



**TÁBATA TÁYARA GARMUS DINIZ**

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE PITANGA (*Eugenia uniflora L.*) E DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides Cham.*) POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO USANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO, ETANOL E ÁGUA COMO SOLVENTES**

**CAMPINAS  
2013**





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

**TÁBATA TÁYARA GARMUS DINIZ**

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE PITANGA (*Eugenia uniflora L.*) E DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides Cham.*) POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO USANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO, ETANOL E ÁGUA COMO SOLVENTES**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral**

**Co-Orientadora: Dra. Losiane Cristina Paviani**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA TÁBATA TÁYARA GARMUS DINIZ E ORIENTADA PELO PROF. DR. FERNANDO ANTONIO CABRAL

Assinatura do Orientador

---

**CAMPINAS**  
**2013**

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

D615o      Diniz, Tábata Táyara Garmus, 1988-  
Obtenção de extratos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e de alecrim-  
pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) por extração sequencial em leito fixo usando CO<sub>2</sub>  
supercrítico, etanol e água / Tábata Táyara Garmus Diniz. – Campinas, SP : [s.n.],  
2013.

Orientador: Fernando Antonio Cabral.  
Coorientador: Losiane Cristina Paviani.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Engenharia de Alimentos.

1. Extração supercrítica. 2. Fenóis. 3. Flavonoides. 4. *Eugenia uniflora*. 5.  
*Lippia sidoides*. I. Cabral, Fernando Antonio. II. Paviani, Losiane Cristina. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) and pepper-rosmarin  
(*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO<sub>2</sub>,  
ethanol and water as solvents

**Palavras-chave em inglês:**

Supercritical extraction

Phenols

Flavonoids

*Eugenia uniflora*

*Lippia sidoides*

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Fernando Antonio Cabral [Orientador]

Carmen Lucia Queiroga

Michele Cristiane Mesomo

**Data de defesa:** 21-08-2013

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

## **Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral**  
Orientador  
DEA - FEA / UNICAMP

---

**Dra. Carmen Lucia Queiroga**  
Membro Titular  
CPQBA / UNICAMP

---

**Profa. Dra. Michele Cristiane Mesomo**  
Membro Titular  
Universidade Estadual do Centro – Oeste (UNICENTRO)

---

**Prof. Dr. Julian Martinez**  
Membro Suplente  
DEA - FEA / UNICAMP

---

**Dra. Vera Lucia Garcia Rehder**  
Membro Suplente  
CPQBA – UNICAMP



## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho ao meu marido **Fábio**, que sempre incentivou e contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional.*



## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral**, pela sua valiosa orientação, pelas oportunidades como PED, pelos ensinamentos, aconselhamentos e apoio, essenciais para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico, e pela confiança depositada em mim.

Á minha co-orientadora **Dra. Losiane Cristina Paviani**, pela atenção e dedicação no laboratório e por aperfeiçoar o meu trabalho com sua experiência.

Ao **CPQBA – UNICAMP**, especialmente ao **Dr. Pedro Melillo de Magalhães** pelo fornecimento da matéria-prima e a **Dra. Carmen Lucia Queiroga** pela cooperação na etapa experimental do desenvolvimento deste trabalho.

Aos **professores membros da banca examinadora** pela disponibilidade e atenção dispensada ao trabalho, bem como pelas valiosas contribuições.

Aos meus **professores da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)**, por todos os inestimáveis ensinamentos e por despertarem em mim o amor pela ciência.

Á técnica **Patrícia Tonon de Souza**, pelo auxílio no laboratório e a todos que compõem o **grupo EXTRAE**. Em especial, á **Julia Teixeira de Paula** pela ajuda com o extrator e pelas injeções de otimismo.

Ao **Fábio** pela sua constante colaboração, dedicação e compreensão no decorrer deste trabalho. Obrigada pela paciência e companheirismo.

Aos meus pais, **Nilo e Ivete Garmus**, pela dedicação, sacrifícios e ensinamentos.

Á **Ana Lúcia e Carlos Eduardo Diniz**, por me acolherem como uma filha em Campinas.

Aos meus colegas e **amigos do DEA**, pela amizade e parceria.

Ao **CNPq** e a **FAPESP** pelas bolsas de estudo concedidas, importantes para a minha formação profissional.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xvii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	xxiii
<b>RESUMO</b> .....	xxvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xxxí
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 Objetivos Gerais.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1 Matrizes vegetais .....	4
3.1.1 Pitanga ( <i>Eugenia uniflora</i> L.).....	4
3.1.2 Alecrim-Pimenta ( <i>Lippia sidoides</i> Cham.).....	7
3.2 Compostos Bioativos .....	9
3.3 Processos de extração de compostos bioativos.....	11
3.3.1 Extração com solventes orgânicos e água .....	11
3.3.2 Tecnologia supercrítica .....	12
3.3.2.1 Fluido supercrítico.....	13
3.3.2.2 Processo de extração supercrítica.....	15
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
4.1 Matérias primas.....	18
4.2 Reagentes.....	20
4.3 Caracterização das matrizes vegetais .....	21
4.3.1 Teor total de voláteis e umidade .....	21
4.3.2 Diâmetro médio das partículas .....	22
4.3.3 Densidade real do material triturado .....	22
4.3.4 Densidade aparente do leito de partículas .....	23
4.3.5 Porosidade .....	23
4.4 Metodologia para a obtenção dos extratos .....	23



4.4.1 Tipos de extratos .....	23
4.4.2 Sistema experimental para extração sequencial em leito fixo .....	27
4.4.3 Sistema experimental para extração aquosa ou etanólica em leito fixo em uma única etapa.....	30
4.4.4 Extração etanólica e aquosa convencional .....	31
4.4.5 Determinação do rendimento global de extração.....	32
4.5 Análises químicas dos extratos .....	33
4.5.1 Fenóis totais .....	33
4.5.2 Flavonoides totais .....	34
4.5.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	35
4.6 Análise estatística.....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
5.1 Caracterização das matrizes vegetais .....	36
5.2 Rendimentos e cinéticas de extração.....	38
5.2.1 Rendimentos globais de extração.....	38
5.2.2 Cinéticas de extração sequencial.....	49
5.2.3 Cinéticas de extração etanólica.....	53
5.2.4 Cinéticas de extração aquosa .....	55
5.3 Análise química dos extratos .....	56
5.3.1 Fenóis totais .....	56
5.3.2 Flavonoides totais .....	61
5.4 Caracterização da fração mais volátil (CG-EM).....	65
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>
<b>8 APÊNDICE.....</b>	<b>81</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Propriedades características do gás, líquido e fluido supercrítico. Adaptado de (Brunner, 2005).....	14
<b>Tabela 4.1</b> – Dados obtidos a partir da ficha exsicata das matrizes vegetais.....	20
<b>Tabela 4.2</b> - Especificações técnicas do equipamento e instrumentação da unidade de extração supercrítica.....	30
<b>Tabela 5.1</b> – Resultados das propriedades das partículas livres e do leite.....	36
<b>Tabela 5.2</b> – Rendimento global e concentração e rendimentos de fenóis e flavonoides em extratos de <i>Eugenia uniflora</i> L. e <i>Lippia sidoides</i> Cham.....	39
<b>Tabela 5.3</b> – Composição da fração rica em compostos voláteis da <i>Eugenia uniflora</i> L.....	66
<b>Tabela 5.4</b> – Composição da fração rica em compostos voláteis da <i>Lippia sidoides</i> Cham.....	68



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> – Fotografia das folhas da pitangueira ( <i>Eugenia uniflora</i> L.).....	05
<b>Figura 3.2</b> – Fotografia das folhas de alecrim-pimenta ( <i>Lippia sidoides</i> Cham.).....	07
<b>Figura 3.3</b> – Definição de estado supercrítico de um componente puro. Adaptado de Brunner (1994).....	13
<b>Figura 3.4</b> - Diagrama esquemático do sistema de extração supercrítica.....	16
<b>Figura 3.5</b> - Curva de extração supercrítica com suas etapas: taxa de extração constante (CER); taxa de extração decrescente (FER); período difusional (DC). Adaptado de Brunner (1994).....	17
<b>Figura 4.1</b> - Folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. na planta (pitangueira) (a) e desidratadas (b).....	19
<b>Figura 4.2</b> - Folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham. na planta (a) e desidratadas (b).....	19
<b>Figura 4.3</b> – Fluxograma do processo de extração sequencial em leito fixo para obtenção dos extratos. Primeira etapa: extrato supercrítico (SC) e extrato supercrítico volátil (SC-V), segunda etapa: extrato etanólico pós extração supercrítica (SCE) e na terceira etapa: extrato aquoso pós extração supercrítica (SCA). As vazões dos solventes foram ajustadas a 25 °C e 0,93 bar, sendo suas densidades nessas condições iguais a: $\rho_{CO_2} = 1,65$ g/L, $\rho_{ETANOL} = 0,79$ g/mL e $\rho_{ÁGUA} = 1,0$ g/mL.....	24
<b>Figura 4.4</b> – Fluxograma do processo de extração em leito fixo (etapa única) para obtenção dos extratos. Na extração etanólica: extrato etanólico em leito fixo (ELF) e na extração aquosa: extrato aquoso em leito fixo (ALF). As vazões dos solventes foram ajustadas a 25 °C e 0,93 bar, sendo suas densidades nessas condições iguais a: $\rho_{ETANOL} = 0,79$ g/mL e $\rho_{ÁGUA} = 1,0$ g/mL.....	25
<b>Figura 4.5</b> – Fluxograma do processo de extração convencional (três etapas) para obtenção dos extratos. O extrato etanólico (EC) ou aquoso (AC) são constituídos da mistura dos extratos obtidos em cada etapa.....	26
<b>Figura 4.6</b> – Diagrama esquemático da unidade experimental de extração supercrítica.....	27



<b>Figura 4.7</b> - Esquema da unidade experimental de extração etanólica ou aquosa em etapa única (leito fixo). Sistema parte integrante do sistema apresentado na Figura 4.6.....	31
<b>Figura 4.8</b> - Esquema do sistema para extração etanólica e aquosa convencional e foto do sistema utilizado.....	32
<b>Figura 5.1</b> – Rendimento dos extratos (secos) de pitanga ( <i>E. uniflora</i> ) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....	42
<b>Figura 5.2</b> – Fotografia da região da planta onde foram coletadas as amostras de folhas de pitanga ( <i>E. uniflora</i> ) no CPQBA – UNICAMP.....	43
<b>Figura 5.3</b> – Rendimento dos extratos (secos) alecrim-pimenta ( <i>L. sidoides</i> ) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....	46
<b>Figura 5.4</b> – Comparação entre os rendimentos dos extratos de pitanga ( <i>E. uniflora</i> ) e alecrim-pimenta ( <i>L. sidoides</i> ) dentro dos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....	48
<b>Figura 5.5</b> – Cinética e rendimentos de extração sequencial a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de <i>Eugenia uniflora</i> L. (pitanga). utilizando CO <sub>2</sub> (1,5 L/min*), etanol (0,5 mL/min*) e água (0,5 mL/min*) como solventes. Extrato supercrítico (SC), extrato etanólico pós supercrítico (SCE) e extrato aquoso pós supercrítico (SCA). * Vazões medidas a 0,93 bar e 25 °C.....	50
<b>Figura 5.6</b> – Cinética e rendimentos de extração sequencial a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de <i>Lippia sidoides</i> Cham (alecrim-pimenta). utilizando CO <sub>2</sub> (1,5 L/min*), etanol (0,5 mL/min*) e água (0,5 mL/min*) como solventes. Extrato supercrítico (SC), extrato etanólico pós supercrítico (SCE) e extrato aquoso pós supercrítico (SCA). * Vazões medidas a 0,93 bar e 25 °C.....	51



- Figura 5.7** – Cinética e rendimentos de extração com etanol a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Eugenia uniflora* L.....53
- Figura 5.8** – Cinética e rendimentos de extração com etanol a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Lippia sidoides* Cham.....54
- Figura 5.9** – Cinética e rendimentos de extração com água a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Eugenia uniflora* L.....55
- Figura 5.10** – Cinética e rendimentos de extração com água a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Lippia sidoides* Cham.....56
- Figura 5.11** – Conteúdo de fenóis totais nos extratos de pitanga (*E. uniflora*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC) e aquoso convencional (AC). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....57
- Figura 5.12** – Rendimento de extração de fenóis totais de folhas (mp) de pitanga (*E. uniflora*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*). Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....59
- Figura 5.13** – Conteúdo de flavonoides totais nos extratos de pitanga (*E. uniflora*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC) e aquoso convencional (AC). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....61
- Figura 5.14** – Rendimento de extração de flavonoides totais de folhas (mp) de pitanga (*E. uniflora*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*). Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....63



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**AC** - Extrato aquoso convencional ( $P_{atm}$  e  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

**b.s.** - Base seca

**CER** - Constant extraction rate (Taxa de extração constante)

**CG-EM** - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

**CPMA** - Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas

**CPQBA** - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

**DC** - Diffusion controlled (Difusão controlada)

**$d_{mg}$**  - Diâmetro médio geométrico das partículas sólidas

**DPPH** - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

**EAG** - Equivalente ácido gálico

**EC** - Equivalente catequina

**EC** - Extrato etanólico convencional ( $P_{atm}$  e  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

**EC<sub>50</sub>** - Concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH

**ELF** - Extrato aquoso em leito fixo (sem prévia extração supercrítica) ( $400\text{ bar}$  e  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

**ELF** - Extrato etanólico em leito fixo (sem prévia extração supercrítica) ( $400\text{ bar}$  e  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

**EUA** - Estados Unidos da América

**EXTRA E** - Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio

**FER** - Falling extraction rate (Taxa de extração decrescente)

**FS** - Fluido supercrítico

**GC-MS** - Gas chromatography coupled to mass spectrometry

**IR** - Índice de retenção

mp – matéria prima

**OEC** - Overall extraction curve (Curva global de extração)



**P<sub>c</sub>** - Pressão crítica

**SC** - Extrato supercrítico (400 bar e 60 °C)

**SCA** - Extrato aquoso pós extração supercrítica (400 bar e 60 °C)

**scCO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono supercrítico

**SCE** - Extrato etanólico pós extração supercrítica (400 bar e 60 °C)

**SC-V** - Extrato supercrítico volátil retido na armadilha Porapak-Q

**SFE** - Supercritical Fluid Extraction (Extração com fluídos Supercríticos)

**T<sub>c</sub>** - Temperatura crítica

**t<sub>r</sub>** - Tempo de retenção (min)

**U** - Teor de umidade (%)

**VU** - Teor de voláteis + umidade (%)

**ε** - Porosidade do leito de partículas

**ρ<sub>a</sub>** - Densidade aparente (g/cm<sup>3</sup>)

**ρ<sub>r</sub>** - Densidade real (g/cm<sup>3</sup>)



## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AUTOR:** Tábata Tayara Garmus Diniz

**TÍTULO:** Obtenção de extratos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) por extração sequencial em leito fixo usando CO<sub>2</sub> supercrítico, etanol e água como solventes.

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

**CO-ORIENTADORA:** Dra. Losiane Cristina Paviani – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

---

### RESUMO

Esse trabalho objetivou, através da combinação de processos de extração, a obtenção de extratos naturais a partir de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e de folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). Os extratos foram obtidos por extração sequencial em leito fixo a 60 °C e 400 bar, primeiro por extração com dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>), seguido por extração com etanol em uma segunda etapa e por último, extração com água (terceira etapa). Curvas de extração (rendimento de extrato em função da massa de solvente) foram obtidas no intuito de se avaliar o desempenho da extração quanto ao rendimento em função do tipo de solvente. Todos os extratos foram avaliados quanto ao teor de fenóis e flavonoides totais e a fração volátil obtida na primeira etapa com scCO<sub>2</sub> foi avaliada quanto ao seu perfil químico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM). Para efeito de comparação, mais dois tipos de extratos etanólicos e aquosos foram obtidos: 1) Extratos em etapa única a partir das folhas, com etanol e com água em leito fixo a 60 °C e 400 bar sem prévia extração com scCO<sub>2</sub> e 2) Extratos convencionais utilizando um sistema a baixa pressão e 60 °C. A análise dos resultados mostrou que o caráter do solvente empregado influenciou significativamente no processo de obtenção dos extratos, pois o rendimento apresentou tendência de aumento com o aumento da polaridade do solvente, sendo os extratos aquosos os de maior rendimento, seguidos dos etanólicos e por último os supercríticos. O estudo apontou o processo de extração sequencial (em três etapas) como o mais eficaz em termos de rendimento global de



extração e de fenóis e flavonoides totais para *Eugenia uniflora*. O extrato obtido com etanol (60 °C e 400 bar) após extração supercrítica e o extrato obtido com scCO<sub>2</sub> apresentaram as maiores concentrações de fenóis e flavonoides totais, respectivamente, dentre todos os extratos obtidos das folhas de *E. uniflora* L. Na matriz *Lippia sidoides* Cham., o processo de extração etanólica a 60 °C e 400 bar em etapa única permitiu obter extratos mais concentrados em fenóis e flavonóis e o melhor rendimento de flavonoides totais. Os resultados para o rendimento de compostos fenólicos do alecrim-pimenta aponta a extração sequencial como a mais eficiente. A influência da extração supercrítica prévia foi diferente dependendo da matriz vegetal estudada. O scCO<sub>2</sub> como primeiro solvente de extração permitiu obter extratos etanólicos e aquosos mais concentrados em compostos fenólicos para pitanga.

Palavras-chave: Extração supercrítica, Fenóis, Flavonoides, *Eugenia uniflora* L., *Lippia sidoides* Cham.



## MASTER DEGREE THESIS

**AUTHOR:** Tábata Tayara Garmus Diniz

**TITLE:** Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) and pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents.

**MAJOR PROFESSOR:** Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

**CO- MAJOR PROFESSOR:** Dra. Losiane Cristina Paviani – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

---

### ABSTRACT

The objective of this study was to obtain natural extracts from leaves of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) and pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) with the combination of different sequential extraction techniques. The extracts were obtained by sequential extraction in fixed bed (60 °C and 400 bar), first by extraction with supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>), followed by extraction with ethanol in a second step and finally extracted with water in a third step. Extraction curves (yield of extracts by the mass of solvent) were obtained in order to evaluate the performance of the extraction yield due to the type of solvent. All extracts were evaluated for their content of total phenols and flavonoids and the more volatile fraction obtained in the first step with scCO<sub>2</sub> was evaluated for its chemical profile by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). For comparison, two types of ethanol and aqueous extracts were obtained: 1) single-step extracts from the leaves with ethanol and water in the fixed bed at 60 °C and 400 bar without prior extraction with scCO<sub>2</sub> and 2) extracts using a conventional low pressure system and 60 °C. The results showed that the nature of the solvent employed strongly influenced the process of obtaining extracts, as the yield showed a tendency to increase with increasing polarity of the solvent. The aqueous extracts showed the highest yield, followed by ethanol and finally the supercritical. The study pointed out the process of sequential extraction (three-step) as the most effective in terms of global extraction yield and total phenols and flavonoids for *Eugenia uniflora*. The extract obtained with ethanol (60 °C and 400 bar) after supercritical extraction and the extract obtained with scCO<sub>2</sub> were those with the highest concentrations of total phenols and flavonoids, respectively, among all the extracts obtained from the



leaves of *E. uniflora* L. At *Lippia sidoides* Cham. matrix, the process of single-step ethanolic extraction at 60 °C and 400 bar obtained more concentrated yields in phenols and flavonols and the best yield of total flavonoids. The results for the yield of phenolic compounds from pepper-rosmarin indicate the sequential extraction as the most efficient process. The influence of prior supercritical extraction was different according to plant matrix studied. The scCO<sub>2</sub> as the first extraction step yielded ethanolic and aqueous extracts more concentrated in phenolic compounds for *E. uniflora*.

Key-words: Supercritical extraction, Phenols, Flavonoids, *Eugenia uniflora* L., *Lippia sidoides* Cham.



## INTRODUÇÃO

Atualmente, existe um grande interesse em formulações que incorporam extratos oriundos de fontes naturais para obter produtos na forma de alimentos funcionais, de cosméticos ou produtos medicinais que contenham substâncias biologicamente ativas. Os extratos naturais são preparações líquidas, semi-sólidas ou sólidas, obtidas a partir de matrizes de origem biológica. Estes extratos são obtidos pelo contato da matriz vegetal/animal com diferentes solventes, como água ou solventes orgânicos. No caso da produção de óleos essenciais, tem se empregado também processos como destilação por arraste de vapor e hidrodestilação (MORAES e COLLA, 2006).

A busca por produtos de melhor qualidade e livres de traços de solventes, além da preocupação com os riscos ambientais, tem levado à pesquisa de processos alternativos de extração, mais limpos e sustentáveis. Dentre estes processos destaca-se a extração com fluido supercrítico, usando dióxido de carbono.

Os processos de separação que empregam o dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>) como substituto de alguns solventes orgânicos e do vapor d'água (hidrodestilação ou arraste a vapor) apresentam-se como uma das opções de destaque para obter extratos naturais contendo substâncias bioativas (antioxidantes, óleos essenciais, carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides, entre outros). Dentre as vantagens do uso do dióxido de carbono supercrítico em processos de extração tem-se que ele é barato, atóxico, não inflamável, inerte e tem boa capacidade de extração devido sua penetrabilidade (RAVENTÓS, DUARTE e ALARCÓN, 2002).

