*Fragmentogramas das lignanas obtidos por CG/EM*



Filtetralina

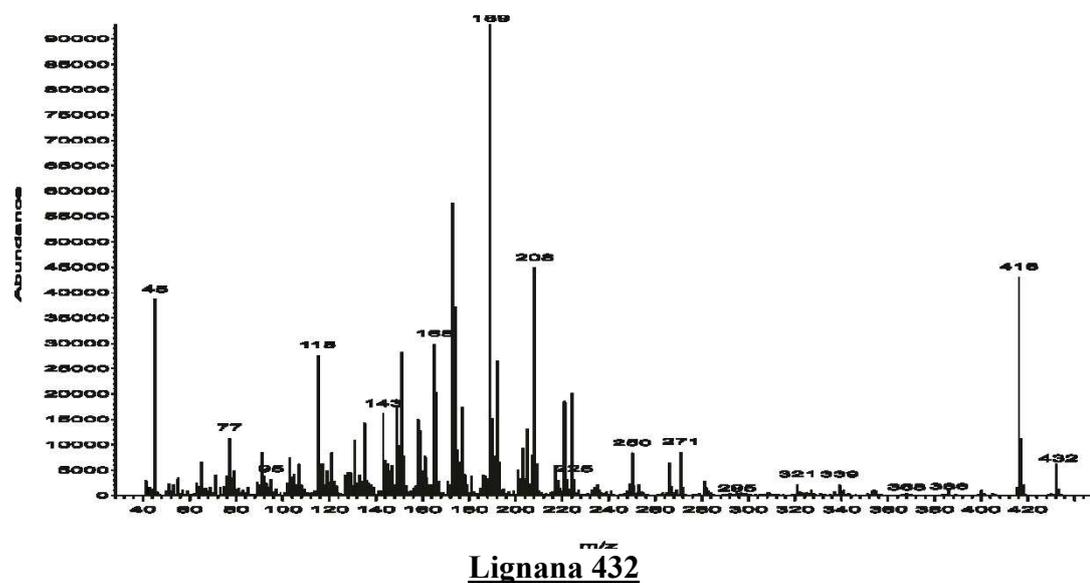
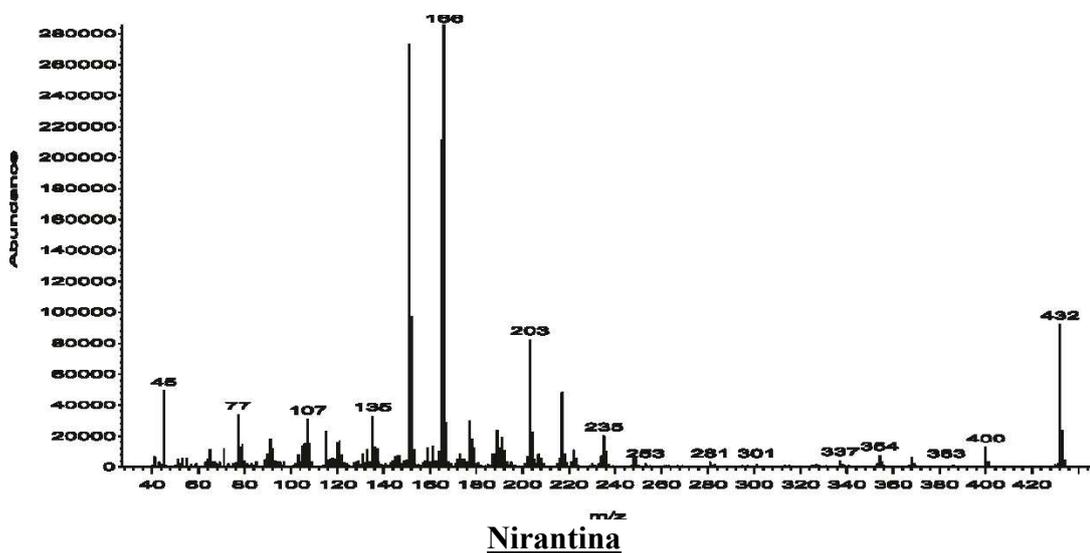
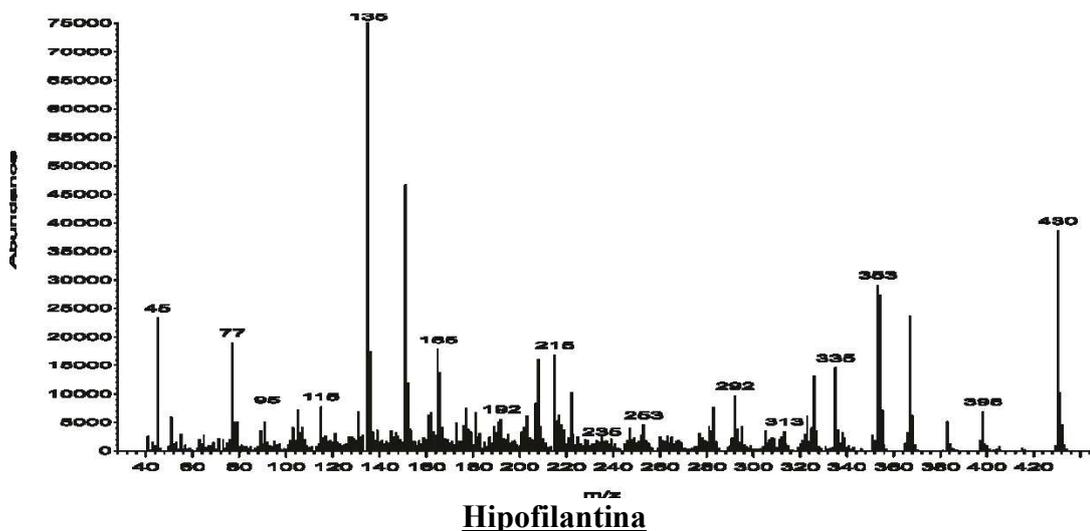