Nas duas últimas décadas, tem havido um interesse crescente na biodisponibilidade e efeitos biológicos dos compostos fenólicos presentes em diversos tipos de plantas (CARTEA et al., 2011). Entre estas se destaca a *Lippia sidoides* Cham. também conhecida como alecrim-pimenta, cujo óleo essencial possui elevado valor comercial, tendo o timol e o carvacrol como constituintes principais, que apresentam propriedades terapêuticas de interesse na indústria farmacêutica e de alimentos (ALMEIDA et al., 2010). Segundo Matos e Oliveira (1998), tanto o óleo essencial quanto o extrato hidro-alcoólico são dotados destes compostos.

Botelho et al. (2007), relataram a composição química por CG-EM do óleo essencial de alecrim-pimenta obtido por hidrodestilação. Doze compostos foram caracterizados, tendo como principais constituintes o timol (56,7%) e o carvacrol (16,7%). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. sidoides* e seus principais constituintes foi testada contra patógenos orais, sugerindo sua utilização no combate ao crescimento microbiano bucal.

Sousa et al. (2002) realizaram a extração de óleo essencial da *L. sidoides* utilizando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) pressurizado, etanol e vapor d'água como solventes. Os perfis químicos dos extratos foram todos semelhantes, porém a extração com CO<sub>2</sub> produziu os rendimentos mais altos.

Levando em conta o uso popular das folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) no tratamento de doenças, estudos realizados identificaram os compostos responsáveis pelo potencial terapêutico da planta. Logo, uma ampla variedade de solventes foi empregada na obtenção de extratos de folhas de pitanga, como metanol, etanol, vapor de água, água e CO<sub>2</sub> supercrítico, isolando e identificando diferentes componentes majoritários.

Em 2011, Martinez-Correa e colaboradores obtiveram extratos naturais de *E. uniflora* por meio da combinação de processos de extração, utilizando dióxido de carbono supercrítico, etanol e água como solventes. Os extratos obtidos apresentaram atividade antioxidante atribuída principalmente a presença de compostos da família dos polifenóis. A combinação de processos permitiu obter extratos mais ativos, com diferentes composições e funcionalidades.

Os compostos fenólicos ou polifenóis são antioxidantes naturais responsáveis pela defesa primária do corpo humano através da eliminação dos radicais livres, que interferem no metabolismo. Os mais comuns são os tocoferóis, flavonoides e compostos relacionados, tais como: cumarinas, derivados do ácido cinâmico e chalconas, diterpenos fenólicos e ácidos fenólicos (OREOPOULOU, 2003). Somando-se a isto, estudos têm demonstrado que compostos fenólicos possuem efeitos significativos na redução do câncer (HASSIMOTTO, GENOVESE e LAJOLO, 2005). Evidências epidemiológicas demonstram correlação inversa entre as doenças cardiovasculares e o consumo de

alimentos ricos em flavonoides, possivelmente por suas propriedades antioxidantes (COOK e SAMMAN, 1996).

A produção de concentrados de compostos bioativos exige muito das técnicas de extração, especialmente a de purificação, devido à rigorosa especificação dos produtos comuns nos setores alimentício, farmacêutico e cosmético, que obrigam frequentes evoluções nas metodologias, visando obter produtos de forma econômica e que satisfaçam às exigências de qualidade vigentes (BATISTELA e WOLF, 1996).

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a extração sequencial de compostos bioativos a partir de folhas de *E. uniflora* e *L. sidoides*, empregando dióxido de carbono supercrítico, etanol e água como solventes e confrontar os resultados de rendimento global e teor de fenóis e flavonoides totais da extração sequencial com os obtidos por extração em etapa única (leito fixo) e extração convencional.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Obter diferentes extratos de folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e de folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) pela técnica de extração sequencial em extrator de leito fixo, usando o dióxido de carbono supercrítico, etanol e água como solventes. Caracterizar os extratos quanto ao rendimento de extração, composição do óleo essencial e teor de compostos fenólicos. Avaliar as vantagens/desvantagens dessa técnica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Obter curvas de extração (massa de extrato em função da quantidade de solvente) em leito fixo para a extração supercrítica, etanólica e aquosa de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e de folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), usando o dióxido de carbono a 400 bar e 60 °C como uma primeira etapa, seguido de etanol a 400 bar e 60 °C como uma segunda etapa e água a 400 bar e 60 °C como uma terceira etapa.

- Obter extratos etanólicos e aquosos pelos métodos convencionais a partir das matrizes vegetais a baixa pressão e 60 °C.
- Obter extratos etanólicos e aquosos em uma etapa a partir das matrizes vegetais em extrator de leito fixo a 400 bar e 60 °C para obter curvas de extração.
- Determinar o rendimento de voláteis no extrato supercrítico de folhas de pitanga e de alecrim-pimenta.
- Determinar o rendimento global de extração, concentração e rendimento de fenóis e flavonoides totais dos diferentes extratos.
- Avaliar a composição do óleo essencial das matrizes vegetais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Matrizes vegetais**

##### **3.1.1 Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**

A *Eugenia uniflora* L., também conhecida como pitangueira (Figura 3.1), é uma árvore perene da família Myrtaceae nativa da América do Sul (AURICCHIO e BACCHI, 2003). Apesar de sua origem tropical, seu cultivo já se encontra difundido em diversos países, podendo ser encontrada em alguns países asiáticos, nos Estados Unidos e no Caribe. No Brasil, apesar de seu fruto ser nativo das regiões Sul e Sudeste, o Nordeste é a única região comercialmente exploradora desta fruta de alto potencial econômico (CONSOLINI e SARUBBIO, 2002; VIZZOTTO, 2008).



**Figura 3.1** – Fotografia das folhas da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.).

As folhas de *E. uniflora* L. são conhecidas por suas inúmeras ações terapêuticas, tendo sido utilizadas há muito tempo na medicina popular no tratamento de febre, doenças estomacais, hipertensão, obesidade, reumatismo, bronquite e doenças cardiovasculares. Tem ação calmante, anti-inflamatória, diurética, combate à obesidade e também possui atividade antioxidante. Os extratos da folha da pitangueira, assim como de outras espécies nativas, também apresentam atividade contra *Trypanosoma congolense* (doença do sono) e moderada atividade bactericida sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (VIZZOTTO, 2008).

Dentre as aplicações medicinais da *E. uniflora* encontra-se seu uso como hipotensor, antigota, estomáquico, além de ter atividade antimicrobiana e hiperglicêmica (AURICCHIO e BACCHI, 2003). Estudos demonstraram que compostos presentes nas folhas possuem atividade como anti-inflamatório (SCHAPOVAL et al., 1994), anti-hiperglicemia e anti-hipertrigliceridemia (ARAI et al., 1999), antimicrobiano e antifúngico (HOLETZ et al., 2002; VICTORIA et al., 2012), larvicida (*Aedes aegypti*) (FAMUYIWA ADEBAJO e ALADESANMI, 2011), anti-hipertensivo (CONSOLINI e SARRUBIO, 2002), efeito citotóxico (OGUNWANDE et al., 2005) e antioxidante (KADE et al., 2008).

Amat, de Battista e Uliana (1999) estudaram a ação diurética de extratos aquosos de folhas de *E. uniflora* em camundongos, comprovando o uso da planta como um agente hipotensor na medicina popular. Rattmann et al. (2012) relataram o uso de uma fração rica

em flavonoides obtida das folhas de *E. uniflora* para tratamento de doenças inflamatórias. O experimento foi realizado em ratos e indicou que essa planta produz compostos que podem ser utilizados como adjuvantes potenciais no tratamento dessas doenças. A administração oral diminuiu a mortalidade causada por septicemia em 30,0 %.

Todos esses benefícios geralmente são atribuídos à presença de metabólitos secundários presentes nas folhas, que inclui flavonoides, terpenos, taninos, antraquinonas e óleos essenciais (AMORIM et al., 2009). Alguns trabalhos relatam a composição de extratos das folhas da *E. uniflora* por diferentes métodos de extração. Schmeda-Hirschmann (1995), assinalou a incidência dos flavonoides quercetina e miricetina em folhas de *E. uniflora* e Lee et al. (1997) relataram a presença de constituintes fenólicos em extratos metanólicos, como eugeniflorina D1 ( $C_{75}H_{52}O_{48}$ ) e eugeniflorina D2 ( $C_{68}H_{48}O_{45}$ ), dois taninos macrocíclicos hidrolisáveis.

Martinez-Correa et al. (2011) realizaram estudos para o processo combinado de extração supercrítica seguida de extração convencional (etanólica ou aquosa) para folhas de *E. uniflora*. Quando comparado com a extração convencional, o processo combinado apresentou extratos aquosos e etanólicos mais concentrados em fenóis e flavonoides totais. No caso do extrato etanólico, obteve-se altíssimo teor de fenóis com concentrações de 407 e 504 mg EAG/g (miligramas equivalente em ácido gálico por grama de extrato) para o extrato etanólico a partir das folhas e para o extrato etanólico com extração supercrítica prévia, respectivamente e alta atividade antioxidante de  $EC_{50} = 6,2$  e  $5,2$   $\mu\text{g/mL}$  pelo método DPPH, respectivamente, que estão na mesma ordem de grandeza da atividade da catequina pura ( $EC_{50} = 5,4$   $\mu\text{g/mL}$ ). O rendimento global do extrato aquoso foi da ordem de 20,0 e de 21,0 % contra 8,0 e 4,0 % para o extrato etanólico sem e com prévia extração supercrítica. A concentração de fenóis totais foi da ordem de 140 e 300 mg EAG/g para o extrato aquoso a partir das folhas e para o extrato aquoso com prévia extração supercrítica, respectivamente.

Peixoto, Oliveira e Cabral (2010) estudaram a obtenção de extratos supercríticos e frações voláteis de *E. uniflora*, a pressões entre 100 e 300 bar e 50 e 60 °C. Os extratos supercríticos apresentaram rendimentos globais entre 1,5 % e 3,2 % (b.s), com presença de compostos majoritários como  $C_{15}H_{20}O_2$ , curzereno e germacreno B, no entanto, a fração

mais volátil apresentou rendimento global próximo a 0,1 % tendo como compostos majoritários o 3-hexen-1-ol e o curzereno.

Vários solventes foram empregados na obtenção de extratos de folhas de *E. uniflora* L., como metanol (IBIKUNLE et al., 2011), etanol (FIUZA et al., 2009; GALHIANE et al., 2006; MARTINEZ-CORREA et al., 2011), vapor de água (GALHIANE et al., 2006; MELO et al., 2007) água (CONSOLINE e SARUBBIO, 2002; GALHIANE et al., 2006; MARTINEZ-CORREA et al., 2011) e dióxido de carbono no estado supercrítico (GALHIANE et al., 2006; PEIXOTO, OLIVEIRA e CABRAL, 2010; MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

### 3.1.2 Alecrim-Pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

A espécie *Lippia sidoides*, conhecida popularmente como alecrim-pimenta (Figura 3.2), é uma planta aromática encontrada no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Devido seu uso na medicina popular, principalmente como antisséptico e antimicrobiano, o alecrim-pimenta destaca-se como uma espécie que teve o cultivo ampliado em vários estados brasileiros, pela inclusão em programas de fitoterapia (MATOS e OLIVEIRA, 1998; COSTA et al., 2002), estando inclusive listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde, a Renisus (CARVALHO-JUNIOR et al., 2011).



**Figura 3.2** – Fotografia das folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

Seu óleo essencial possui elevado valor comercial, sendo o timol e o carvacrol os principais constituintes, os quais apresentam propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e larvicida (ALMEIDA et al., 2010).

Quimicamente o óleo essencial das folhas de *L. sidoides* é comparável ao conhecido óleo de *Thymus vulgaris*, conhecido popularmente como tomilho, apesar do teor de timol no óleo da *L. sidoides* ser maior. O óleo de tomilho alcançou um considerável volume de importação pelo Brasil, cujo constituinte principal, o timol, está entre as substâncias naturais mais requisitadas por diferentes setores industriais, dentre eles os de química e de cosméticos (CRAVEIRO et al., 1989 citado por MATOS e OLIVEIRA, 1998). Tanto o extrato hidro-alcoólico quanto o óleo essencial obtidos da *L. sidoides* são dotados de forte ação bactericida e fungicida devido a presença do timol em ambos (MATOS e OLIVEIRA, 1998).

Vários trabalhos têm demonstrado propriedades biológicas do óleo essencial de *L. sidoides* tais como: ação antifúngica, antimicrobiana, contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* que causam infecções na pele e na garganta (SILVA et al., 2010b; VERAS et al., 2012), *Streptococcus mutans* responsável pela cárie dentária (BOTELHO et al., 2007), *Corynebacterium xerosis* que causa mau cheiro nas axilas e nos pés (LACOSTE et al., 1996), *Candida albicans*, espécie encontrada nas aftas e corrimento vaginal (BOTELHO et al., 2007), *Trichophytum rubrum* e *T. interdigitale* que causam micoses na pele, ação moluscida contra o caramujo hospedeiro da esquistossomose *Biomphalaria glabra* (BEZERRA et al., 1980 citado por MATOS e OLIVEIRA, 1998), e ação larvicida contra o mosquito transmissor da dengue *Aedes aegypti* (CARVALHO et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2004).

Veras et al. (2013) apresentaram a composição química do óleo essencial de *L. sidoides* e avaliaram seu efeito como anti-inflamatório *in vivo*. Foram identificados como constituintes principais o timol (84,9 %) e o p-cimeno (5,33 %). Os resultados indicaram que o timol é o componente responsável pela atividade anti-inflamatória do óleo essencial.

Farias-Junior et al. (2012) estudaram os efeitos *in vitro* de timol e carvacrol presentes em óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. contra *Leishmania* spp, o

agente causador da leishmaniose. O óleo essencial mostrou atividade significativa contra as formas *Leishmania chagasi*. Os dados sugeriram que o óleo essencial de *L. sidoides* é realmente uma fonte alternativa a compostos quimioterápicos utilizados no tratamento da leishmaniose, uma doença que afeta mais de 2 milhões de pessoas no mundo todo.

Sousa et al. (2002) realizaram a extração de óleo essencial da *L. sidoides*, obtendo rendimentos entre 2,0 e 3,0 % para extração supercrítica; 2,0 % para extração etanólica e 2,4 % para processo por arraste a vapor, obtendo um óleo essencial com aproximadamente 50,0 % de timol e 7,0 % de carvacrol. Almeida et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante do extrato alcoólico e obtiveram alta atividade antioxidante de  $EC_{50} = 16,0 \mu\text{g/mL}$  pelo método DPPH, atribuída à presença de substâncias flavonoídicas, o que justifica o seu uso na medicina popular.

Resultados de pesquisas na área vêm demonstrando que o alecrim-pimenta representa um grande potencial para a Região Nordeste do Brasil, merecendo destaque entre as plantas medicinais e aromáticas a serem preservadas. Também, evidencia-se a necessidade de novas oportunidades de pesquisas envolvendo trabalhos sobre extração de óleos essenciais e extratos contendo compostos bioativos, que sejam mais ecológicos e se caracterizem em um diferencial para o mercado desses produtos (OLIVEIRA, 2008).

### **3.2 Compostos Bioativos**

A qualidade dos alimentos não é dada apenas em função dos valores nutricionais, mas também através da presença de compostos bioativos que exercem efeitos positivos sobre a saúde do ser humano (CASSANO et al., 2008). Compostos bioativos são substâncias químicas sintetizadas de forma natural pelas plantas, sendo utilizados como mecanismo de defesa contra o ambiente. Quando ingeridos, podem produzir efeitos biológicos sobre outros organismos vivos. Esta atividade biológica pode combater doenças ou produzir efeitos tóxicos em humanos e animais (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993).

Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, são considerados antioxidantes naturais e representam um importante grupo de compostos bioativos em alimentos. Estes compostos estão presentes em todos os alimentos vegetais, mas o seu tipo

e os níveis variam enormemente dependendo da planta, fatores genéticos e condições ambientais (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

O termo “composto fenólico” representa um grande número de compostos (mais de 8000) dispersos por todo o reino vegetal e caracterizados pela presença de ao menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados diretamente a uma estrutura cíclica. Esses compostos são produzidos em plantas como metabólitos secundários e, dependendo da sua estrutura, podem ser classificados em fenóis simples, ácidos fenólicos (ácidos benzoicos, cinâmico e seus derivados), flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e taninos.

Os compostos fenólicos têm recebido atenção considerável por apresentarem um fator de proteção em potencial contra o câncer e doenças do coração, em parte devido as suas potentes propriedades antioxidantes e sua disponibilidade numa vasta gama de alimentos de origem vegetal (CARTEA et al., 2011).

Estudos mostram que a ação dos flavonoides contra o câncer está ligada a neutralização dos radicais que promovem mutações. Estes antioxidantes naturais podem também afetar a atividade enzimática e, por fim, inibir a proliferação de células tumorais (HASSIMOTTO, GENOVESE e LAJOLO, 2005).

Os flavonoides compreendem um grupo de compostos fenólicos, apresentando-se sob muitas variações como, flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (SILVA et al., 2010a). Tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana (PETERSON e DWYER, 1998).

Os flavonoides exercem um grande número de atividades bioquímicas, fisiológicas e farmacêuticas, incluindo ações vasodilatadoras, anti-inflamatórias, antimicrobiana, imunoestimulantes, e efeitos antialérgicos e antivirais. Além disso, estas substâncias possuem atividade antioxidante, caracterizada pela capacidade de sequestrar radicais livres em organismos vivos (COOK e SAMMAN, 1996).

Muitos desses compostos são atualmente obtidos sinteticamente por razões econômicas, dificuldade na extração e/ou dificuldade na obtenção de plantas produtoras. Contudo, a busca por extratos naturais com potenciais ativos de grau alimentício é uma tendência na indústria de alimentos. Como consequência, houve um aperfeiçoamento das técnicas de extração e da busca por novas fontes de extratos naturais e seus constituintes (VITTI e BRITO, 2003).

Nos últimos anos, trabalhos sobre a extração de compostos fenólicos de produtos naturais têm atraído um interesse especial. A extração é um passo muito importante no isolamento, identificação e utilização de compostos fenólicos e não existe um único método de extração padrão. Extração com solvente orgânico e extração com fluido supercrítico são as técnicas mais comuns utilizadas para o isolamento de polifenóis (IGNAT, VOLF e POPA, 2011).

### **3.3 Processos de extração de compostos bioativos**

Existem diversos métodos para a extração dos compostos bioativos em vegetais. Dentre esses, podem ser citados os tradicionais métodos de extração utilizando solventes orgânicos, água, vapor de água e dióxido de carbono supercrítico como solventes. A escolha do método está relacionada a diversos fatores como: polaridade do solvente, natureza química do composto bioativo, rendimento, temperatura, solubilidade, tempo de extração, custos, entre outros.

#### **3.3.1 Extração com solventes orgânicos e água**

As técnicas de extração de componentes bioativos de substratos naturais evoluíram consideravelmente nos últimos anos. As mais utilizadas são as que empregam solventes orgânicos, água ou vapor d'água no caso dos óleos essenciais.

A hidrodestilação e a destilação por arraste de vapor são processos tradicionais de extração difundidos e conhecidos mundialmente na obtenção de óleos essenciais. A diferença básica entre essas técnicas é que na primeira a matéria-prima está submersa em água e na segunda o vapor passa pela matéria-prima (SARTOR, 2009). Porém, um

problema relevante desses métodos de extração é a termodegradação devido às altas temperaturas do processo, alterando a composição e aroma do produto obtido (GALVÃO, 2004).

Os solventes orgânicos empregados em processos de extração devem ser de baixo ponto de ebulição, tais como: metanol, etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona ou hexano (SHI et al., 2007). Geralmente, os processos de extração com solventes orgânicos possuem baixa seletividade e seus rendimentos de extração são maiores que os obtidos nos processos que empregam vapor de água ou dióxido de carbono supercrítico (MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

O maior problema no uso destes solventes é o fato de ser praticamente impossível a remoção de todo solvente residual sem um grande dispêndio de energia e custos, além do risco do solvente promover a formação de compostos secundários e provocar efeitos tóxicos aos consumidores. Logo, o solvente residual é indesejável nos produtos farmacêuticos e aromáticos, devido à sua toxicidade ou mesmo à interferência no sabor e no aroma do extrato obtido (GALVÃO, 2004).

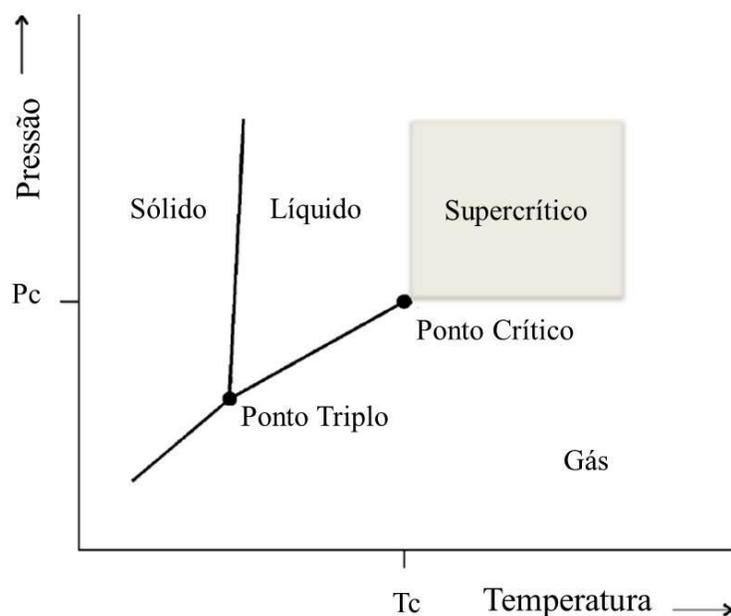
O principal objetivo da indústria e das pesquisas desenvolvidas na área é encontrar um processo com um bom desempenho quanto ao rendimento, qualidade, tempo de operação (produtividade) e custo, ajustando assim os parâmetros do processo para sua otimização e alcançando os melhores resultados.

### **3.3.2 Tecnologia supercrítica**

O processo de extração que emprega fluidos em estado supercrítico vem sendo utilizado comercialmente desde 1979, quando foi inicialmente usado em processos de extração da cafeína do chá e do café. Devido aos resultados da pesquisa intensa na área, tem-se atingido um maior conhecimento do processo, permitindo otimizar as condições operacionais, resultando em uma maior recuperação dos compostos de interesse presentes na matriz extrativa (MCHUG e KRUKONIS, 1994).

### 3.3.2.1 Fluido supercrítico

Quando um gás é comprimido a uma alta pressão, ele se torna líquido. Por outro lado, se esse gás for aquecido acima de uma determinada temperatura, não importa o quão comprimido for esse gás quente, o aumento da pressão não irá torna-lo líquido. Essa temperatura é chamada de temperatura crítica ( $T_c$ ) e a pressão de vapor correspondente é chamada de pressão crítica ( $P_c$ ). Esses valores de temperatura e pressão definem o ponto crítico, que é exclusivo para cada substância. O estado em que uma substância é chamada de fluido supercrítico (FS) ocorre quando os valores de sua temperatura e pressão excedem o ponto crítico, como mostra a Figura 3.3 (MCHUG e KRUKONIS, 1994).



**Figura 3.3** – Definição de estado supercrítico de um componente puro. Adaptado de Brunner (1994).

No estado supercrítico, a substância assume propriedades tanto de gases como de líquidos e possui maior capacidade como solvente. Nesta região pequenas mudanças na temperatura e/ou pressão resultam em uma grande mudança nas propriedades solventes (MUKHOPADHYAY, 2000).

O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é um dos solventes supercríticos mais utilizados na extração de produtos naturais para alimentos e medicamentos. Possui temperatura crítica de 31 °C e pressão crítica de 73,8 bar. Uma vez no estado supercrítico, este fluido, assim como qualquer fluido supercrítico em geral, apresenta propriedades tanto de um gás como de um líquido, como é mostrado na Tabela 3.1. Sua densidade se aproxima a de um líquido, enquanto a viscosidade é próxima a de um gás e a difusividade é cerca de duas vezes maior em magnitude do que a de um líquido. Esses parâmetros influenciam diretamente a eficiência da extração (BRUNNER, 2005).

**Tabela 3.1** – Propriedades características do gás, líquido e fluido supercrítico. Adaptado de (Brunner, 2005)

Estado do fluido	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Difusividade (cm <sup>2</sup> /s)	Viscosidade (g/cm.s)
Gás (1atm; 15-30°C)	(0,6-2,0) x 10 <sup>-3</sup>	0,1-0,4	(0,6-2,0) x 10 <sup>-4</sup>
Líquido (1atm; 15-30°C)	0,6-1,6	(0,2-2,0) x 10 <sup>-5</sup>	(0,2-3,0) x 10 <sup>-2</sup>
FS (Pc; Tc)	0,2-0,5	0,7 x 10 <sup>-3</sup>	(1-3) x 10 <sup>-4</sup>
FS (4 x Pc; Tc)	0,4-0,9	0,2 x 10 <sup>-3</sup>	(3-9) x 10 <sup>-4</sup>

FS: fluido supercrítico; Pc: pressão crítica; Tc: temperatura crítica.

O CO<sub>2</sub> é um gás inerte, barato, facilmente disponível, inodoro, insípido, favorável ao meio ambiente e seguro. Além disso, a extração supercrítica com CO<sub>2</sub>, não deixa resíduos no extrato, uma vez que é um gás nas condições ambientais, e sua temperatura crítica é próxima da temperatura ambiente, o que é ideal na extração de compostos termolábeis. Devido ao seu baixo calor latente de vaporização, é requerida uma baixa energia para extração, conservando o sabor e odor do extrato. Além disso, a energia requerida para alcançar o estado supercrítico do CO<sub>2</sub> é menor que a energia associada ao processo de destilação convencional com solventes orgânicos. Em geral, a extração de compostos utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico (scCO<sub>2</sub>) depende da ocorrência de determinados grupos funcionais, do peso molecular e da polaridade dos compostos de interesse (MUKHOPADHYAY, 2000).

O CO<sub>2</sub> é uma molécula apolar, logo a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico puro está relacionada à extração preferencial de substâncias apolares e/ou de baixa polaridade. Pode-se também empregar alguns solventes (o etanol por exemplo) como co-solvente do scCO<sub>2</sub>

em diferentes proporções para se manipular a polaridade da mistura  $\text{scCO}_2$ /etanol e extrair substâncias nas faixas de polaridades desejadas. A tecnologia supercrítica pode ser utilizada como pré-tratamento da matriz sólida e combinada com outros métodos de extração.

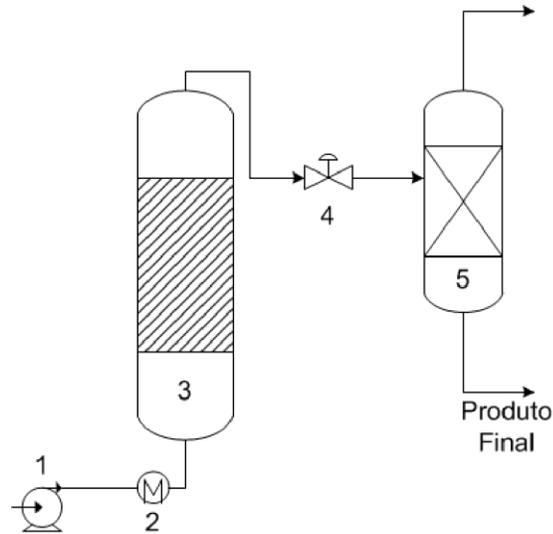
Em trabalho prévio, Martinez-Correa et al. (2011) obtiveram extratos naturais de cinco matrizes vegetais usando um processo combinado de extração supercrítica (em leito fixo) seguida de extração convencional (etanólica ou aquosa) a baixa pressão. Os resultados mostraram que a combinação de processos foi vantajosa quando comparada às respectivas extrações aquosa ou etanólica convencionais em uma etapa, pois além de produzir extratos fracionados (pela polaridade), os rendimentos de extração foram maiores e os extratos convencionais obtidos depois da extração supercrítica apresentaram maior concentração em compostos ativos mais polares. Além de extrair os compostos apolares e de baixa polaridade, a extração supercrítica altera a estrutura da matriz, expandindo-a e facilitando a extração convencional posterior, aumentando em consequência o rendimento de extração.

### **3.3.2.2 Processo de extração supercrítica**

O processo de extração supercrítica (SFE) ocorre basicamente em duas etapas: extração dos componentes solúveis da matriz sólida para o solvente supercrítico e separação do extrato do solvente. Na extração, o solvente supercrítico atravessa um leito fixo de partículas sólidas de maneira contínua, dissolvendo os componentes solúveis da matriz. O solvente é alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo (RAVENTÓS, DUARTE e ALARCÓN, 2002).

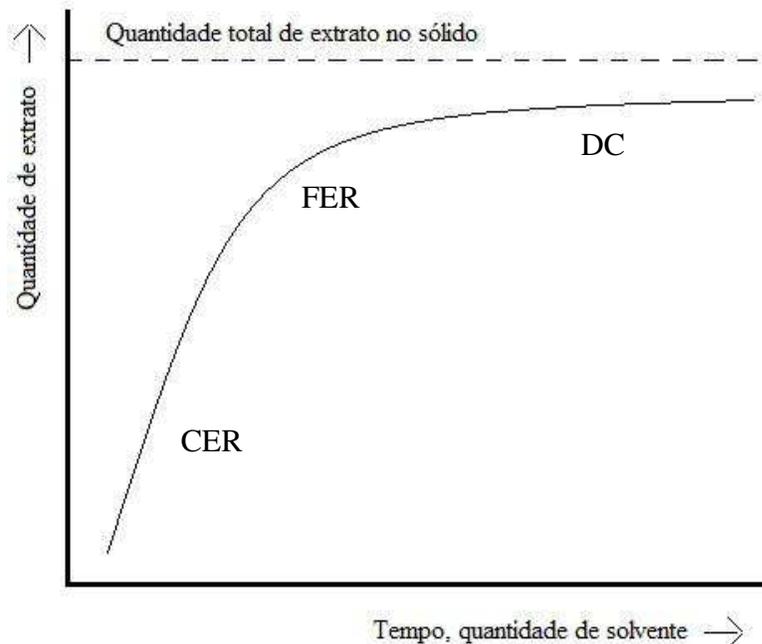
A Figura 3.4 representa o esquema de um processo típico de extração supercrítica onde o material (matriz vegetal) contendo o composto bioativo de interesse é depositado no extrator (3) pelo qual escoam continuamente o  $\text{scCO}_2$ , extraíndo os compostos de interesse. O processo inicia-se com a compressão (1) e o aquecimento do solvente (2) acima do seu ponto crítico. Uma vez que o  $\text{CO}_2$  atinge essas condições, inicia-se a extração e uma válvula redutora da pressão na saída do extrator (4) é acionada. Assim, o  $\text{scCO}_2$  que entra no extrator solubiliza os compostos de interesse presentes na matriz. A corrente de saída do extrator contendo a mistura  $\text{scCO}_2$ /composto bioativo é expandida por meio da válvula de expansão e conduzida ao separador (5). O separador opera em condição fixa de pressão.

Nesta condição, o composto bioativo é precipitado (ou condensado) e separado do CO<sub>2</sub>, que pode ser recuperado e recomprimido até condição de operação no extrator seguinte (no caso de existir) ou estocado e reciclado (MARTINEZ-CORREA, 2010).



**Figura 3.4** - Diagrama esquemático do sistema de extração supercrítica.

Para poder compreender melhor o processo de extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais, é preciso compreender todos os mecanismos fenomenológicos que envolvem a cinética do processo através de uma curva global de extração também conhecida como OEC (*overall extraction curve*), mostrada na Figura 3.5.



**Figura 3.5** - Curva de extração supercrítica com suas etapas: taxa de extração constante (CER); taxa de extração decrescente (FER); período difusional (DC). Adaptado de Brunner (1994).

Para construir uma curva de extração, é necessário quantificar o extrato bruto em fluxo contínuo de solvente. Geralmente o substrato sólido forma um leito fixo que o solvente atravessa, extraindo os compostos. Assim, a curva de extração global é formada pela quantidade total de extrato em função do tempo ou da quantidade de solvente consumido (BRUNNER, 1994).

Como podemos observar na Figura 3.5, a curva de extração é dividida em três etapas (SOVOVÁ, 1994):

1. Período de taxa de extração constante (CER - constant extraction rate), caracterizado graficamente por uma linha reta, no qual encontra-se a maior parte solúvel do extrato. Nessa etapa, a transferência de massa por convecção é predominante;
2. Período de taxa de extração decrescente (FER - falling extraction rate), no qual começam a haver falhas nas camadas de soluto que envolvem superficialmente as partículas ou o número de células rompidas não é mais uniforme. Tanto a convecção como a difusão são importantes nesta etapa;

3. Período difusional (DC – diffusion controlled), no qual o soluto que recobria a superfície das partículas se esgotou. O processo de extração é controlado então pela difusão do solvente para o interior das partículas e pela difusão do conjunto soluto-solvente para a superfície das partículas.

Galvão (2004) resume as vantagens da extração supercrítica, entre as quais podemos citar:

- Baixa temperatura de operação, o que permite que os compostos termicamente instáveis sejam separados.
- O CO<sub>2</sub> é um solvente inerte, logo não ocorrem reações químicas entre ele e a substância aromática.
- CO<sub>2</sub> pode ser removido completamente pela simples redução da pressão ou ajuste da temperatura, ao contrário do que acontece no caso da extração com solventes comuns.
- O processo completo se dá em um ambiente fechado, o que impede a dispersão das partes mais voláteis.

Segundo Meireles (2003), a extração supercrítica apresenta custo de investimento desfavorável quando comparada a outros processos de extração, mesmo que estes requeiram outras operações unitárias associadas (centrifugação, remoção de solventes, destilação e evaporação). Apesar disso, quando altas quantidades de matéria-prima são processadas, os custos de operação diminuem significativamente, devido ao retorno de capital, pois há uma melhor relação entre custo, rendimento e qualidade do produto.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Matérias primas**

Amostras de folhas de pitangueira (*E. uniflora* L.) e de alecrim-pimenta (*L. sidoides* Cham.), fornecidas pelo Dr. Pedro Melillo de Magalhães, foram coletadas no campo de cultivo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – UNICAMP) e secas em estufa com circulação forçada a 42 °C por 3

dias (Figuras 4.1 e 4.2). A Tabela 4.1 apresenta as informações obtidas através da ficha da exsicata das respectivas matrizes vegetais empregadas neste trabalho.



**Figura 4.1** - Folhas de *Eugenia uniflora* L. na planta (pitangueira) (a) e desidratadas (b).



**Figura 4.2** - Folhas de *Lippia sidoides* Cham. na planta (a) e desidratadas (b).

**Tabela 4.1** – Dados obtidos a partir da ficha exsicata das matrizes vegetais.

<b>Informações sobre as matrizes vegetais</b>		
Nome popular	<b>Pitanga</b>	<b>Alecrim-pimenta / falsa cidreira</b>
Nome científico	<i>Eugenia uniflora</i> L.	<i>Lippia sidoides</i> Cham.
Exsicata	Herbário CPMA*	Herbário CPMA*
Nº da exsicata	1816	399
Família botânica	Myrtaceae	Verbenaceae
Espécie	Cultivada	Cultivada
Origem	América do Sul	Nordeste do Brasil
Hábito	Árvore (3,0 m)	Arbusto (1,5 m)
Local da coleta	CPQBA - UNICAMP	CPQBA - UNICAMP
Material coletado	Folhas jovens	Folhas
Data do plantio	2002	2010
Data da coleta	07/2012	07/2012

\* CPMA: Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (UNICAMP – CPQBA).

As folhas desidratadas das diferentes matrizes vegetais foram trituradas em moinho de facas (modelo MA-340, Marconi, Brasil), utilizando uma peneira de mesh 20 acoplada ao equipamento. Após, as amostras foram empacotadas em sacos plásticos e estocadas em freezer doméstico (BVR28GBANA, Brastemp, Brasil) a  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 4.2 Reagentes

Dióxido de carbono 99,5 % m/m (White Martins Gases Industriais, Brasil), hexano 98,5 % m/m (Synth, Brasil), etanol 99,8 % m/m (Êxodo, Brasil) e água ultra pura Milli-Q (Millipore direct-Q3 UV, Millipore Corporation, USA) foram empregados como solventes nos diferentes processos de extração. O Apêndice A apresenta um formulário de coleta de dados com as especificações dos equipamentos, materiais e reagentes utilizados nos experimentos.

### 4.3 Caracterização das matrizes vegetais

Propriedades físicas das partículas livres e do leito formado na extração em leito fixo foram quantificadas para as diferentes matérias primas em termos do teor de umidade e voláteis, diâmetro médio de partícula, densidade real e aparente e porosidade.

#### 4.3.1 Teor total de voláteis e umidade

O teor total de voláteis e umidade (VU %) foi determinado pelo método gravimétrico AOAC 930.04 (1997). O método emprega 2,0 g de amostra em uma cápsula previamente tarada e pesada em balança analítica (BEL, modelo U210A, SP, Brasil) e submetida à secagem em estufa (Marconi, modelo MA-030/12, SP, Brasil) a 105 °C sob vácuo de 600 mmHg (bomba Marconi, modelo MA-057-13, SP, Brasil), tomando o peso a cada 2 horas até que a variação seja menor ou igual a 3,0 mg. Para o cálculo da porcentagem de massa seca empregou-se a Equação (4.1).

$$VU = \left[ \frac{m_{\text{amostra}} - m_{\text{amostra seca}}}{m_{\text{amostra}}} \right] \times 100 \quad (4.1)$$

O teor de umidade (U %) foi quantificado pelo método AOCS Ca 23 -55 (1998). Esse método, conhecido como método de Karl-Fisher (Metrohm 701 KF Titrimo) equipado com forno (832 KF Thermoprep), utiliza 250,0 mg de amostra a 105 °C durante 20 min, e vazão de nitrogênio de 50,0 mL/min (1,01 bar e 0° C).

A utilização de dois métodos distintos para determinação de umidade é justificada pela presença de voláteis nas diferentes matrizes vegetais, contabilizados erroneamente como água no método gravimétrico.

### 4.3.2 Diâmetro médio das partículas

O diâmetro médio geométrico das partículas ( $d_{mg}$ ) foi calculado pelo método ASAE (Asae, 1997) no qual a amostra triturada foi introduzida num jogo de peneiras da série Tyler de tamanho 24 a 270 mesh, onde foi realizada a peneiragem durante 15 minutos com ajuda de um agitador eletromagnético de peneiras (Bertel, SP, Brasil). As diferentes frações retidas nas peneiras foram pesadas em balança semi-analítica (Marte AS5500C, Marte Balanças e Instrumentos de Precisão LTDA, Brasil). Para o cálculo do diâmetro médio geométrico empregou-se a Equação 4.2.

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right] \quad (4.2)$$

sendo que:

$$\bar{d}_i = (d_i \times d_{i+1})^{1/2} \quad (4.3)$$

onde  $\bar{d}_i$  é o diâmetro médio geométrico,  $d_i$  e  $d_{i+1}$  representam a abertura da peneira  $i$  e  $i+1$ ,  $w_i$  é a massa do material retido na peneira  $i$ .

Analisando visualmente folhas secas e trituradas das matrizes vegetais percebe-se que as partículas não apresentam forma esférica e sim uma geometria plana irregular. Apesar disso, obteve-se o diâmetro de uma esfera equivalente a fim de caracterizar o leito de partículas.

### 4.3.3 Densidade real do material triturado

A densidade real ( $\rho_r$ ) foi determinada por picnometria de gás hélio na central analítica do Instituto de Química da UNICAMP. O equipamento utilizado foi o Picnômetro

automático Quantachrome Ultrapyc 1200e. Os testes foram realizados a 25 °C e resultado foi a média de 10 determinações por cada amostra.

#### **4.3.4 Densidade aparente do leito de partículas**

A densidade aparente ( $\rho_a$ ) do leito foi calculada a partir da massa de cada uma das matrizes vegetais requerida para encher um volume de 10 cm<sup>3</sup> (UQUICHE, DEL VALLE e ORTIZ, 2004).

#### **4.3.5 Porosidade**

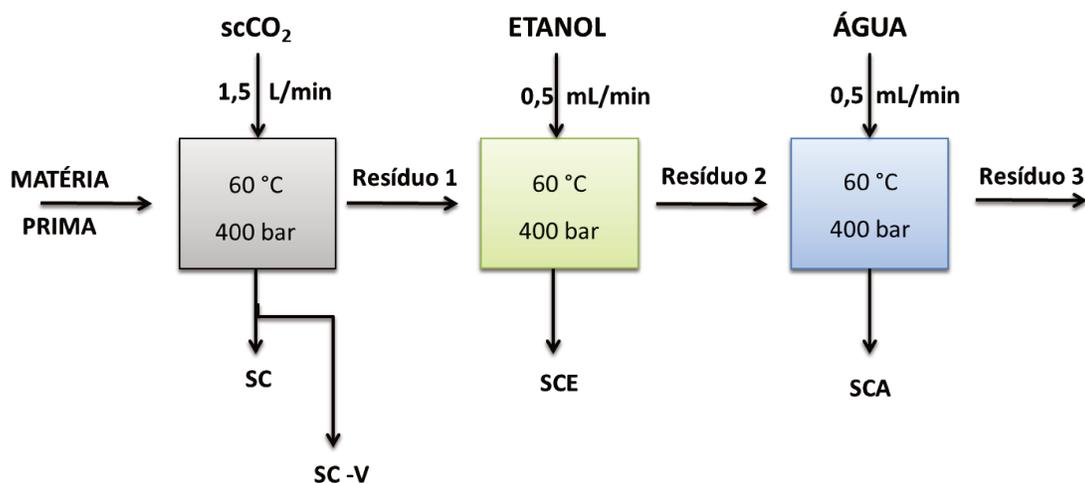
A porosidade do leito ( $\varepsilon$ ) (ou fração volumétrica de vazios no leito) foi calculada por meio do procedimento de Rahman (1996) a partir dos dados experimentais de densidade aparente ( $\rho_a$ ) e real do material moído ( $\rho_r$ ) é calculada pela Equação 4.4.

$$\varepsilon = \frac{\text{volume do leito} - \text{volume ocupado pelo material}}{\text{volume do leito}} = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (4.4)$$

### **4.4 Metodologia para a obtenção dos extratos**

#### **4.4.1 Tipos de extratos**

As matrizes vegetais utilizadas neste trabalho foram submetidas a processos de extração em extrator de leito fixo (alta pressão) em três etapas, usando três solventes distintos. A primeira com CO<sub>2</sub> supercrítico, a segunda e terceira etapas, com etanol e água, respectivamente. A Figura 4.3 apresenta um esquema ilustrativo das extrações.