5-demetoxi-nirtetralina

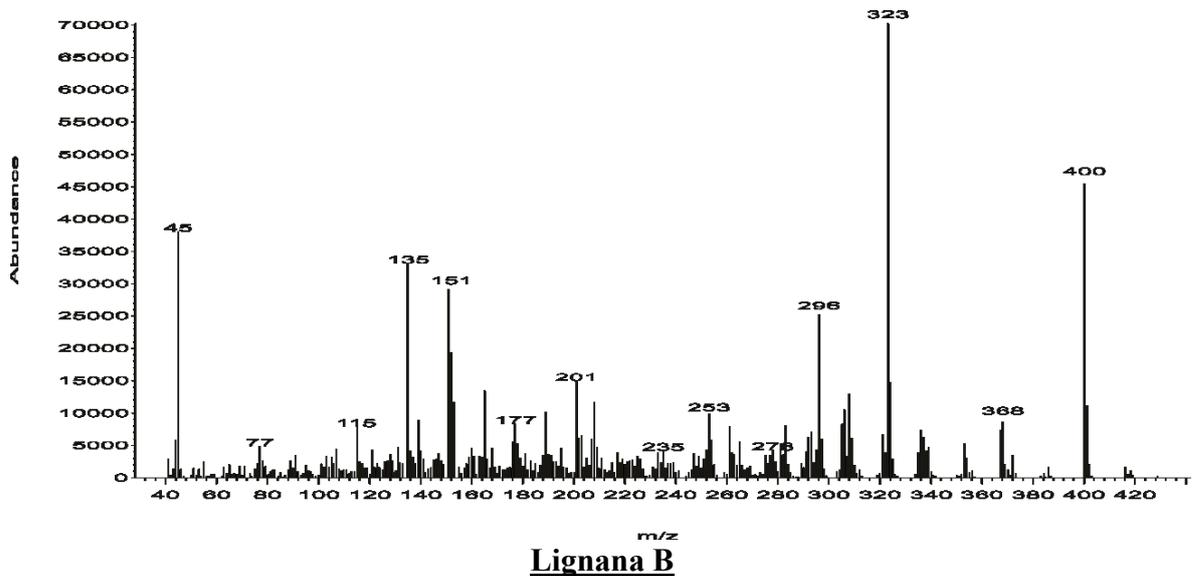
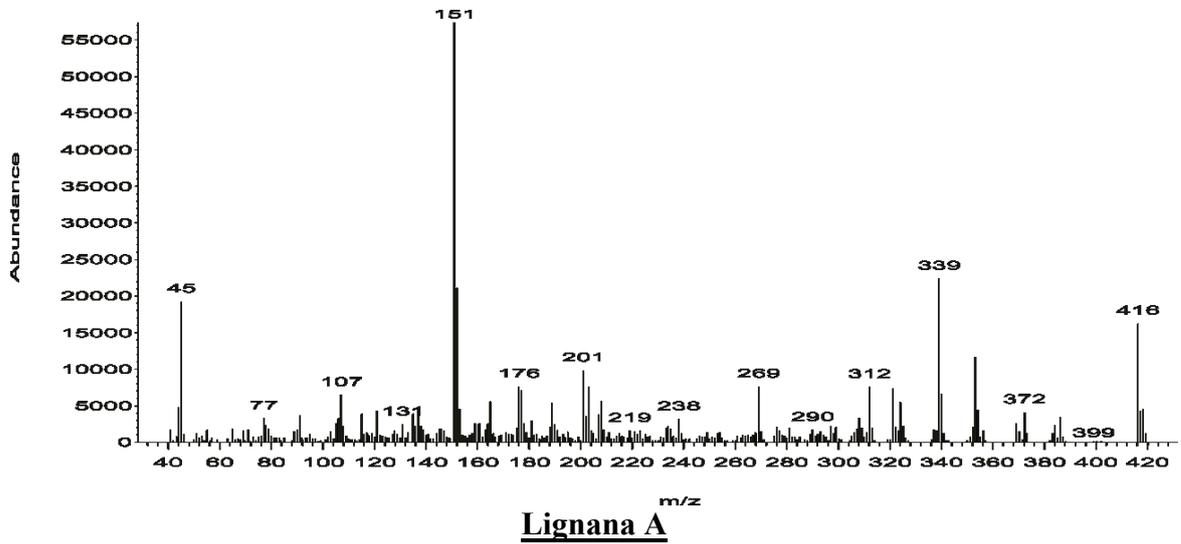
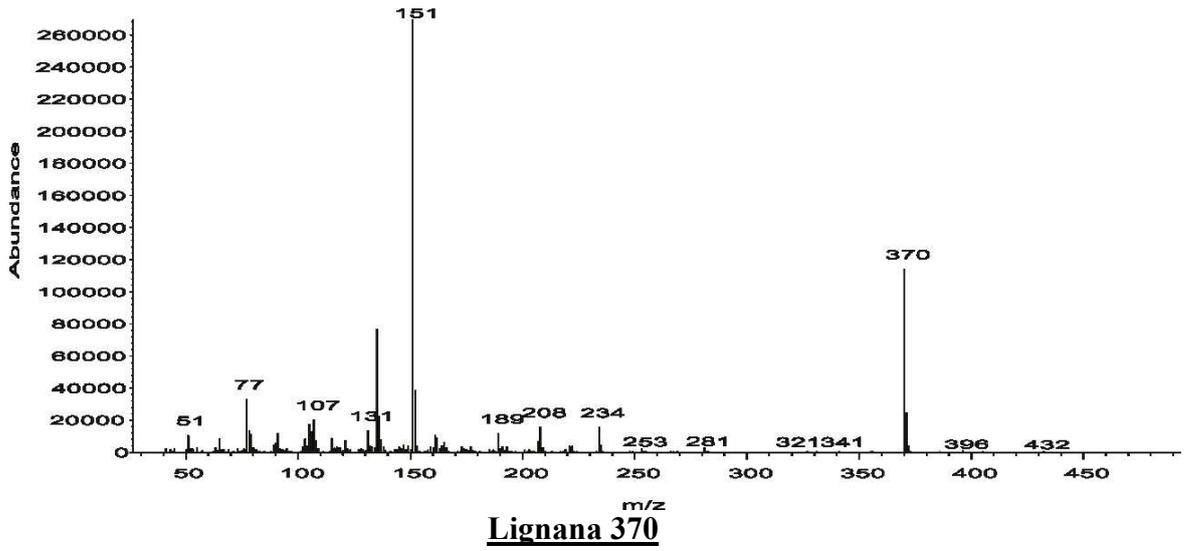