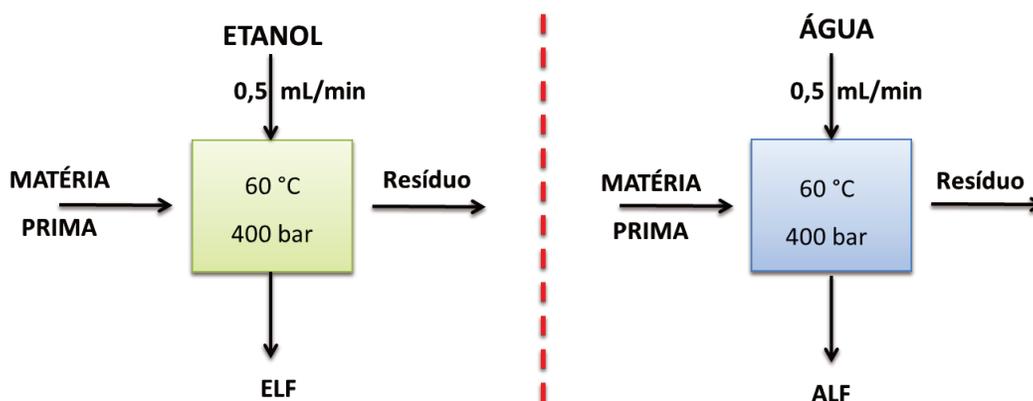
**Figura 4.3** – Fluxograma do processo de extração sequencial em leito fixo para obtenção dos extratos. Primeira etapa: extrato supercrítico (SC) e extrato supercrítico volátil (SC-V), segunda etapa: extrato etanólico pós extração supercrítica (SCE) e na terceira etapa: extrato aquoso pós extração supercrítica (SCA). As vazões dos solventes foram ajustadas a 25 °C e 0,93 bar, sendo suas densidades nessas condições iguais a:  $\rho_{\text{CO}_2} = 1,65 \text{ g/L}$ ,  $\rho_{\text{ETANOL}} = 0,79 \text{ g/mL}$  e  $\rho_{\text{ÁGUA}} = 1,0 \text{ g/mL}$ .

Na primeira etapa da extração sequencial, as condições operacionais de temperatura e pressão selecionadas para a realização do experimento foram 60 °C e 400 bar com uma vazão média de scCO<sub>2</sub> de 1,5 L/min ( $\rho_{\text{CO}_2} = 1,65 \text{ g/L}$ ). O CO<sub>2</sub> no estado supercrítico escoou através de um leito fixo contendo aproximadamente 7,0 g de amostra por um tempo médio total de aproximadamente 6 horas. Na segunda etapa, o resíduo proveniente da primeira extração (Resíduo 1) foi submetido a uma nova extração nas mesmas condições operacionais, utilizando como solvente etanol a uma vazão de 0,5 mL/min para um tempo médio total de processo de 6 horas. A partir do material residual das extrações supercrítica e etanólica (Resíduo 2) foi realizada uma terceira etapa de extração na qual água a 400 bar e 60 °C a uma vazão de 0,5 mL/min escoou pelo mesmo leito de partículas. O tempo médio de extração nesta etapa foi de aproximadamente 6 horas.

As condições operacionais das diferentes extrações em leito fixo foram as mesmas para as duas matrizes vegetais e baseadas em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do EXTRAE/DEA/FEA-UNICAMP (PEIXOTO, 2008; MARTINEZ-CORREA, 2010). No caso da extração supercrítica, as condições de temperatura e pressão fixadas obedeceram a procura de uma máxima extração de compostos de baixa polaridade com

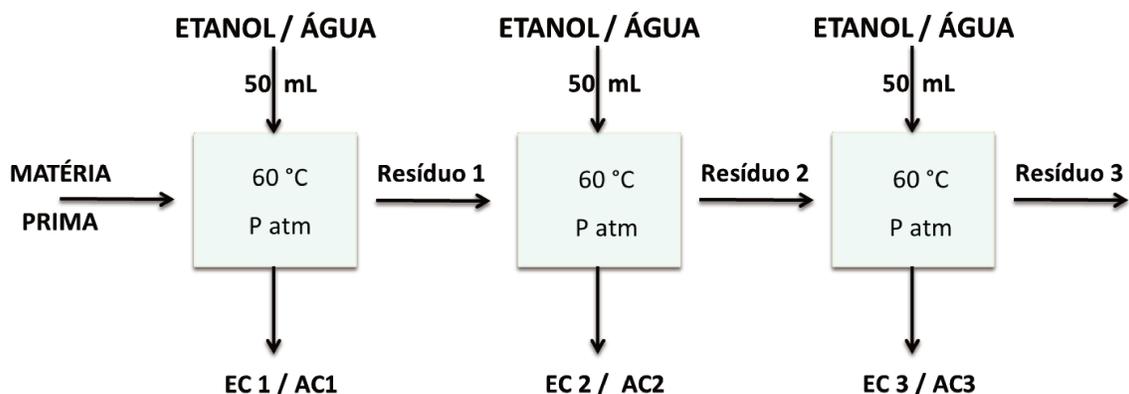
scCO<sub>2</sub>, enquanto os compostos de polaridade intermediária foram extraídos na segunda etapa com etanol e os compostos de alta polaridade na terceira etapa com água.

Para comparação foram realizados experimentos em leito fixo (alta pressão) com etanol e com água em etapa única, sem prévia extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (Figura 4.4). Para complementar os resultados foram realizadas extrações convencionais (Figura 4.5), isto é, a baixa pressão (pressão atmosférica), utilizando etanol e água como solventes.



**Figura 4.4** - Fluxograma do processo de extração em leito fixo (etapa única) para obtenção dos extratos. Na extração etanólica: extrato etanólico em leito fixo (ELF) e na extração aquosa: extrato aquoso em leito fixo (ALF). As vazões dos solventes foram ajustadas a 25 °C e 0,93 bar, sendo suas densidades nessas condições iguais a:  $\rho_{\text{ETANOL}} = 0,79 \text{ g/mL}$  e  $\rho_{\text{ÁGUA}} = 1,0 \text{ g/mL}$ .

Os processos de extração em etapa única foram realizados escoando etanol ou água a 0,5 mL/min em um leito fixo de partículas contendo aproximadamente 7,0 gramas da matriz vegetal. As condições de pressão e temperatura foram as mesmas da extração sequencial e as extrações foram finalizadas depois de 6 horas.



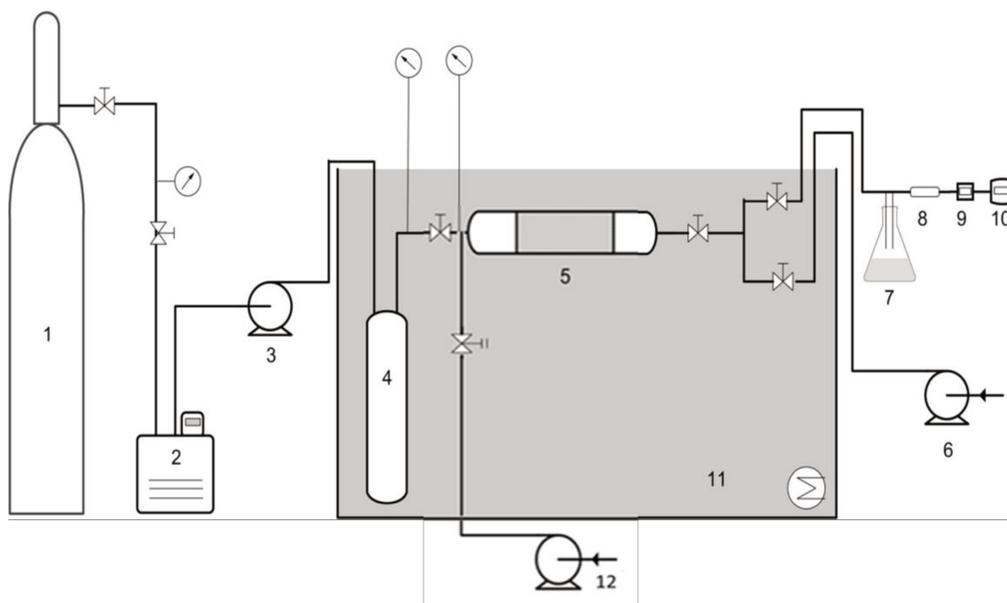
**Figura 4.5** - Fluxograma do processo de extração convencional (três etapas) para obtenção dos extratos. O extrato etanólico (EC) ou aquoso (AC) são constituídos da mistura dos extratos obtidos em cada etapa.

As extrações convencionais foram realizadas a pressão atmosférica, mantendo a temperatura utilizada nos experimentos anteriores. Os extratos foram obtidos segundo a metodologia modificada de Cseke et al. (2006). Aproximadamente 4,5 g de amostra seca foram misturadas com 50 mL de etanol ou água agitando-se a mistura a 60 °C por 2 horas. Em seguida a mistura foi filtrada a vácuo e, ao resíduo sólido (Resíduo 1), foi adicionado mais 50 mL do solvente, repetindo o procedimento mais 2 vezes, totalizando 6 horas (extração exaustiva). O solvente presente nos extratos etanólicos foi evaporado em rotaevaporador e a água presente nos extratos aquosos foi retirada em liofilizador até obtenção do extrato seco.

As melhores condições operacionais foram avaliadas a partir de dados experimentais de rendimento de extrato bruto (massa de extrato seco / massa de matéria prima) em função da massa de solvente utilizada no processo. Os extratos secos obtidos em cada experimento foram colocados em frascos de penicilina, lacrados e armazenados em freezer doméstico (BVR28GBANA, Brastemp, Brasil) a -26 °C. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

#### 4.4.2 Sistema experimental para extração sequencial em leito fixo

Os experimentos foram realizados em uma unidade experimental (Laboratório EXTRAE, UNICAMP, Brasil) conforme esquematizado na Figura 4.6.



**Figura 4.6** – Diagrama esquemático da unidade experimental de extração supercrítica.

- |   |  |
|---|--|
| 1. Cilindro de CO <sub>2</sub>                | 7. Coletor de extrato                        |
| 2. Banho de refrigeração                      | 8. Armadilha Porapak-Q                       |
| 3. Bomba de alta pressão para CO <sub>2</sub> | 9. Medidor de vazão                          |
| 4. Tanque pulmão                              | 10. Totalizador de volume                    |
| 5. Extrator                                   | 11. Banho termostatizado                     |
| 6. Bomba peristáltica                         | 12. Bomba de alta pressão para etanol / água |

A unidade consiste basicamente de um cilindro de CO<sub>2</sub> (1), banho de refrigeração (2), bomba de alta pressão (3), tanque pulmão (4), extrator (5), coletor de extrato (7), medidor de vazão (9) totalizador de volume (10), banho termostaticado (11), armadilha com adsorvente Porapak-Q (80 /100 mesh, Supelco, EUA) (8) utilizada apenas para a captura de voláteis na extração supercrítica, dois manômetros do tipo Bourdon, um localizado no tanque pulmão e outro na entrada do extrator, bomba peristáltica (6), usada para injetar o solvente hexano e bomba (12) utilizada com os solventes etanol e água.

Em todos os casos o extrator (5) foi empacotado manualmente com uma quantidade aproximada de 7,0 g de material seco e triturado. Pérolas de vidro (mesh 6) foram usadas para preencher os espaços vazios do extrator para evitar caminhos preferenciais pelo CO<sub>2</sub>. Foram ajustadas as condições operacionais a 400 bar e 60 °C para os experimentos. Quando alcançadas as condições estabelecidas, adotou-se um período de 1/2 hora como tempo estático para estabilização do sistema e iniciou-se a extração escoando-se 1,5 L/min de CO<sub>2</sub> através do leito e coletando-se extrato no frasco coletor (7). O CO<sub>2</sub> no estado gasoso que deixa o coletor (7) foi escoado através de uma armadilha de Poropak-Q (8) e conduzido a um medidor de vazão (9) e totalizador de volume (10) para quantificar o dióxido de carbono usado. As amostras de extrato foram coletadas em intervalos de tempo preestabelecidos com o objetivo de obter as curvas de extração (massa de solvente em função do rendimento). Durante a primeira hora foram obtidas 4 amostras, na segunda hora 3 amostras, na terceira 2 e partir de quatro horas de extração uma amostra por hora. As extrações foram finalizadas depois de 6 horas (532,5 L de CO<sub>2</sub> a aproximadamente 0,93 bar e 25 °C). Para cada amostra extraída a tubulação foi lavada com hexano injetado através a bomba peristáltica (6). O tempo médio total de extração na etapa supercrítica, desde a montagem do sistema até a despressurização foi de aproximadamente 8 horas.

Após extrair os solúveis em scCO<sub>2</sub>, o escoamento de CO<sub>2</sub> foi interrompido e o sistema foi despressurizado. Em seguida, etanol a 0,5 mL/min foi escoado pelo leito de partículas através da bomba de etanol/água (12) e da mesma maneira foram ajustadas as condições operacionais (60 °C e 400 bar) e estabeleceu-se o tempo de estabilização de 1/2 hora. As amostras de extrato foram coletadas no coletor (7) em intervalos de tempo preestabelecidos para obter a curva com etanol líquido. Durante a primeira hora foram

obtidas 6 amostras, na segunda hora 3 amostras, na terceira 2 e partir de quatro horas de extração uma amostra por hora. O tempo médio total de extração foi de 6 horas. Após extrair os solúveis com etanol, o sistema foi novamente despressurizado e pressurizado com CO<sub>2</sub> (100 bar) a fim de retirar o etanol remanescente da segunda etapa. Na terceira etapa da extração sequencial, água foi bombeada a 0,5 mL/min através da bomba (12) até atingir as condições do processo e, após o tempo de estabilização do sistema, iniciou-se a extração retirando as amostras nos intervalos de tempo fixos: a cada 10 minutos (ao longo da 1<sup>a</sup> hora), cada 15 e depois 20 minutos (ao longo da segunda hora), cada 30 minutos (ao longo da 3<sup>a</sup> hora), e depois da 3<sup>a</sup> hora, de hora em hora. Após 6 horas de extração o leito foi despressurizado e pressurizado com CO<sub>2</sub> (100 bar) para retirar a água restante.

As armadilhas Porapak-Q utilizadas na primeira etapa das extrações sequenciais foram previamente tratadas com 2,0 mL de acetado de etila (Êxodo, Brasil) cuja finalidade foi prevenir possíveis contaminações na fração de voláteis. Após a extração as armadilhas foram lavadas com 15,0 mL de diclorometano (Merck) a fim de se extrair (exaustivamente) os voláteis coletados. Em seguida a solução contendo os voláteis foi concentrada em rotaevaporador a 40 °C e 100 mmHg de vácuo. A quantidade de voláteis extraída foi pesada para análise do rendimento e as amostras foram ressolubilizadas em acetado de etila (20 mg/mL) e encaminhadas para análise cromatográfica.

Realizaram-se todas as extrações em triplicata. Detalhes dos equipamentos e instrumentação do sistema experimental estão apresentados na Tabela 4.2 e no Apêndice A.

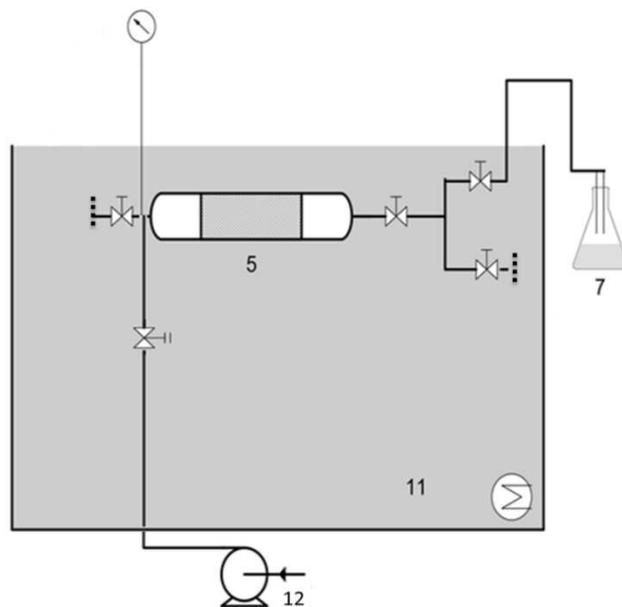
**Tabela 4.2** - Especificações técnicas do equipamento e instrumentação da unidade de extração supercrítica.

<b>EQUIPAMENTO</b>	<b>MARCA, MODELO</b>
Válvula tipo agulha e micrométrica	Autoclave Engineers, EUA
Manômetros tipo Bourdon	Record, Brasil
Medidor de vazão	Cole-Parmer, 32908-69, EUA
Totalizador de volume	Lao-G1, Brasil
Banho termostatzado	Sulab, Brasil
Banho de refrigeração	Cole-Parmer, Polystat 12101-31, EUA
Bomba de alta pressão	Eldex Laboratories, PN 1018 AA-100-S, EUA
Extrator	Aço inox AISI 316 de 50 mL, Suprilab, Brasil
Tanque pulmão	Aço inox AISI 316 de 500 mL, Suprilab, Brasil
Bomba peristáltica	Cole-Parmer, Masterflex 77200-62, EUA

#### **4.4.3 Sistema experimental para extração aquosa ou etanólica em leito fixo em uma única etapa**

Para esta etapa do trabalho foi adotado um procedimento experimental semelhante ao anterior, descrito no item 4.4.2. O extrator foi empacotado com 7,0 g da matriz vegetal e etanol ou água foram escoados a 0,5 mL/min pelo leito de partículas utilizando a bomba de etanol/água (12) é apresentado na Figura 4.7.

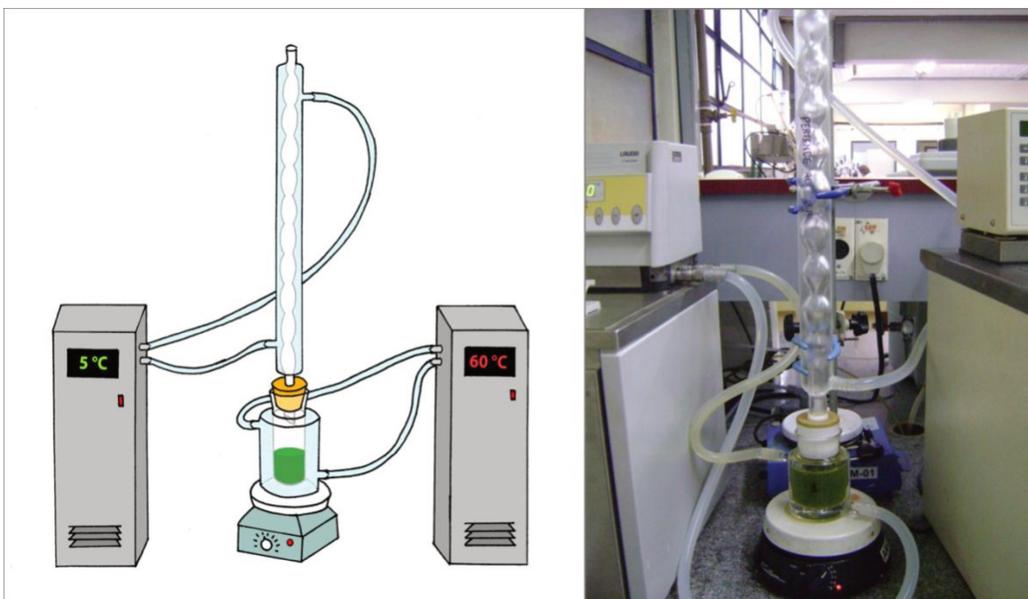
A vazão de solvente foi controlada através da medida do decréscimo do solvente pelo tempo, com o auxílio de uma proveta graduada e de um cronômetro.



**Figura 4.7** - Esquema da unidade experimental de extração etanólica ou aquosa em etapa única (leito fixo). Sistema parte integrante do sistema apresentado na Figura 4.6.