Nirtetralina

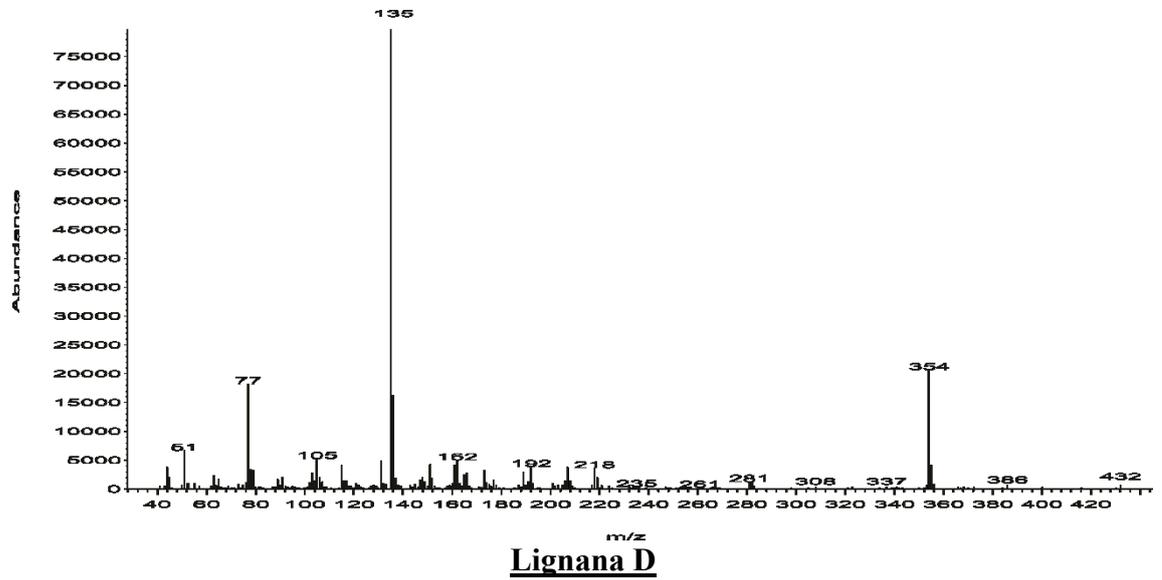
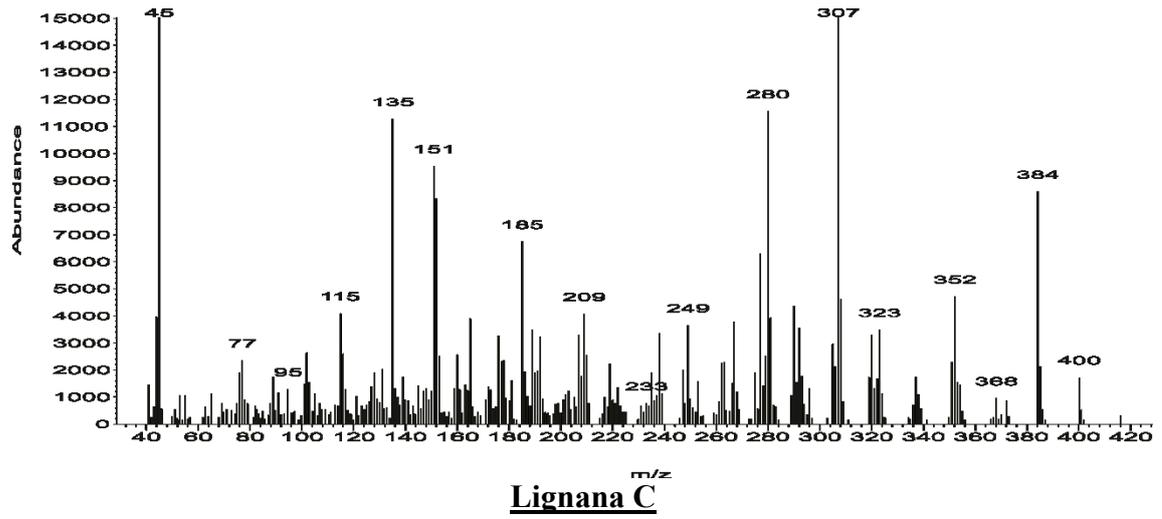
*Fragmentogramas das lignanas obtidos por CG/EM*