#### 4.4.4 Extração etanólica e aquosa convencional

Os extratos convencionais foram obtidos segundo a metodologia modificada de Cseke et al. (2006). Aproximadamente 4,5 gramas de amostra seca e triturada foram misturadas com 50 mL de solvente (etanol ou água) em uma célula de equilíbrio, onde a mistura foi agitada com ajuda de um agitador magnético e a temperatura ajustada através de um banho termostatizado a 60 °C ligado à célula. Foi acoplado ao sistema um condensador de refluxo, cujo objetivo é impedir a perda de compostos desejáveis por evaporação durante a extração e sua temperatura foi controlada por um banho termostatizado a 5 °C. A mistura permaneceu sob agitação por 2 horas, em seguida foi filtrada a vácuo, reservado o filtrado, e o resíduo sólido passou novamente pela etapa de extração com mais 50 mL de solvente, repetindo-se o processo mais 2 vezes. Assim cada novo filtrado é misturado com o anterior constituindo o extrato. A Figura 4.8 mostra o sistema utilizado na extração convencional.



**Figura 4.8-** Esquema do sistema para extração etanólica e aquosa convencional e foto do sistema utilizado.

O solvente presente nos extratos etanólicos foi evaporado em rotaevaporador a temperatura de 50 °C sob vácuo de 600 mmHg (Marconi, MA-058, Brasil) e em estufa a vácuo (Marconi, MA 030-12, Brasil e bomba Marconi, modelo MA-057-13, SP, Brasil) nas mesmas condições, até peso constante.

A água presente nos extratos foi retirada em liofilizador (Liobras, modelo L101, SP, Brasil) até a obtenção dos extratos secos.

#### **4.4.5 Determinação do rendimento global de extração**

Como parâmetro comparativo entre os diferentes métodos de extração empregou-se o rendimento global de extração, que expressa a relação entre a massa de extrato seco obtido e a massa da matriz vegetal empregada no processo de extração. Este rendimento é baseado por unidade de massa matéria de prima empregada (Equação 4.5). Como os experimentos foram conduzidos em triplicata, o rendimento global é resultado da média aritmética dos valores experimentais.

$$R = \left[ \frac{SC \text{ ou } E \text{ ou } A \text{ ou } FV}{mp} \right] \times 100 \quad (4.5)$$

Onde:

R: rendimento de extração (%).

SC: massa de extrato supercrítico seco.

E: massa de extrato etanólico seco.

A: massa de extrato aquoso seco.

FV: massa de voláteis.

mp: massa da matéria prima.

No caso das extrações supercríticas, etanólica e aquosa em leito fixo, o rendimento global de extração foi calculado como a relação entre a massa total do extrato (obtido na extração + obtido no processo de limpeza da linha) e a massa inicial da matéria prima. Nestas extrações, o rendimento também foi calculado ao longo do processo, a partir das massas secas dos extratos obtidos em intervalos de tempo fixos.

## 4.5 Análises químicas dos extratos

Todos os extratos foram caracterizados quanto ao teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e perfil de compostos presentes na fração volátil retida na armadilha de Porapak-Q.

### 4.5.1 Fenóis totais

A determinação de fenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, segundo procedimento de Singleton et al. (1999) e expresso em equivalente de ácido gálico (EAG/g extrato). A curva padrão de ácido gálico (99,0 % m/m, Vetec, Brasil, lote 0806387) foi construída segundo o procedimento a seguir: uma alíquota de 1,0 mL das soluções aquosas padrão de ácido gálico (99,0 % m/m, Vetec, Brasil, lote 0806387) (0 a 140,0 mg/L) foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL, contendo 9,0 mL de água. O

reagente de Folin-Ciocalteu (1,0 mL) (Dinâmica, Brasil, lote 35193) foi adicionado e a mistura agitada. Após 5 minutos foram adicionados 10,0 mL de uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 7,0 % m/m (99,5 % m/m, Êxodo, Brasil, lote CS5179RA) e o volume completado com água ultra pura (Mili-Q). Após permanecer 90 minutos a 23 °C na ausência de luz, a absorbância foi determinada a 750 nm em um espectrofotômetro (UV-VIS lambda 40, Perkin Elmer, USA). A solução referência utilizada como branco no espectrofotômetro foi acondicionada da mesma forma, com 1,0 mL de água ultra pura (Milli-Q). A curva padrão foi obtida a partir de testes em triplicata e apresentada no Apêndice C.

Para a medição de fenóis totais nas amostras dos extratos secos, estes foram inicialmente diluídos em etanol (99,5 % v/v, Êxodo, Brasil, lote AE8828RA) em proporção (20,0 mg/mL etanol), a partir do extrato diluído foi preparada uma diluição aquosa, tomando-se uma quantidade apropriada do mesmo e depositado-a em um balão volumétrico de 5,0 mL, completando o volume com água ultra pura (Milli-Q). Seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a curva padrão de ácido gálico e verificou-se se o valor obtido de absorbância estava dentro da faixa de absorbância da curva padrão. Foram realizadas análises em triplicata.

#### **4.5.2 Flavonoides totais**

Para a quantificação dos flavonoides totais foi empregado o método desenvolvido por Zhishen et al. (1999) e os resultados expressos em equivalente de catequina (mg EC/g extrato). Uma alíquota das soluções aquosas padrão de catequina (98,0 % m/m, Sigma Aldrich inc, USA, lote 356B270) (0 a 140,0 mg/L) foi adicionada a um balão volumétrico de 10,0 mL contendo 4,0 mL de água e em seguida adicionado 0,3 mL de uma solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 5,0 % (97,0 % m/m, Ecibra, Brasil, lote 17746). Após 5 minutos, foi adicionado 0,3 mL de uma solução de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 10,0 % (99,0 % m/m, Ecibra, Brasil, lote 17375), e após 6 minutos, 2,0 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M (95,0 % m/m, Êxodo, Brasil, lote HS6012RA), completando-se o volume com água destilada. A absorbância da solução foi determinada a 510 nm em um espectrofotômetro

(UV-VIS  $\lambda$  40, Perkin Elmer, USA). Foram realizadas amostras em triplicata. A curva padrão de catequina é apresentada no Apêndice C.

Para determinação do teor de flavonoides totais nas amostras de extrato seco, estas foram inicialmente diluídas em etanol (99,5 % v/v, Êxodo, Brasil, lote AE8828RA) na proporção 20,0 mg de extrato seco/mL etanol. A partir dessa solução foi preparada uma diluição aquosa, tomando-se uma quantidade apropriada (de 0,1 mL a 0,5 mL) da solução etanólica, depositado-a em um balão volumétrico de 5,0 mL e completando o volume com água ultra pura (Milli-Q). Seguiu-se o mesmo procedimento d escrito para a curva padrão de catequina e verificou-se se o valor obtido de absorbância estava dentro da faixa de absorbância da curva padrão. Foram realizadas análises em triplicata.

#### **4.5.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)**

As frações voláteis retidas nas armadilhas de Porapak-Q, provenientes das extrações supercríticas (SC), foram analisadas em um Cromatógrafo a gás (Agilent 6890N) acoplado a um detector de massas (MSD 5975). O cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) e gás de arraste hélio na vazão de 1,0 mL/min. A programação de aquecimento da coluna utilizada foi: 60 °C - 240 °C a 3°C/min, 240 °C - 280 °C a 4 °C/min. As temperaturas do injetor e detector foram 220 °C e 290 °C, respectivamente. O cartucho de Porapak-Q foi eluído com 15,0 mL de diclorometano (99,0 % v/v, Merck, Alemanha, lote K43243344216) para extrair os voláteis. Em seguida a solução contendo os voláteis foi concentrada em evaporador rotativo a 40 °C e 100 mmHg sob vácuo. O extrato seco foi solubilizado em acetato de etila (99,5 % v/v, Êxodo, Brasil, lote AE2089RA) (20,0 mg/mL) e injetou-se 1,0  $\mu$ L no equipamento (CG-EM). A identificação dos constituintes químicos foi realizada a partir de seus respectivos espectros de massas, por comparação com os espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST do equipamento (CG-EM) e pela determinação dos índices de retenção (IR's) dos compostos, obtidos a partir de uma série de n-alcenos (C8-C20). As análises por CG-EM foram realizadas no CPQBA/ UNICAMP pela Dra. Carmen Lucia Queiroga.

## 4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para identificar os tratamentos com as melhores respostas foram realizadas comparações entre as médias pelo teste de Tukey a 5,0 % de significância. Nesta etapa foi empregado o software Statistica® versão 7.0 (StatSoft, EUA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das matrizes vegetais

A Tabela 5.1 apresenta as propriedades que caracterizam as amostras de *Eugenia uniflora* L. e *Lippia sidoides* Cham

**Tabela 5.1** – Resultados das propriedades das partículas livres e do leite.

Propriedade	Matriz vegetal	
	Pitanga ( <i>E. uniflora</i> L.)	Alecrim-pimenta ( <i>L. sidoides</i> Cham.)
Teor total de voláteis e umidade (VU %)	7,20 ± 0,02 %	9,50 ± 0,30 %
Umidade (U %)	5,90 ± 0,08 %	6,01 ± 0,03 %
Diâmetro médio geométrico (d <sub>mg</sub> )	0,336 ± 0,003 mm	0,416 ± 0,008 mm
Densidade real (ρ <sub>r</sub> )	1,50 ± 0,01 g/cm <sup>3</sup>	1,43 ± 0,01 g/cm <sup>3</sup>
Densidade aparente (ρ <sub>a</sub> )	0,46 ± 0,01 g/cm <sup>3</sup>	0,30 ± 0,01 g/cm <sup>3</sup>
Porosidade (ε)	0,70 ± 0,01	0,79 ± 0,01

Os resultados do teor de água determinados pelo método de Karl Fisher (U %) e os valores obtidos pela determinação gravimétrica (VU %) apresentaram diferenças de 1,27 e 3,51 % para *E. uniflora* e *L. sidoides*, respectivamente. Esta diferença pode ser explicada pela evaporação de compostos voláteis além da água no método gravimétrico, contabilizando erroneamente toda a massa evaporada como umidade. Portanto, o método químico de Karl Fisher é indicado quando se deseja obter a quantificação direta de água em folhas de plantas com presença de compostos voláteis (ISENGARD, 2001). A diferença

entre os métodos aponta uma concentração de voláteis no alecrim-pimenta, quase três vezes maior que a obtida para a pitanga.

Os valores dos diâmetros das partículas das matrizes vegetais utilizadas neste trabalho são de 0,416 e 0,336 mm para o alecrim-pimenta e para a pitanga, respectivamente. Esses resultados se assemelham a valores reportados na literatura por Sousa et al. (2002) para *L. sidoides* (0,375 mm) e são menores, por exemplo, que os valores apresentados por Martinez-Correa (2010) (0,817 mm) e Piantino et al. (2008). Este último trabalho analisou o efeito do diâmetro da partícula no rendimento de extração com scCO<sub>2</sub> a 300 bar e 50 °C a partir de amostras de folhas de alecrim-do-campo. O rendimento máximo de extração (4,27 %) foi obtido do material triturado com o menor diâmetro (0,595 mm) e o mínimo rendimento (3,18 %) usando o maior diâmetro (1,18 mm). Verificou-se que o rendimento global aumentou com o decréscimo do diâmetro, devido a uma maior superfície de contato das partículas.

A obtenção de diâmetros menores é resultado de um processo de moagem que rompe as paredes celulares, garantido que mais soluto estará em contato direto com o solvente que passará através do leito. O menor diâmetro de partícula acarreta um caminho difusivo menor. Portanto, tem-se uma menor resistência à difusão do solvente para o interior da partícula e da solução para a superfície desta. Assim, tanto para a convecção quando para difusão, um menor diâmetro resulta em menores resistências à transferência de massa (BIRD et al., 2004). O tamanho de partícula ideal, que leva às melhores taxas de extração, depende das características da matriz vegetal em estudo e dos compostos que se deseja extrair. O diâmetro das partículas das matrizes vegetais utilizadas neste trabalho foi determinado a fim de caracterizar o leito de partículas. A distribuição do tamanho das partículas para *E. uniflora* e *L. sidoides* são apresentadas no Apêndice B.

## **5.2 Rendimentos e cinéticas de extração**

### **5.2.1 Rendimentos globais de extração**

Os valores de rendimento global de extração, concentrações e rendimentos de fenóis e flavonoides totais para as duas matrizes vegetais estão apresentados na Tabela 5.2. Os resultados foram calculados a partir das médias de experimentos conduzidos em triplicata. A discussão referente aos dados de fenóis e flavonoides está apresentada do Item 5.3 (Análise química dos extratos) desta seção.

**Tabela 5.2** – Rendimento global e concentração e rendimentos de fenóis e flavonoides em extratos de *Eugenia uniflora* L. e *Lippia sidoides* Cham.

<b>Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.)</b>						
<b>Extração</b>	<b>Extrato*</b>	<b>Rendimento Global (%)</b>	<b>Fenóis Totais</b>		<b>Flavonoides Totais</b>	
			<b>Concentração (mg EAG / g extrato)</b>	<b>Rendimento (mg EAG / g mp)</b>	<b>Concentração (mg EC / g extrato)</b>	<b>Rendimento (mg EC / g mp)</b>
Sequencial (Leito Fixo)	SC	5 ± 1	32,70 ± 0,03	1,8 ± 0,3	153 ± 4	8 ± 2
	SC-V	0,31 ± 0,03	26,0 ± 0,2	0,08 ± 0,01	64 ± 1	0,20 ± 0,02
	SCE	15,9 ± 0,6	240,5 ± 0,2	38 ± 2	27,8 ± 0,3	4 ± 1
	SCA	22,0 ± 0,4	233,8 ± 0,5	51 ± 1	20 ± 1	4,4 ± 0,3
	SC+SCE+SCA	43 ± 2	-	91 ± 3	-	17 ± 3
Leito Fixo	ELF	20 ± 1	163,5 ± 0,4	32 ± 2	40 ± 2	8 ± 1
	ALF	33,3 ± 0,4	152,2 ± 0,2	51 ± 1	15 ± 1	5,0 ± 0,4
Convencional	EC	18 ± 2	150 ± 1	28 ± 3	61 ± 2	11 ± 2
	AC	27 ± 1	108,7 ± 0,2	30 ± 1	20 ± 2	6 ± 1
<b>Alecrim-pimenta (<i>Lippia sidoides</i> Cham.)</b>						
Sequencial (Leito Fixo)	SC	6 ± 1	132 ± 1	8 ± 1	72,3 ± 0,5	4 ± 1
	SC-V	0,95 ± 0,06	93,3 ± 0,5	0,90 ± 0,06	43,5 ± 0,3	0,41 ± 0,03
	SCE	21 ± 1	221 ± 2	46 ± 3	262,3 ± 0,4	54 ± 3
	SCA	16 ± 2	38,20 ± 0,06	6 ± 1	52 ± 1	8 ± 1
	SC+SCE+SCA	43 ± 4	-	59 ± 5	-	66 ± 5
Leito Fixo	ELF	25 ± 2	230,5 ± 0,1	57 ± 5	280 ± 2	70 ± 6
	ALF	37 ± 2	117,8 ± 0,5	43 ± 3	110 ± 1	40 ± 3
Convencional	EC	19 ± 2	214,9 ± 0,2	41 ± 5	235 ± 2	44 ± 5
	AC	32 ± 1	74 ± 1	24 ± 1	62 ± 1	20 ± 1

\* Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA).

Para ambas as matrizes vegetais, as extrações utilizando scCO<sub>2</sub>, etanol e água apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao rendimento global, o que indica a influência do caráter do solvente empregado. O rendimento de extração apresentou a

tendência de aumento com a polaridade do solvente. Logo, as extrações aquosas se destacaram sobre as demais, resultando em rendimentos globais superiores às outras extrações realizadas nas mesmas condições.

Um dos menores rendimentos foi obtido na extração supercrítica (SC), o que está relacionado ao menor teor de substâncias apolares, pelo fato da extração com scCO<sub>2</sub> estar restrita à extração de substâncias apolares e/ou de baixa polaridade. Na maioria das extrações, os extratos aquosos apresentaram rendimentos maiores seguidos dos etanólicos, pois possuem polaridades diferentes à do dióxido de carbono supercrítico, sendo a água mais polar que o etanol. Portanto, é provável que o aumento de polaridade decorrente do tipo de solvente tenha promovido a extração de compostos que apresentam afinidade por solventes de polaridade relativamente mais elevada, tendo como consequência um maior rendimento de extração. Segundo Takeuchi (2009), é importante salientar que em casos como este, em que as polaridades dos solventes de extração são diferentes, o maior rendimento não necessariamente implica numa maior capacidade de extração dos compostos de interesse. A massa molar dos compostos polares extraídos com sistema de solventes de maior polaridade é maior, o que não necessariamente significa que todos os compostos extraídos estejam presentes neste extrato. A seletividade e eficácia de cada método de extração foram comprovadas analisando a composição dos extratos obtidos.

Como esperado, os resultados mostraram que a extração sequencial diminuiu o rendimento das extrações etanólica e aquosa quando estas são comparadas as extrações etanólicas e aquosas em etapa única, fato explicado pela natureza da matriz sólida e suas interações com os solutos. No entanto, quando se considera o rendimento acumulado (SC+SCE+SCA), observa-se que a combinação de processos, quando comparada aos processos de etapa única, resultou em um aumento significativo no rendimento global de extração, entre 30 e 120 % para a *E. uniflora* e entre 17 e 70 % para a *L. sidoides*.

Segundo Martinez-Correa (2010), a extração prévia com scCO<sub>2</sub> promove uma alteração na estrutura da matriz sólida devido ao emprego de alta pressão e posterior despressurização. Essas alterações mudam as interações entre o soluto e a matriz sólida. O autor realizou estudos para o processo combinado de extração supercrítica seguida de

extração convencional (etanólica ou aquosa) para folhas de *E. uniflora*. Os rendimentos acumulados obtidos para SC+SCE e SC+SCA foram 8,1 e 25,0 %, respectivamente.

Os melhores rendimentos em etapa única foram obtidos nas extrações em leito fixo (ELF e ALF), indicando a influência positiva da pressão no rendimento de extração. O mesmo efeito não foi observado quando se usou etanol para obtenção de extratos de *E. uniflora*. A extração etanólica convencional (EC) não apresentou diferença significativa em relação aos extratos etanólicos em leito fixo (ELF), o que indica que, para *E. uniflora*, a pressão não influenciou no rendimento global de extração etanólica.

Nas extrações realizadas com scCO<sub>2</sub>, coletou-se através da captura em armadilha de Porapak- Q a fração mais volátil que é normalmente arrastada pelo CO<sub>2</sub>, quando este passa pelo coletor de extrato. O rendimento do extrato capturado no adsorvente (SC-V) para *E. uniflora* (0,31 %) foi aproximadamente 1/3 do rendimento obtido para *L. sidoides* (0,95 %).

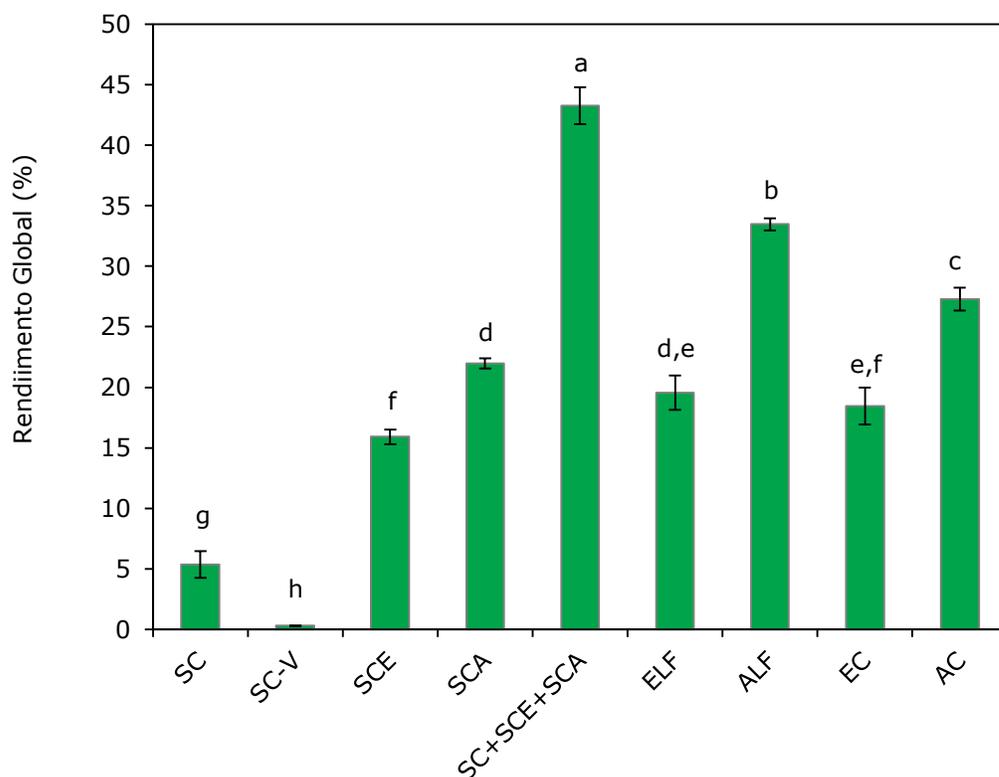
Extratos supercríticos e frações voláteis de *E. uniflora* foram obtidos por Peixoto, Oliveira e Cabral (2010) com pressões entre 100 e 300 bar e temperaturas entre 50 e 60 °C. A fração mais volátil nas condições estudadas apresentou rendimento global próximo a 0,1 %. Para Martinez-Correa et al. (2011), o rendimento supercrítico volátil obtido a 400 bar e 60 °C foi de 0,47 %. Não foram encontrados na literatura resultados para extração supercrítica de voláteis (fração leve) de *L. sidoides*.