*Fragmentogramas das lignanas obtidos por CG/EM*



*Fragmentogramas das lignanas obtidos por CG/EM*



APÊNDICE F – Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD

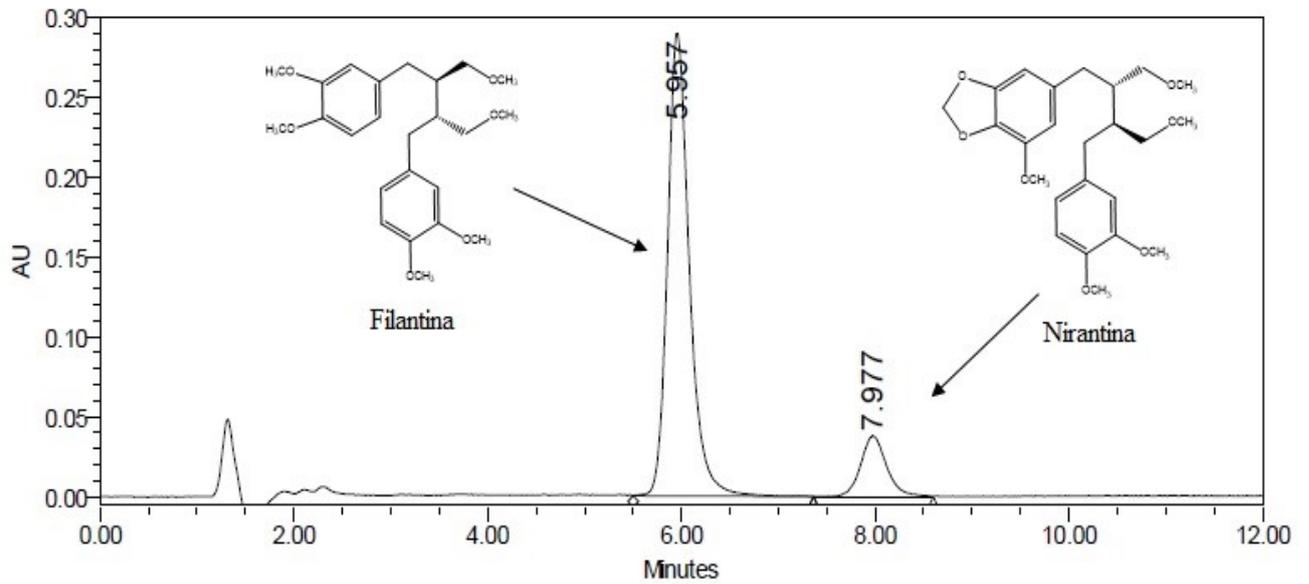


Figura F1. Cromatograma típico obtido por HPLC-DAD à 232 nm dos padrões de Filantina ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e Nirantina ( $9,92 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