Diferentes autores apresentam o rendimento em óleo volátil das matrizes vegetais obtido por hidrodestilação. Esses dados podem ser comparados com os extratos voláteis (SC-V) obtidos via extração supercrítica. Os resultados encontrados para *E. uniflora* foram de 0,54 % (PEIXOTO, OLIVEIRA e CABRAL, 2010), 0,42 % (GALHIANE et al. 2006) e 0,74 % (MORAIS et al.,1996). Para *L. sidoides* os resultados dentro da literatura são, 1,20 % (GOMES et al., 2012), 1,06 % (VERAS et al., 2012) e 1,80 % (LIMA et al., 2011).

Para as amostras analisadas neste trabalho, o rendimento da fração volátil obtida por extração supercrítica (SC-V) foi menor que a maioria dos valores citados na literatura e menor que extrato volátil obtido por Peixoto, Oliveira e Cabral (2010). O rendimento de voláteis foi de 0,31 e 0,95 % para *E. uniflora* e *L. sidoides*, respectivamente. Essas diferenças são previsíveis, visto que a concentração de voláteis em plantas medicinais pode

variar consideravelmente dependendo de vários fatores como origem, idade e desenvolvimento da planta, sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, nutrientes, condições de coleta, estocagem, entre outros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007), além dos processos de extração supercrítica (SC-V) e hidrodestilação apresentarem características diferentes.

A fim de determinar se existe diferença significativa entre as médias dos rendimentos obtidos, foi realizado o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A Figura 5.1 compara os rendimentos globais de extração obtidos pelos diferentes métodos para *E. uniflora*.



**Figura 5.1** – Rendimento dos extratos (secos) das folhas de pitanga (*E. uniflora*) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Observa-se na Figura 5.1, que para *E. uniflora* existe diferença significativa entre os rendimentos de extração aquosa e etanólica dentro de cada método utilizado, comportamento esperado devido a polaridade dos solventes.

As extrações que empregaram água como solvente em etapa única (ALF e AC) e a extração sequencial aquosa posterior à extração supercrítica (SCA) destacaram sobre as demais, resultando em rendimentos globais superiores aos extratos etanólicos e supercrítico.

Não se observou diferença significativa entre as médias dos rendimentos globais de extração etanólica convencional (EC) e extração etanólica sequencial (SCE), mostrando a pouca influência da 1ª etapa de extração (SC) do ponto de vista do rendimento global.

O rendimento global da extração supercrítica (5,37 %) obtido para amostras de folhas de pitanga foi superior ao reportado por Martinez-Correa (2010) (3,5 %) para as mesmas condições operacionais (400 bar e 60 °C). Esta diferença no rendimento de extrato pode ser causada em parte pelo uso de folhas jovens obtidas da parte inferior da planta (Figura 5.2) e pelo diâmetro médio geométrico das partículas, este último maior que o utilizado neste trabalho.



**Figura 5.2** – Fotografia da região da planta onde foram coletadas as amostras de folhas de pitanga (*E. uniflora*) no CPQBA – UNICAMP.

Os rendimentos globais obtidos nas extrações convencionais foram bem superiores aos obtidos por Martinez-Correa (2010), que obteve 8,0 e 20,0 % de rendimentos de extratos, contra 18,43 e 27,28 % apresentados nesse trabalho, respectivamente para extração etanólica e aquosa convencional. Essa diferença pode ser em parte devido às modificações realizadas na metodologia de Cseke et al. (2006), além da utilização das folhas jovens e da diferença no diâmetro médio geométrico das partículas.

A metodologia utilizada, descrita no item 4.4.4 da seção Material e Métodos, foi modificada de acordo com as dificuldades e/ou necessidades encontradas durante a execução do experimento para obtenção de extratos de *E. uniflora* e *L. sidoides*.

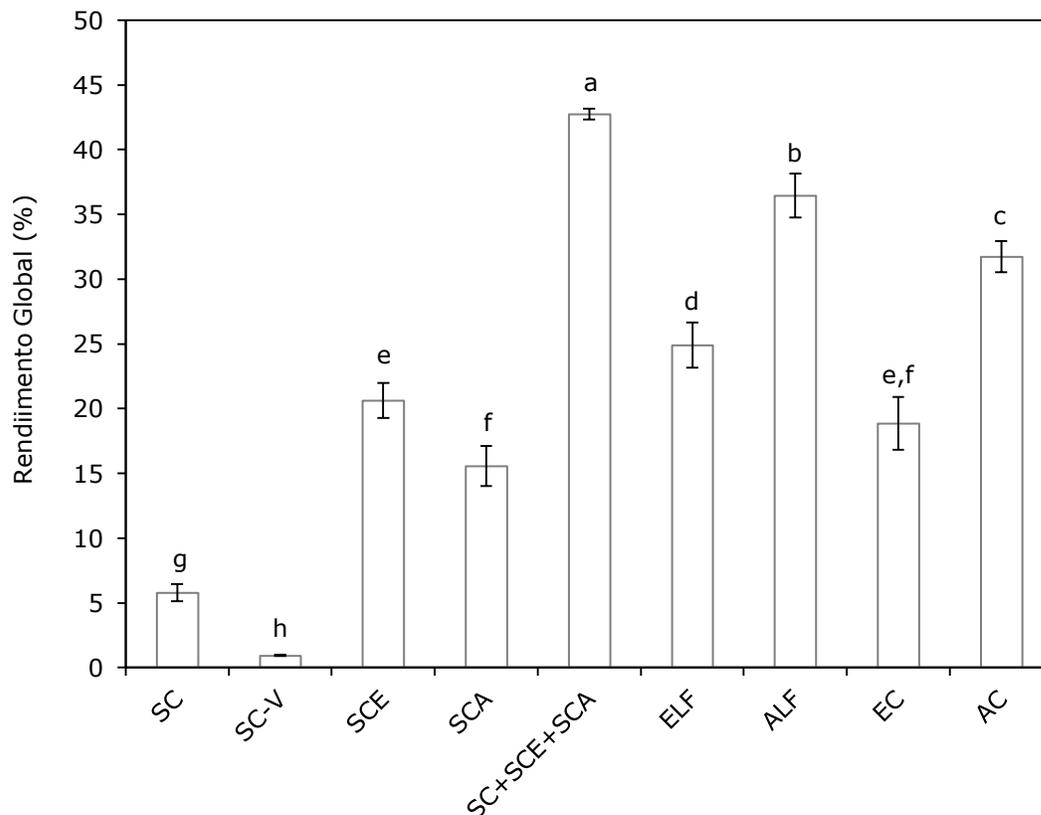
A extração exaustiva é uma técnica eficiente na obtenção de componentes ativos de matrizes vegetais, pois o equilíbrio entre as concentrações dos líquidos intra e extracelular não é atingido, uma vez que o solvente pode ser renovado. Assim, o tempo de extração escolhido foi de 6 horas para a extração convencional (a baixa pressão), renovando-se o solvente a cada 2 horas (solvente total/3 etapas de 2 horas). Para isso a razão de sólido para solvente (m/v) utilizada na metodologia original (CSEKE et al., 2006) mostrou que razões maiores poderiam ser utilizadas, uma vez que 1/3 do volume total de solvente utilizado em cada etapa não foi suficiente para solubilizar a massa de amostra que permaneceria sob agitação. Assim, a razão sólido para solvente total (m/v) foi aumentada de 1:20 para 1:33 (m/v). Desta maneira foi possível obter resultados próximos ao esgotamento total da planta, para efeito de comparação com os métodos de extração em extrator de leito fixo (sequencial e em etapa única).

Altas temperaturas são utilizadas para melhorar a eficiência da extração, devido à maior taxa de difusão e solubilidade dos analitos em solventes, embora temperaturas elevadas também possam afetar a atividade dos extratos e/ou ocasionar a perda de compostos voláteis de interesse. Dessa forma, decidiu-se utilizar uma temperatura de operação mais amena na extração convencional, para se evitar a degradação de compostos de interesse presentes no extrato e para uma melhor comparação entre os diferentes métodos de extração. Segundo Baby et al. (2007), a temperatura de degradação dos flavonoides depende de sua estrutura química e da interação entre eles. De acordo com Peterson e Dwyer (1998), a preparação de alimentos (frutas e vegetais) contendo

flavonoides, incluindo lavagem, descascamento e cozimento a temperaturas próximas de 100 °C acarreta uma perda média de até 53,0 % destes compostos. Diante do exposto, optou-se por trabalhar na temperatura de 60 °C, ao invés da de 80 °C proposta pelo método de Cseke et al. (2006).

Outro fator importante que interfere no rendimento de extração é a razão soluto/solvente que deve permanecer constante durante o período de extração. Assim, observou-se a necessidade de acoplar ao sistema utilizado na extração (Figura 4.8) um condensador de refluxo, necessário para evitar a perda de voláteis no vapor do solvente. O extrato aquoso foi obtido da mesma forma que o extrato etanólico para as duas matrizes vegetais.

A Figura 5.3 compara os rendimentos globais obtidos por diferentes métodos de extração para folhas de *L. sidoides*. As médias dos rendimentos foram submetidas ao Teste de Tukey a um nível de significância de 5,0 %.



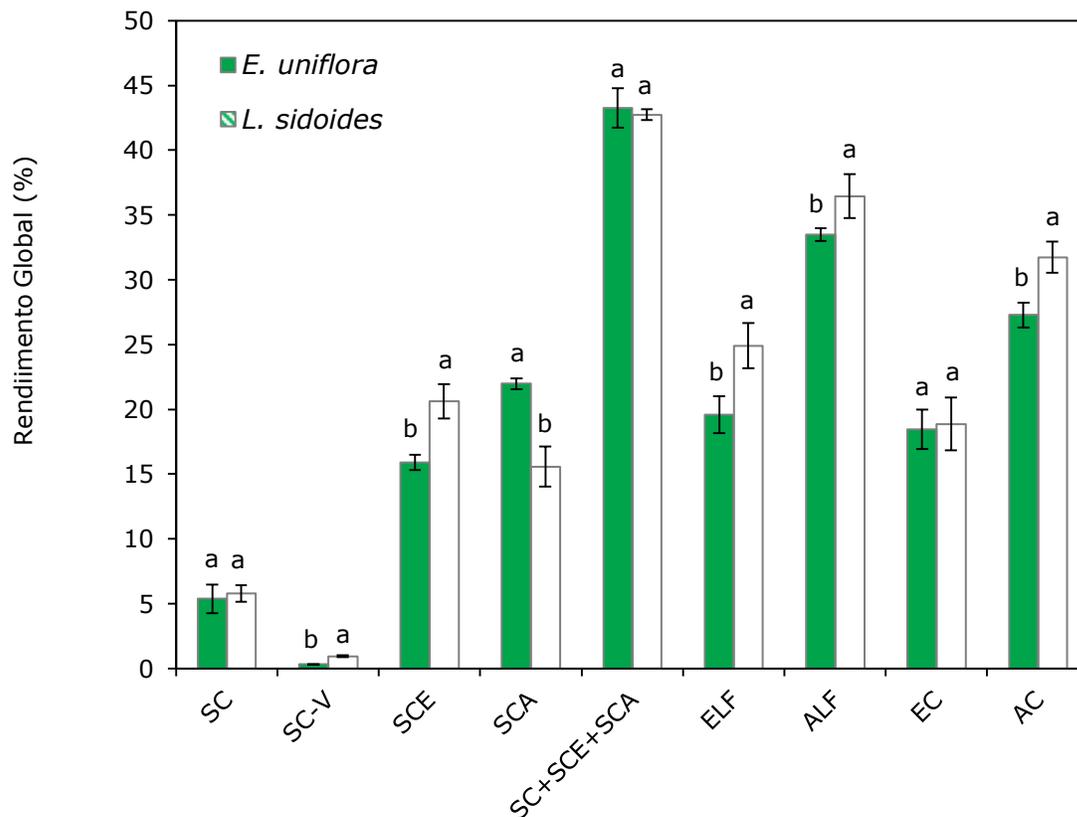
**Figura 5.3** – Rendimento dos extratos (secos) das folhas de alecrim-pimenta (*L. sidoides*) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao alecrim-pimenta, as extrações em etapa única com maior rendimento foram em primeiro lugar a extração aquosa em leito fixo (ALF), seguida da extração aquosa convencional (AC). Depois vieram as extrações etanólicas (ELF > EC = SCE) e, por último, as extrações supercríticas.

Observa-se nos resultados obtidos nos diferentes processos que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as extrações etanólica e aquosa, dentro de cada método de extração em etapa única. Nota-se também que houve diferença considerável entre os rendimentos das etapas de extração sequencial (SC, SCE e SCA), fato explicado tanto pela seletividade e polaridade dos solventes como pela natureza da matriz vegetal.

Na extração aquosa em leito fixo (ALF) obteve-se rendimento de extração de 36,47 %, enquanto que na extração aquosa pós-supercrítica (SCA) extraiu-se menos da metade desta quantidade (15,58 %), o que mostra a influência da extração prévia com CO<sub>2</sub> supercrítico no rendimento global das etapas subsequentes e a possibilidade do etanol (etapa anterior a da água) ter extraído alguns compostos que também seriam extraídos na terceira etapa com a água.

Na Figura 5.4 são comparados os rendimentos dos extratos das matérias primas dentro de cada método de extração. Para identificar a matriz com a melhor resposta em cada processo foram realizadas comparações entre as médias pelo teste de Tukey a 5,0 % de significância.



**Figura 5.4** – Comparação entre os rendimentos dos extratos das folhas de pitanga (*E. uniflora*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*) dentro dos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

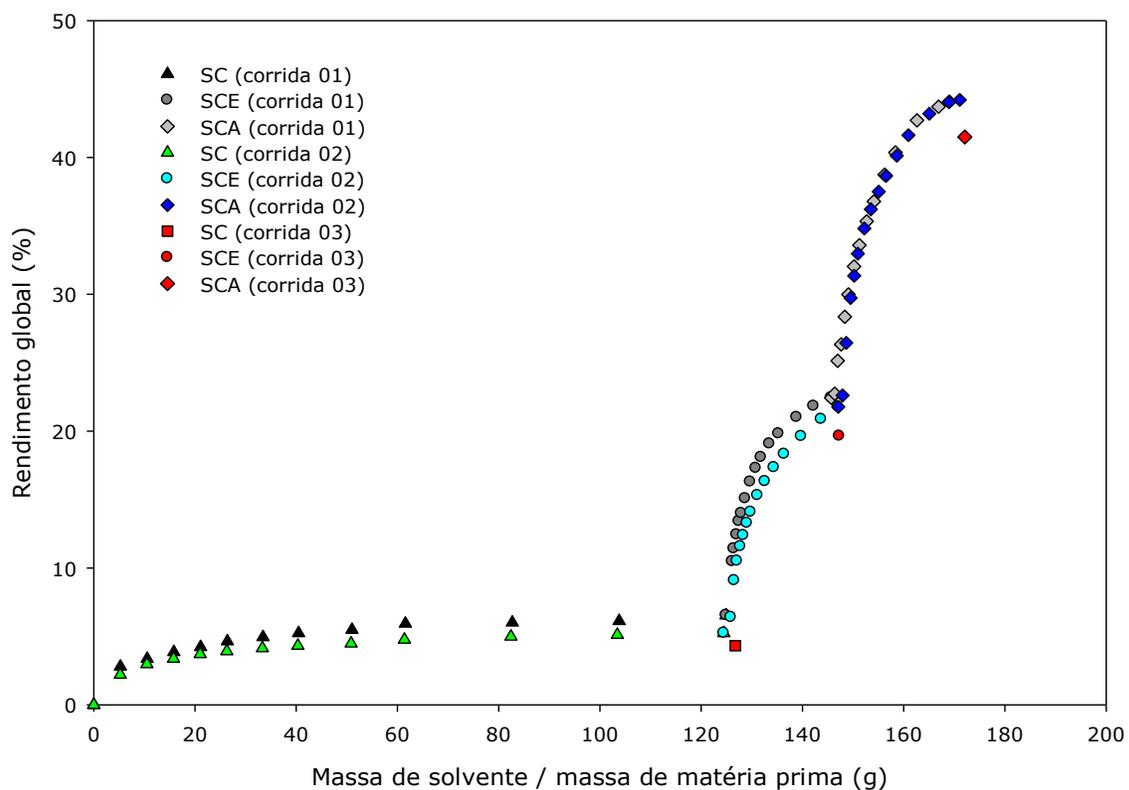
Na Figura 5.4, os diferentes processos estudados para obtenção de extratos de folhas de *E. uniflora* e *L. sidoides* resultaram em rendimentos globais de extração estatisticamente iguais para extração supercrítica (SC), extração etanólica convencional (EC) e no rendimento acumulado de extrato (SC+SCE+SCA). Para os outros métodos de extração, o alecrim-pimenta apresentou rendimentos significativamente maiores quando comparado com a pitanga, exceto na extração aquosa sequencial (SCA).

O máximo rendimento em etapa única observado para a *E. uniflora* foi de 33,34 % na extração aquosa (ALF), enquanto que para a *L. sidoides* para esse mesmo método o rendimento foi significativamente maior, cerca de 36,47 %.

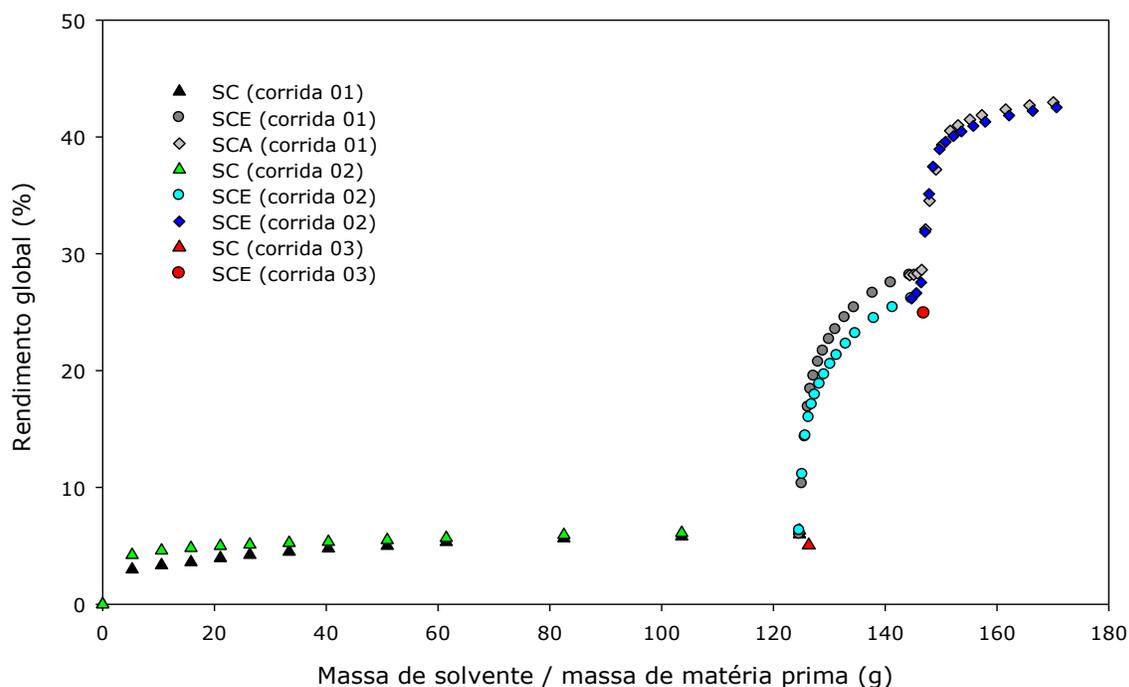
### 5.2.2 Cinéticas de extração sequencial

As curvas de extração sequencial (supercrítica + etanólica + aquosa) obtidas a 400 bar e 60 °C, estão representadas na Figura 5.5 para *E. uniflora* e na Figura 5.6 para *L. sidoides* (os dados experimentais obtidos estão apresentados no Apêndice C). A vazão de solvente utilizada foi de 1,5 L/min de CO<sub>2</sub> ( $\rho = 1,65 \text{ g/L}$ ) na primeira etapa, 0,5 mL/min de etanol ( $\rho = 0,78522 \text{ g/mL}$ ) na segunda etapa e 0,5 mL/min de água ( $\rho = 1,0 \text{ g/mL}$ ) na terceira etapa.

Nas três etapas, foram construídas duas curvas de extração (corridas 01 e 02) e uma extração total (corrida 03) para obter um único extrato, no qual foram realizadas as análises de fenóis e flavonoides totais. As curvas apresentam o rendimento acumulado de extrato (g extrato/g matéria prima) em função da razão da massa de solvente acumulada pela massa da amostra inicial (~ 7,0 g).



**Figura 5.5** – Cinética e rendimentos de extração sequencial a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) utilizando CO<sub>2</sub> (1,5 L/min\*), etanol (0,5 mL/min\*) e água (0,5 mL/min\*) como solventes. Extrato supercrítico (SC), extrato etanólico pós supercrítico (SCE) e extrato aquoso pós supercrítico e etanólico (SCA). \* Vazões medidas a 0,93 bar e 25 °C.



**Figura 5.6** – Cinética e rendimentos de extração sequencial a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Lippia sidoides* Cham (alecrim-pimenta) utilizando CO<sub>2</sub> (1,5 L/min\*), etanol (0,5 mL/min\*) e água (0,5 mL/min\*) como solventes. Extrato supercrítico (SC), extrato etanólico pós supercrítico (SCE) e extrato aquoso pós supercrítico e etanólico (SCA). \* Vazões medidas a 0,93 bar e 25 °C.

O tempo de extração é um parâmetro de processo importante, já que muitas vezes a composição do extrato é obtida em função deste, da pressão e da temperatura de extração. Assim, realizaram-se os experimentos no maior tempo possível ou até que o período difusional aparentemente fosse atingido através da visualização da coloração do extrato, garantindo que os ensaios apresentassem resultados bastante próximos do esgotamento real do leito de extração, maximizando a quantidade de extrato obtido em cada etapa. O tempo de extração médio foi de 6 horas para cada uma das etapas da extração sequencial. Logo, o tempo total da extração sequencial foi de aproximadamente 18 horas. Assim, para realização das três etapas foram necessários dois dias de experimento. No primeiro, foi realizada a extração supercrítica e no segundo, as extrações etanólica e aquosa. Após obtenção, os extratos SC e SCE foram seguidamente secos e pesados antes de serem lacrados e armazenados sob refrigeração (-26 °C). Os frascos de extrato aquoso (SCA) foram armazenados em freezer doméstico a -26 °C para posterior liofilização. E o extrato

supercrítico volátil (SC-V) foi pesado para cálculo do rendimento, embalado e estocado sob refrigeração (-26 °C) para posterior análise (CG-EM).

Como podemos observar nas Figuras 5.5 e 5.6 ou nas Tabelas C.1 a C.5 (Apêndice C), na extração supercrítica, tanto para *E. uniflora* quanto para *L. sidoides*, no período de taxa constante de extração (CER) observado durante a primeira hora de extração (~ 20 g solvente/g mp), obteve-se 70,0 % do rendimento global. Nas 2 horas seguintes (~ 60 g solvente/g mp), ou período de taxa de extração decrescente (FER), atingiu-se 90,0 % do rendimento. E nas últimas 3 horas da extração a curva atingiu praticamente um valor constante, indicando que a taxa de transferência de massa nessa etapa é controlada principalmente pelo fenômeno difusivo na parte interna da partícula sólida (DC). Diante do exposto, é possível afirmar que para extração supercrítica o período de extração de 3 horas é suficiente para se atingir o período difusional.

Para a extração etanólica sequencial (SCE), cerca de 50,0 e 65,0 % do rendimento esperado foi extraído na primeira hora (~ 130 g solvente/g mp) para pitanga e alecrim-pimenta, respectivamente. Após 4 horas de extração (~ 140 g solvente/g mp), obteve-se aproximadamente 90,0 % do rendimento para ambas as matrizes vegetais. A disposição dos pontos das curvas de extração SCE separadamente das outras etapas (Apêndice C – Figuras C.1 e C.3) permite uma visualização melhor do comportamento da extração, indicando a possibilidade de não ter atingido o esgotamento completo do soluto no leito no tempo de extração considerado de 6 horas, mesmo alcançando um rendimento de 15,90 e 20,63 % para *E. uniflora* e *L. sidoides*, respectivamente.

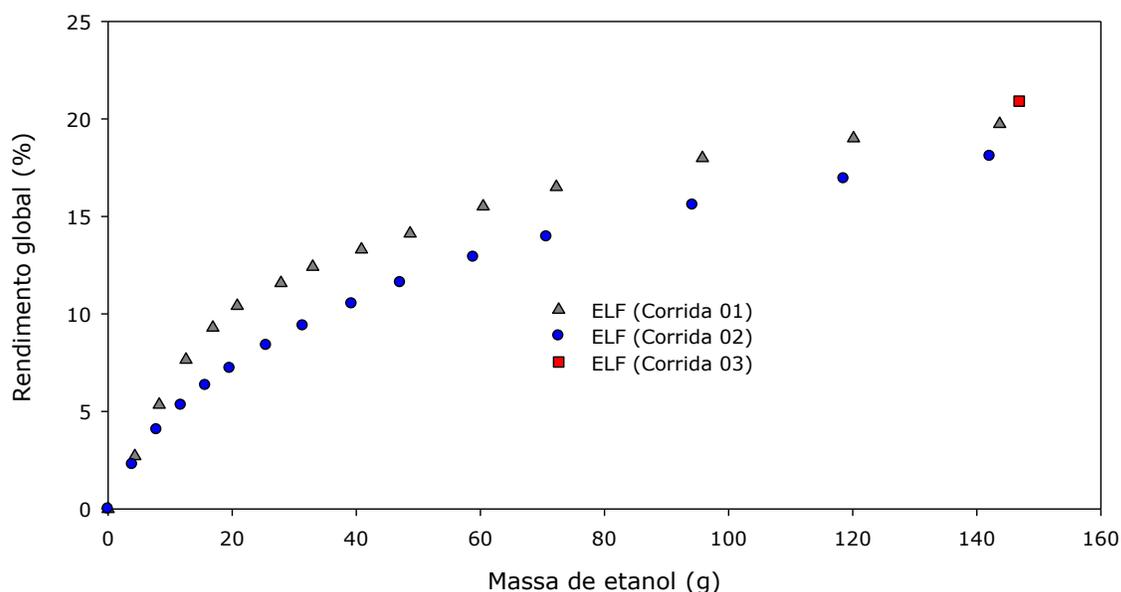
Observando as curvas de extração aquosa sequencial (SCA), ambas as matérias primas apresentaram uma boa reprodutibilidade dos experimentos. Para o caso da *L. sidoides* (Figura 5.6), o leito de partículas aparentou estar praticamente esgotado dos solúveis em água, quando comparado à mesma etapa para a *E. uniflora* (Figura 5.5). A massa de extrato recuperada após 3 horas de extração (~ 160 g solvente/g mp) foi de aproximadamente 90,0 % para pitanga e para o alecrim-pimenta.

Os rendimentos observados no decorrer das cinéticas de extração sequencial mostram que tempos de extração menores poderiam ser utilizados, uma vez que o período

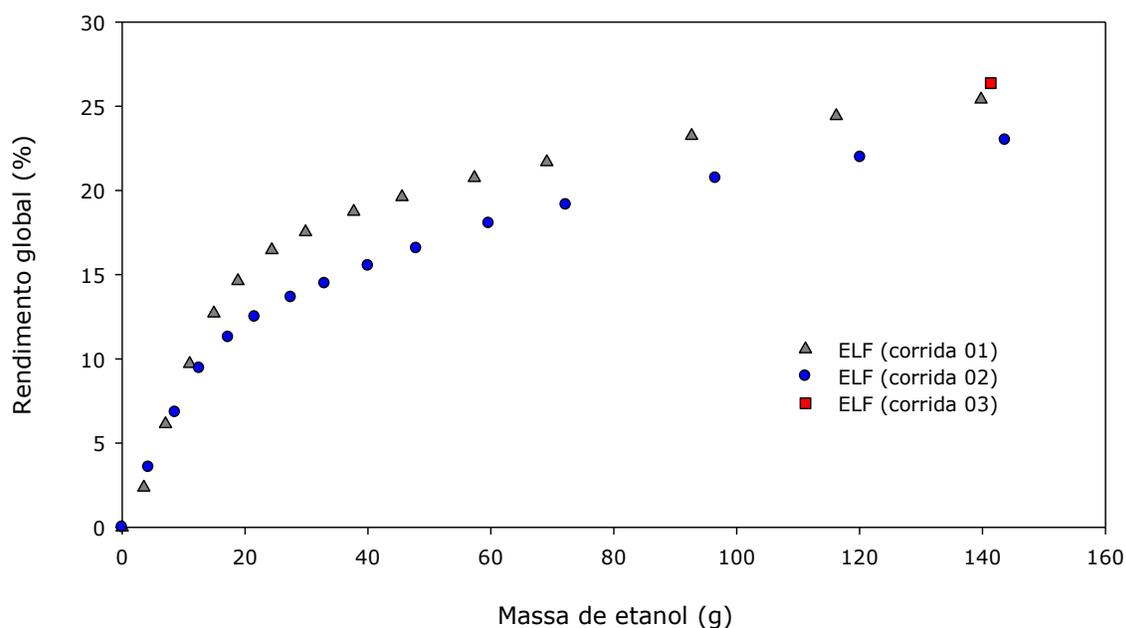
difusional (DC) foi atingido com aproximadamente 3 horas de extração para as extrações supercrítica (SC) e aquosa (SCA) e a partir de 4 horas para extração etanólica (SCE).

### 5.2.3 Cinéticas de extração etanólica

As cinéticas de extração etanólica (ELF) de amostras *E. uniflora* e *L. sidoides* em uma única etapa (400 bar e 60 °C) são mostradas nas Figuras 5.7 e 5.8, respectivamente. As figuras mostram duas curvas de extração (corridas 01 e 02) e uma extração total (corrida 03), expressas em função da massa de extrato. A metodologia utilizada para as cinéticas de extração etanólica foi detalhada na Seção 4.4.3.



**Figura 5.7** – Cinética e rendimentos de extração com etanol a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *E. uniflora* L.



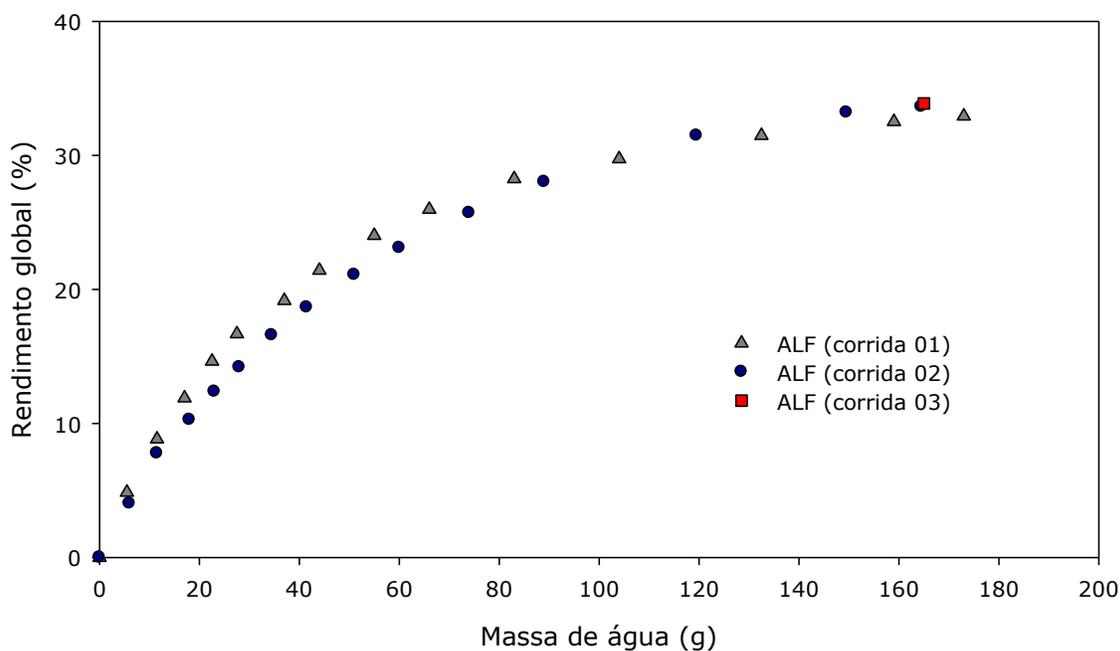
**Figura 5.8** – Cinética e rendimentos de extração com etanol a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *L. sidoides* Cham.

Observa-se nas Figuras 5.7 e 5.8 que o tempo de extração e a massa de etanol utilizada não foram suficientes para o esgotamento do leito, o que indica que grande parte dos pontos experimentais encontra-se na região fortemente dependente da solubilidade dos solutos extraídos (aumento linear). Após esse período há uma diminuição da taxa, porém não suficiente para atingir um patamar constante na curva de extração.

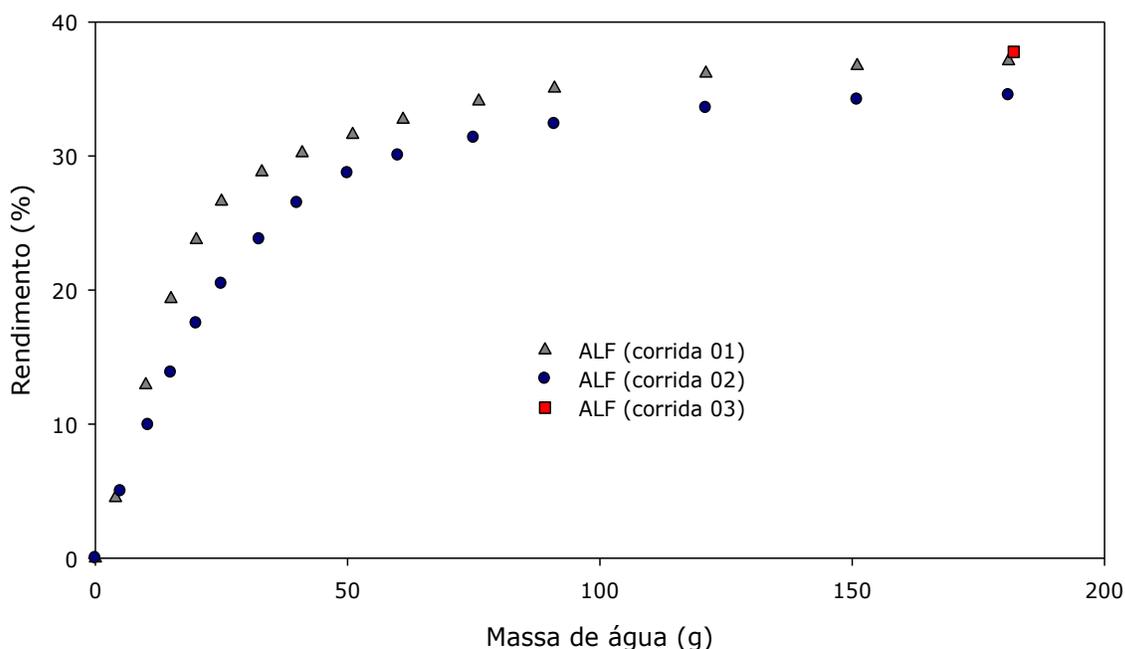
Nos primeiros instantes do processo (1 hora de extração ou ~ 25 g solvente), o rendimento atinge um valor médio de 10,0 e 15,0 % para *E. uniflora* e *L. sidoides*, respectivamente, correspondendo a aproximadamente 60,0 % do rendimento global. Depois dessa fase, nas próximas 2 horas (~ 70 g solvente) de extração o rendimento atinge cerca de 80,0 % do total para ambas as matrizes.

## 5.2.4 Cinéticas de extração aquosa

As Figuras 5.9 e 5.10 apresentam as cinéticas de extração aquosa em etapa única (ALF) de *E. uniflora* e *L. sidoides*, respectivamente. As condições operacionais foram de 400 bar, 60 °C, vazão de 0,5 mL/min e tempo total de extração cinco horas e meia para *E. uniflora* de 6 horas para *L. sidoides*. As figuras mostram duas repetições feitas coletando-se extratos em intervalos de tempo preestabelecidos (corrida 01 e 02) e um ponto (uma extração) na corrida 03.



**Figura 5.9** – Cinética e rendimentos de extração com água a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *E. uniflora* L.



**Figura 5.10** – Cinética e rendimentos de extração com água a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *L. sidoides* Cham.

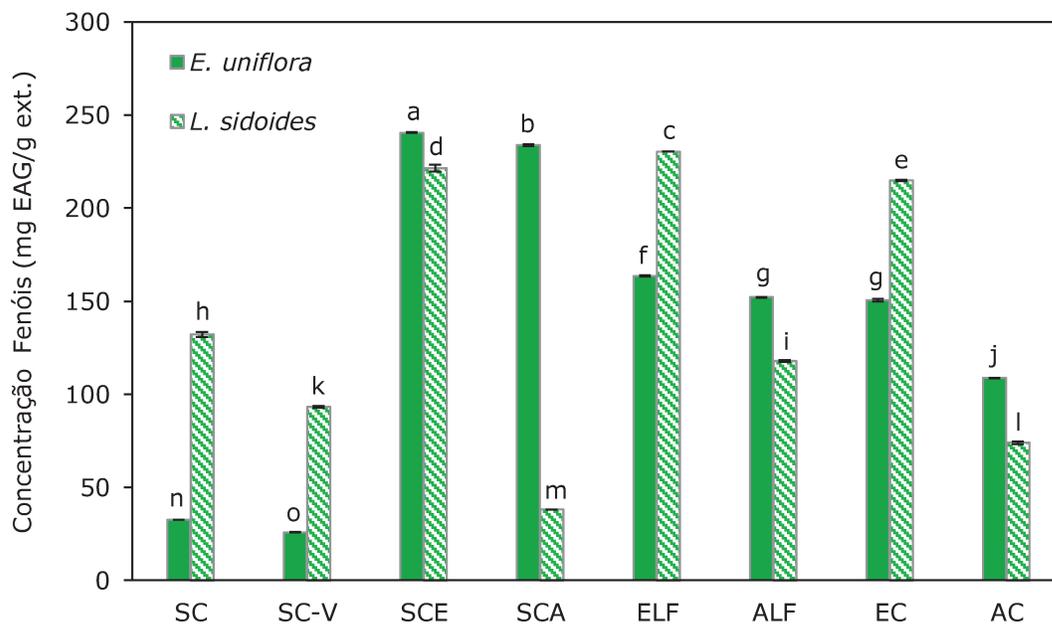
Nas primeiras corridas observam-se diferentes regiões: a primeira dependente da solubilidade dos solutos extraídos, a intermediária e a terceira controlada pela difusividade. Nos primeiros 6 pontos (1 hora de extração ou ~ 35 g solvente) foram obtidos em média 17,9 % para a *E. uniflora* e 26,3 % para a *L. sidoides*, em termos de rendimento acumulado, o que corresponde a aproximadamente 50,0 % e 70,0 % do total do processo, para *E. uniflora* e *L. sidoides*, respectivamente. Isso indica uma alta taxa de transferência de massa nos primeiros instantes da extração aquosa. Depois de 3 horas (~ 90 g solvente), a curva tende a um valor praticamente constante.

### 5.3 Análise química dos extratos

#### 5.3.1 Fenóis totais

Na Figura 5.11 estão apresentados os resultados para a concentração de compostos fenólicos (mg equivalente ácido gálico / g de extrato seco) nos extratos de *E. uniflora* e *L. sidoides*. A Figura 5.11 apresenta os dados que foram apresentados na Tabela 5.2. A curva

padrão de ácido gálico obtida para a análise de fenóis é apresentada no Apêndice D e os dados experimentais obtidos das análises dos extratos estão no Apêndice E.



**Figura 5.11** – Conteúdo de fenóis totais nos extratos de pitanga (*E. uniflora*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC) e aquoso convencional (AC). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos em extratos obtidos a partir de folhas de pitanga e alecrim-pimenta apresentou diferenças significativas em função da matriz vegetal e do método de extração empregado.