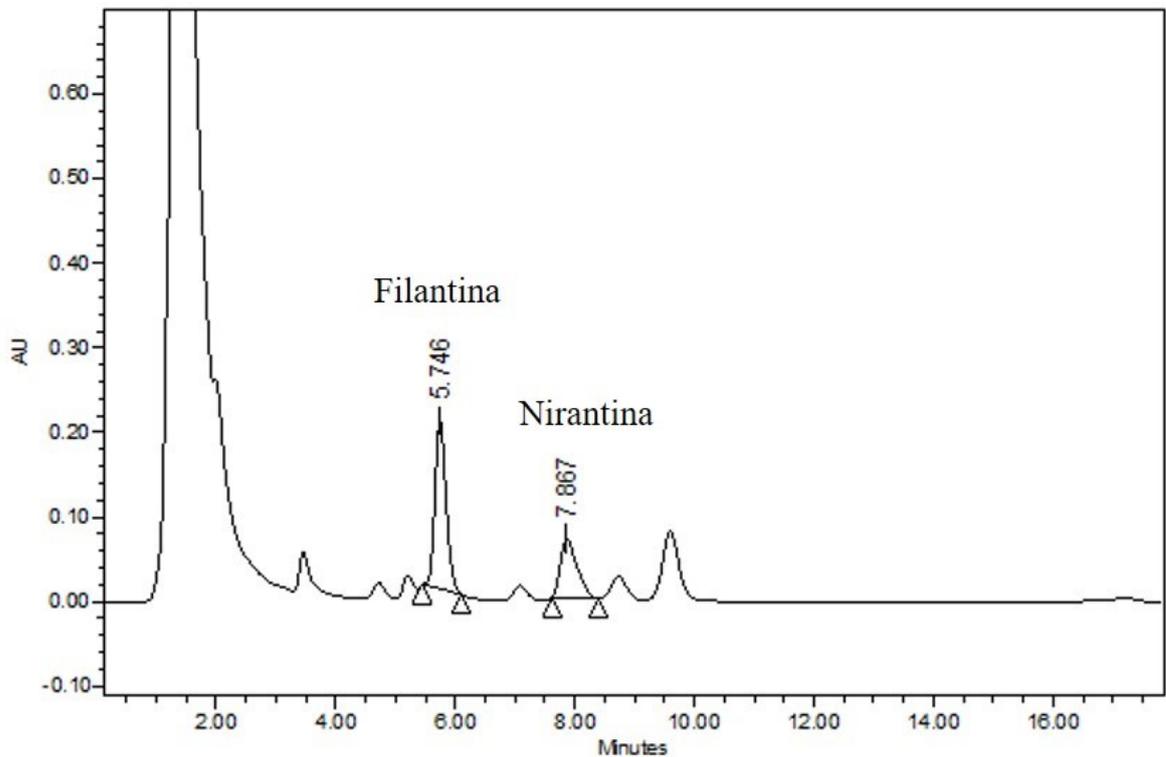


Figura F2. Cromatograma típico obtido por HPLC-DAD à 232 nm dos extratos de *P. amarus* por PLE, com EtOH 50%(v/v) como solvente.

## Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD

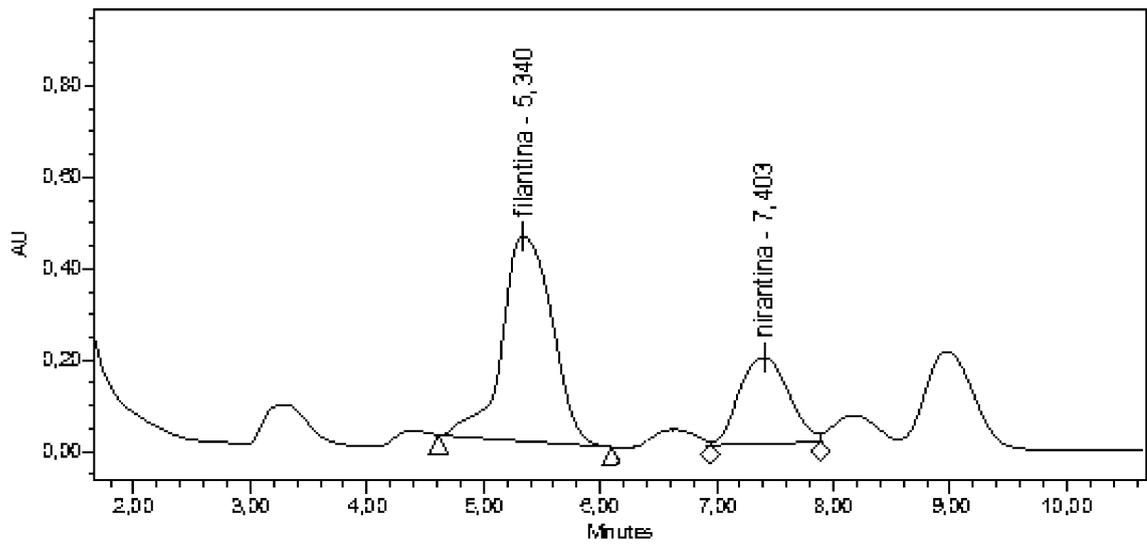


Figura F3. Cromatograma típico obtido por HPLC-DAD à 232 nm dos extratos de *P. amarus* por EUT, com EtOH 50%(v/v) como solvente.

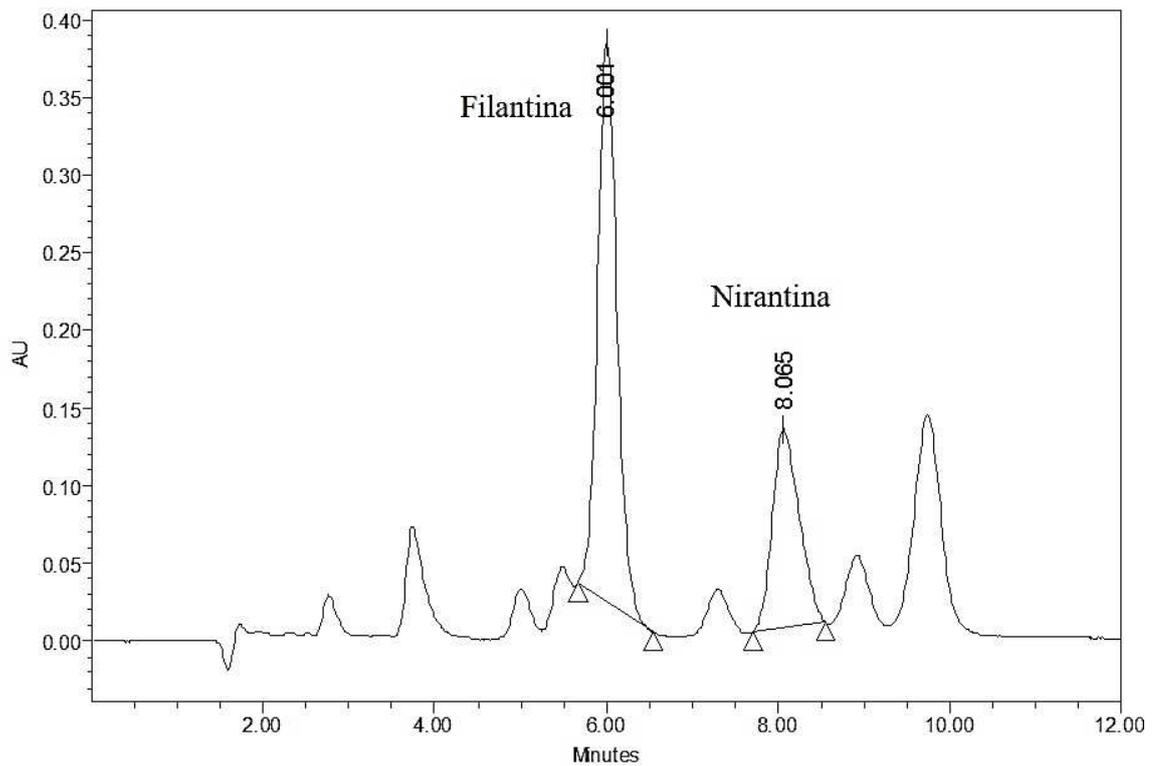


Figura F4. Cromatograma típico obtido por HPLC-DAD à 232 nm dos extratos de *P. amarus* por SFE1.

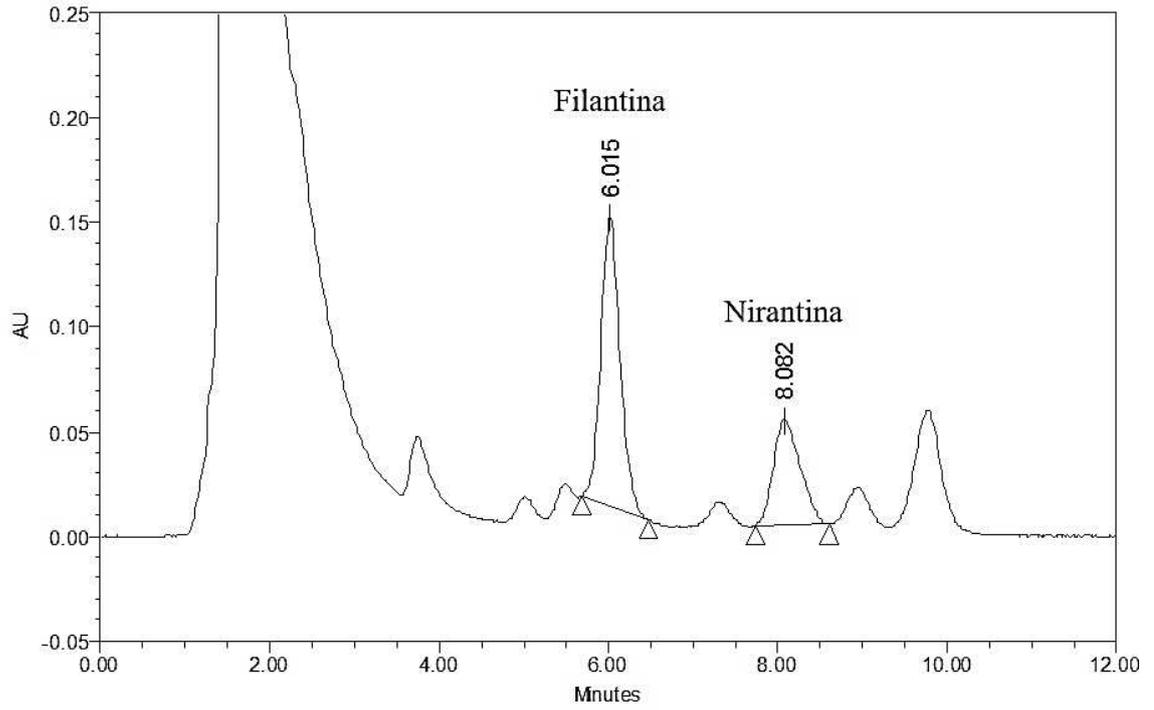


Figura F5. Cromatograma típico obtido por HPLC-DAD à 232 nm dos extratos de *P. amarus* por SFE2, com EtOH 50%(v/v) como cossolvente.

**APÊNDICE G – Relatório do SuperPro Designer**

**EXECUTIVE SUMMARY**

Process	Total Capital Investment (US\$)	Operating Cost (\$/yr)	Cost Basis Annual Rate (kg/yr)
PLE-Etanol50%	1.548.000,00	4.402.000,00	25.329,00
PLE-Etanol	1.567.000,00	4.606.000,00	7.852,00
SFE1-10MPa	1.548.000,00	5.618.000,00	734,55
SFE1-20MPa	1.554.000,00	5.683.000,00	1.773,00
SFE2	1.871.000,00	5.848.000,00	25.329,00

**COSTS OF RAW MATERIAL**

Process	Material	Unit Cost (\$)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (\$)	%
PLE-Etanol50%	Quebra-pedra	48,39	76.755,00	3.714.174,00	90,95
	Ethanol	8,12	35.307,30	286.695,00	7,02
	Water	2,35	35.307,30	82.972,00	2,03
PLE-Etanol	Quebra-pedra	48,39	76.755,00	3.714.174,00	86,63
	Ethanol	8,12	70.614,60	573.391,00	13,37
SFE1-10MPa	Quebra-pedra	48,39	76.339,08	3.714.174,00	70,05
	CO <sub>2</sub>	4,88	325.339,08	1.587.655,00	29,95
SFE1-20MPa	Quebra-pedra	48,39	76339,08	3714174,00	70,05
	CO <sub>2</sub>	4,88	325339,08	1587655,00	29,95
SFE2	Quebra-pedra	48,39	76.755,00	3.714.174,00	67,91
	CO <sub>2</sub>	4,88	325.339,08	1.587.655,00	29,03
	Ethanol	8,12	20.415,00	165.770,00	3,03
	Water	2,35	678,00	159.300,00	0,03

# ANEXO

08/11/2016

Rightslink® by Copyright Clearance Center



## RightsLink®

[Home](#)[Account Info](#)[Help](#)

**Title:** Extraction of lignans from Phyllanthus amarus Schum. & Thonn using pressurized liquids and low pressure methods

**Author:** Rúbner Gonçalves Pereira, Vera Lúcia Garcia, Marili Villa Nova Rodrigues, Julian Martínez

**Publication:** Separation and Purification Technology

**Publisher:** Elsevier

**Date:** 28 January 2016

Copyright © 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Logged in as:  
Rúbner Pereira

[Logout](#)

### Order Completed

Thank you for your order:

This Agreement between Rúbner Pereira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

#### Printable details.

License Number	3984360138863
License date	Nov 08, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Separation and Purification Technology
Licensed Content Title	Extraction of lignans from Phyllanthus amarus Schum. & Thonn using pressurized liquids and low pressure methods
Licensed Content Author	Rúbner Gonçalves Pereira, Vera Lúcia Garcia, Marili Villa Nova Rodrigues, Julian Martínez
Licensed Content Date	28 January 2016
Licensed Content Volume	158
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	8
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	print
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	OBTAINING OF LIGNANS FROM Phyllanthus amarus BY PRESSURIZED FLUIDS EXTRACTION METHODS
Expected completion date	Mar 2017
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Rúbner Pereira Rua Monteiro Lobato, 80 Departamento de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas Campinas, São Paulo 13063862 Brazil Attn: Rúbner Pereira
Total	0.00 USD

[ORDER MORE](#)

[CLOSE WINDOW](#)