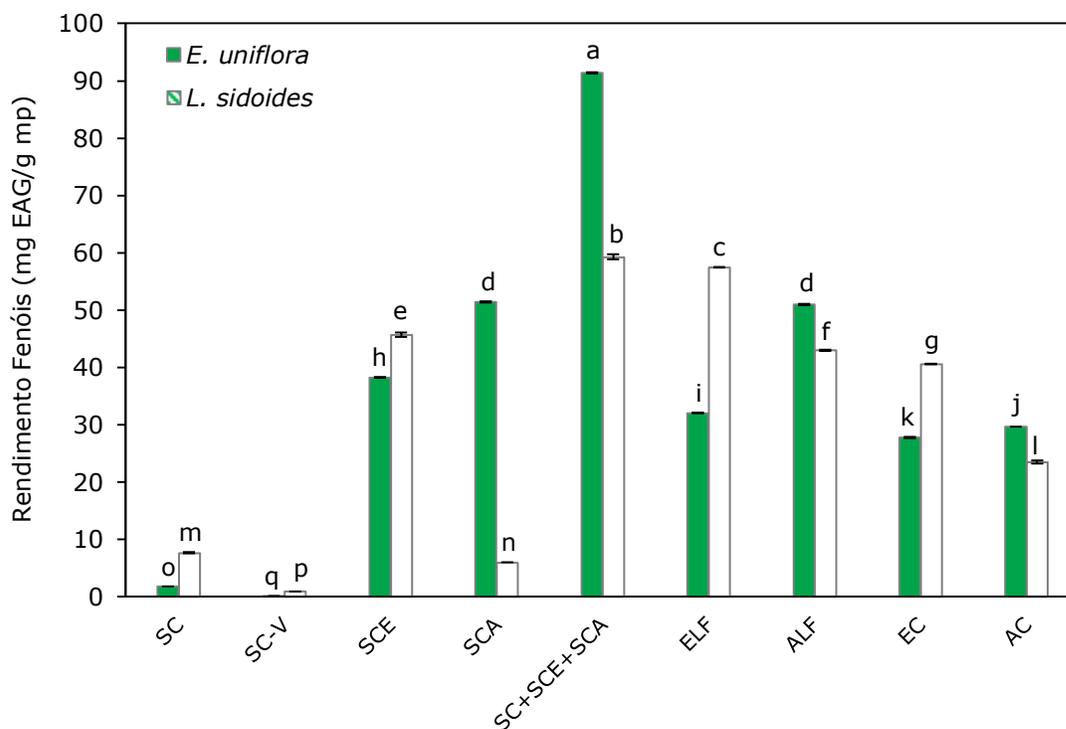
Pode-se observar que o conteúdo de fenóis nos extratos de *E. uniflora*, tanto nos processos em etapa única quanto na extração sequencial que envolvem o solvente etanol, foram bem superiores ao conteúdo dos outros solventes dentro de cada método. No caso da *L. sidoides*, as extrações etanólicas se destacaram em relação aos outros solventes independente do processo. Logo, o etanol apresentou uma maior afinidade química com os compostos extraídos favorecendo sua extração, o que indica que essas substâncias apresentam polaridade relativamente elevada.

Os valores das concentrações médias de fenóis presentes nos extratos de *E. uniflora* indicam que os extratos etanólicos e aquosos com prévia extração supercrítica são os que apresentaram o maior teor desses compostos por grama de extrato, dentre todos os extratos obtidos das folhas de *E. uniflora*. A extração prévia com scCO<sub>2</sub> permitiu obter extratos mais concentrados em compostos fenólicos do que os obtidos nos mesmos processos em etapa única (SCE > ELF > EC e SCA > ALF > AC). O mesmo não aconteceu para a *L. sidoides*, onde os extratos com prévia extração supercrítica apresentaram concentrações menores quando comparados às extrações em etapa única (ELF > SCE > EC e ALF > AC > SCA).

A menor concentração de fenóis obtida para as folhas de *E. uniflora*, foi na extração supercrítica (SC) (32,70 mg/g) seguida da extração supercrítica da fração volátil (SC-V) (25,96 mg/g), ao contrário dos extratos obtidos das folhas de *L. sidoides*, onde a extração supercrítica (132,21 mg/g) superou os extratos aquosos (SC > ALF > SC-V > AC > SCA). Essa diferença ocorre devido a polaridade dos compostos fenólicos presentes em cada matriz vegetal.

Estes resultados indicam a presença de compostos fenólicos de diferentes polaridades. No caso da *E. uniflora*, a maioria dos compostos fenólicos é de caráter polar visto que os extratos mais concentrados foram obtidos, primeiramente nos extratos etanólicos, depois nos extratos aquosos e por último nos extratos supercríticos. Isto justifica não ter havido diferença significativa entre o teor de fenóis dos extratos ALF e EC. No caso da *L. sidoides* as substâncias de caráter fenólico ficaram mais concentradas nos extratos etanólicos, seguidos do extrato supercrítico e por fim, nos extratos aquosos, o que indica a presença de compostos fenólicos apolares e de polaridade intermediária.

Na Figura 5.12 comparam-se os rendimentos de extração desses compostos (mg equivalente ácido gálico / g de matéria prima ) expressos em porcentagem. Os valores de rendimento para cada extrato das duas matrizes vegetais são apresentados na Tabela 5.2.



**Figura 5.12** – Rendimento de extração de fenóis totais de folhas (mp) de pitanga (*E. uniflora*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*). Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Na Figura 5.12 pode ser observado que, apesar das extrações etanólicas apresentarem uma concentração de fenóis significativamente maior em relação às extrações aquosas, quando se considera seus respectivos rendimentos globais estas últimas apresentam os melhores rendimentos de fenóis totais para *E. uniflora*.

O extrato aquoso sequencial (SCA) das folhas de pitanga apresentou o segundo maior rendimento de fenóis, equiparando-se ao extrato ALF e superando os extratos etanólicos (SCA = ALF > SCE > ELF > AC > EC), o que pode ser justificado pelo alto rendimento global de extração nos extratos aquosos. No caso do alecrim-pimenta os extratos etanólicos apresentaram a melhor combinação entre rendimento e concentração de compostos fenólicos (ELF > SCE > ALF > EC > AC > SCA).

Comparando os valores de rendimento de fenóis obtidos para os extratos aquosos, os melhores rendimentos foram obtidos a alta pressão. Diferentemente do alecrim-pimenta,

onde a extração em leito fixo (ALF) é maior que a extração convencional (AC) e esta maior que a sequencial (SCA), devido ao alto rendimento obtido na extração a baixa pressão.

Observou-se que o rendimento global de extração variou pouco entre os extratos EC, ELF e SCE, para *E. uniflora* e *L. sidoides*. No entanto, a análise estatística mostrou que a variável pressão possui influência significativa no rendimento de fenóis entre esses extratos. Para as duas matrizes, os extratos etanólicos obtidos a 400 bar (SCE e ELF) tiveram maior rendimento de substâncias fenólicas quando comparados ao extrato etanólico obtido a pressão atmosférica (EC).

O efeito da extração supercrítica prévia na extração sequencial permitiu obter extratos etanólicos a partir de folhas de pitanga, com maior rendimento de fenóis. O mesmo não acontece nos extratos aquosos em que a SCA não apresenta diferença significativa em relação a ALF. Para o alecrim-pimenta, a extração prévia com scCO<sub>2</sub> não melhorou a eficácia das extrações posteriores em termos de rendimento de fenóis totais.

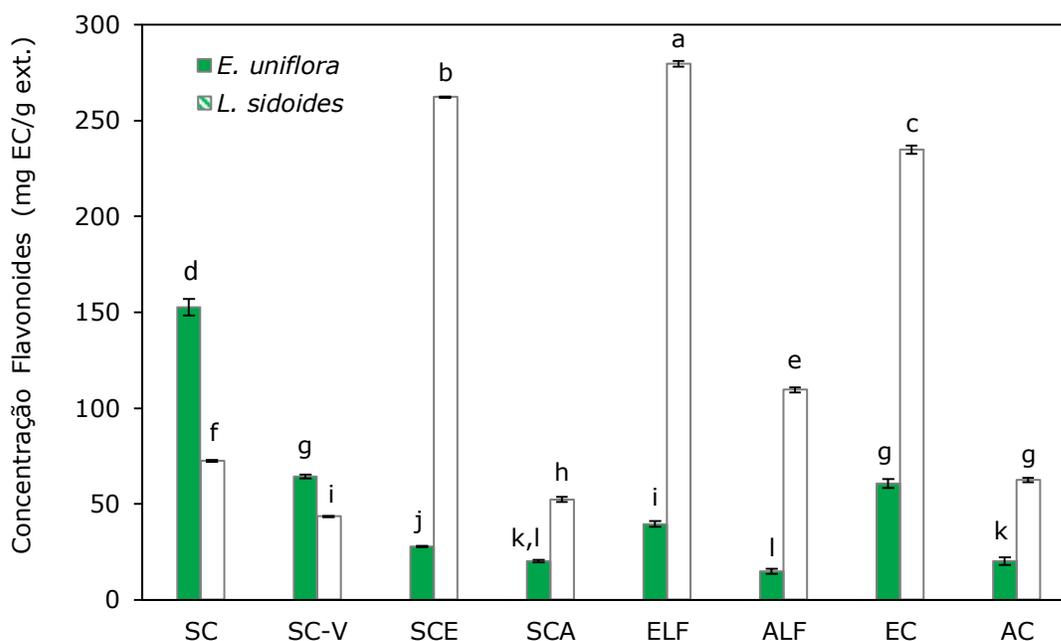
O melhor rendimento observado para pitanga foi de 91,38 %, enquanto que para a amostra de alecrim-pimenta o maior rendimento observado foi de 59,26 %, ambos na extração sequencial (SC+SCE+SCA). No caso do alecrim-pimenta esse rendimento foi muito próximo ao obtido na extração etanólica em leito fixo (57,44 %).

A análise dos dados de rendimento e concentração de compostos fenólicos totais para os extratos obtidos a partir das folhas das duas matrizes vegetais para as diferentes extrações aponta a extração sequencial (SC+SCE+SCA) e a extração etanólica em etapa única (ELF) como métodos eficazes na extração dessas substâncias no caso da *L. sidoides*. No caso da *E. uniflora*, aponta os métodos de extração sequencial (SC+SCE+SCA) seguido da extração aquosa em etapa única (ALF) .

Finalmente, é importante notar que as oscilações observadas na concentração de fenóis nas duas matrizes vegetais estão relacionadas à presença de compostos com diferentes características que passam a ser extraídos de acordo com o tipo de solvente e com as condições de processo empregadas, resultado em extratos com características diferentes.

### 5.3.2 Flavonoides totais

A Figura 5.13 representa os dados da Tabela 5.2 para concentração de flavonoides (mg equivalente catequina / g extrato seco) nos extratos das duas plantas avaliadas neste trabalho. A curva padrão de catequina obtida para a análise de flavonoides é apresentada no Apêndice D e os dados experimentais obtidos das análises dos extratos estão no Apêndice E.



**Figura 5.13** – Conteúdo de flavonoides totais nos extratos de pitanga (*E. uniflora*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC) e aquoso convencional (AC). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Na caracterização química dos extratos de *E. uniflora* e *L. sidoides*, quanto ao teor de flavonoides, foi observado que a concentração desses compostos em ambas as plantas apresenta uma considerável diferença, sendo significativamente maior nos extratos obtidos a partir das folhas de *L. sidoides*, exceto na extração supercrítica (SC).

As maiores concentrações de flavonoides para *E. uniflora* foram obtidas nos extratos supercríticos, com valores de 152,65 mg/g para SC e 64,3 mg/g para SC-V. Este

último foi estatisticamente igual ao teor de flavonoides obtido na extração etanólica convencional (EC). Em seguida a extração foi melhor com etanol e por último com a água.

No caso da *L. sidoides* as extrações etanólicas apresentaram concentrações mais altas de flavonoides por grama de extrato. As extrações aquosa e supercrítica apresentaram a seguinte relação quanto ao teor de flavonoides: ALF > SC > AC > SCA > SC-V.

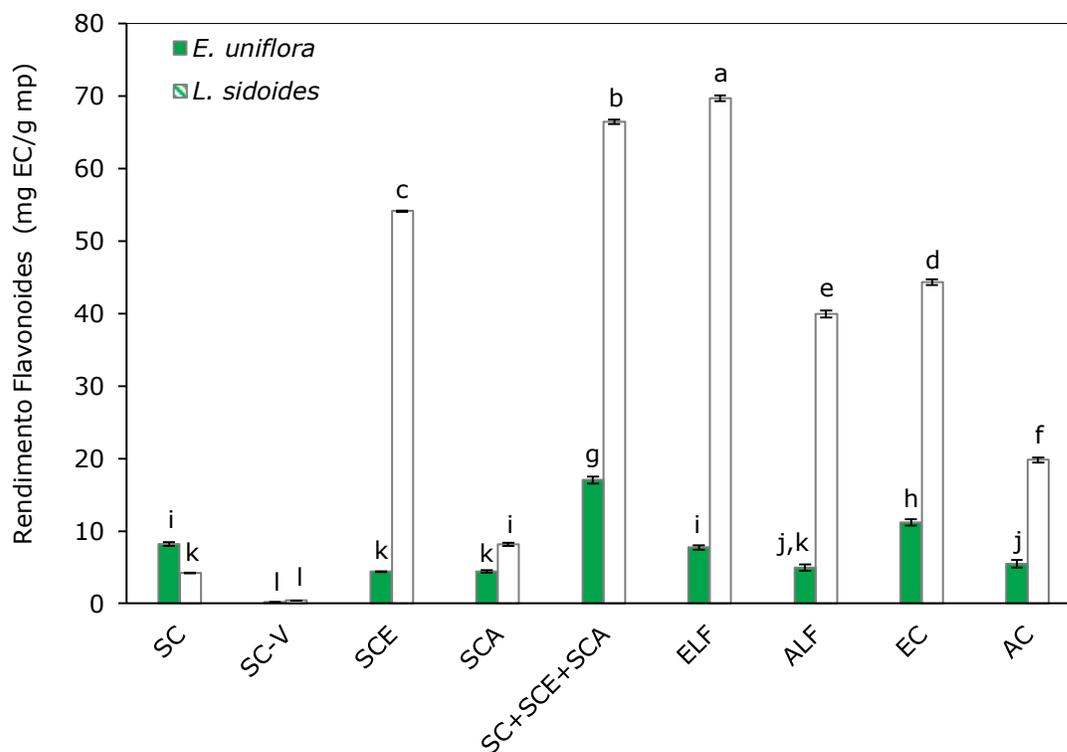
Do ponto de vista estatístico, a pressão não apresentou influência significativa no teor flavonoides ao nível de 5,0 % de significância nos extratos etanólicos e aquosos de *E. uniflora*. O mesmo não acontece com a *L. sidoides*, para qual os extratos obtidos em etapa única a alta pressão apresentaram rendimentos maiores que os o extratos convencionais.

Outro ponto importante a ser observado é o fato de que, apesar de as extrações aquosas apresentarem os melhores rendimentos globais de extração, notou-se que os extratos obtidos de folhas de *E. uniflora*, utilizando água como solvente, apresentaram as menores concentrações de flavonoides. Observou-se também que não houve diferença significativa entre SCA e ALF e entre SCA e AC. Para a *L. sidoides*, as menores concentrações oscilaram entre extrações aquosa e supercrítica.

É possível observar que a influência da extração supercrítica prévia sobre a concentração de flavonoides não favoreceu a extração desses compostos. Comparando os dados das Figuras 5.11 e 5.13, observou-se que para extração com scCO<sub>2</sub> o teor de flavonoides é superior ao de fenóis totais. Porém, sabe-se que os flavonoides estão incluídos no grupo dos compostos fenólicos, logo a concentração de flavonoides deve ser inferior ou igual à de fenóis. Esses resultados podem estar relacionados à escolha dos padrões utilizados para expressar a concentração de fenóis e flavonoides totais no extrato. Se a capacidade de redução da substância de referência não for precisamente a mesma do extrato analisado, a concentração calculada a partir da curva padrão não refletirá o teor de polifenóis ou flavonoides da amostra.

A quantificação de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas. Todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas. Porém, algumas limitações têm sido atribuídas a esses métodos, como o fato dos reagentes poderem ser reduzidos por outros constituintes do extrato. Dessa

forma, o reagente Folin-Ciocalteu não fornece uma ideia exata da quantidade de fenóis e sim da capacidade de redução da amostra analisada (MONTEIRO et al., 2005; APPEL et al., 2001). Essa constatação respalda a necessidade de uma abordagem analítica diferenciada, tendo como finalidade a padronização e validação de métodos para quantificação de fenóis e flavonoides totais em extratos supercríticos.



**Figura 5.14** – Rendimento de extração de flavonoides totais de folhas (mp) de pitanga (*E. uniflora*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*). Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Ao analisar os rendimentos de flavonoides observou-se uma tendência em relação ao rendimento global. Logo, os extratos supercríticos (SC e SC-V) que apresentavam as melhores concentrações de flavonoides por grama de extrato de *E. uniflora* ficaram abaixo dos extratos etanólicos em termos de rendimento desses compostos ( $EC > SC = ELF > SCE > SC-V$ ). Portanto, apesar de todas as vantagens da utilização do dióxido de carbono em processos de extração supercrítica, nos casos em que os compostos que se pretende isolar

são substâncias de maior polaridade, o fato do CO<sub>2</sub> ser um composto apolar torna o processo pouco eficiente. Os extratos etanólicos da *L. sidoides* apresentaram as melhores combinações entre rendimento global de extração e concentração de flavonoides.

É importante notar que os extratos de *L. sidoides* obtidos utilizando etanol como solvente apresentaram os melhores rendimentos de flavonoides totais. Estes resultados indicam que o etanol apresenta uma afinidade com as substâncias de interesse, intensificando a obtenção dos compostos da família dos flavonoides, que são relativamente mais polares do que o dióxido de carbono e menos polares que a água.

Observou-se uma tendência de aumento do rendimento de flavonoides totais com a elevação da pressão. Os resultados de rendimento para as amostras obtidas de *L. sidoides* nas extrações etanólica e aquosa apresentaram a seguinte relação: ELF > SCE > EC e ALF > AC > SCA. Por outro lado, para as amostras obtidas a partir das folhas de *E. uniflora* os extratos etanólicos e aquosos não apresentaram grandes variações, sendo a extração ALF significativamente igual a AC e a SCE e SCA. O rendimento de flavonoides no extrato supercrítico foi semelhante ao extrato etanólico em leito fixo (ELF).

A extração sequencial permite remover compostos da família dos flavonoides com diferentes características. Além da solubilidade dos compostos variar de acordo com a polaridade do solvente, suas interações com outros constituintes da planta também interferem no grau de obtenção dessas substâncias. O rendimento acumulado de extrato na extração sequencial foi superior às extrações em etapa única para *E. uniflora*. No caso da *L. sidoides*, o rendimento acumulado foi menor quando comprado à extração etanólica em leito fixo (ELF) e consideravelmente maior ao obtido na extração sequencial com as folhas de *E. uniflora*.

O processo em três etapas não possibilitou a obtenção de extratos com maiores conteúdos de flavonoides quando analisada cada etapa separadamente, possivelmente devido às mudanças nas interações soluto-matriz decorrentes das modificações na microestrutura da planta.

Portanto, comparando as matrizes vegetais, para as quantificações de flavonoides, nota-se que a extração etanólica em leito fixo e a extração sequencial podem ser

consideradas os métodos mais eficazes na obtenção desses compostos, para *E. uniflora* e *L. sidoides*, respectivamente.

Os resultados para a concentração de fenóis e flavonoides nos extratos de *E. uniflora* obtidos por diferentes métodos de extração foram comparados com os dados reportados por Martinez-Correa (2010). A amostra de pitanga utilizada neste trabalho, compreendida por folhas mais jovens, apresentou menores concentrações de fenóis, porém o rendimento desses compostos foi muito próximo aos da amostra estudada pelo autor nas extrações supercrítica (SC), etanólica convencional (EC) e aquosa convencional (AC). A concentração e rendimento de flavonoides foram maiores, exceto no extrato aquoso.

Martinez-Correa (2010) constatou a influência positiva da extração supercrítica prévia a extração etanólica ou aquosa convencional, na concentração de fenóis e flavonoides nos extratos de *E. uniflora*. O mesmo foi observado nesse trabalho na obtenção de fenóis totais, quando se utilizou a extração supercrítica seguida da extração aquosa e etanólica em leito fixo (alta pressão). Os extratos convencionais posteriores à extração supercrítica obtidos pelo autor apresentaram-se mais concentrados em fenóis e flavonoides totais do que os extratos etanólico e aquoso em leito fixo obtidos na segunda e terceira etapa da extração sequencial (utilizou-se o mesmo método de determinação de compostos fenólicos descrito pelo autor).

Quando se analisa os resultados obtidos através da extração sequencial em três etapas, o rendimento global e de fenóis e flavonoides totais é superior aos valores reportados por Martinez-Correa (2010) nos métodos de extração em duas etapas e nas extrações em etapa única. Isso sugere o uso da extração sequencial utilizando  $scCO_2$ , etanol e água como solventes como uma estratégia eficiente na obtenção de extratos mais ricos em fenóis e flavonoides.

#### **5.4 Caracterização da fração mais volátil (CG-EM)**

As frações voláteis (SC-V) dos extratos obtidos via extração supercrítica foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-

EM) para análise qualitativa de seus constituintes. As análises foram realizadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

As composições químicas dos extratos voláteis das folhas de *E. uniflora* e *L. sidoides* estão apresentadas nas Tabelas 5.3 e 5.4, respectivamente. Os correspondentes cromatogramas estão no Apêndice F.

**Tabela 5.3** – Composição da fração rica em compostos voláteis da *Eugenia uniflora* L.

Pico	Composto identificado	MM	t <sub>R</sub> (min)	% Relativa	IR calculado	IR literatura*
1	α-copaeno	204	22,37	1,77	1374	1376
2	β-elemeno	204	23,06	1,67	1391	1390
3	trans-cariofileno	204	24,2	14,18	1419	1419
5	NI	202	24,78	1,05	1433	-
6	α-humuleno	204	25,53	1,10	1452	1454
7	allo-aromadendreno	204	25,82	0,62	1459	1461
8	germacreno D	204	26,7	15,00	1481	1480
9	Biciclogermacreno	204	27,31	12,26	1496	1494
10	NI	204	27,62	3,34	1504	-
11	γ-cadineno	204	28,05	1,08	1515	1513
12	δ-cadineno	204	28,33	1,18	1522	1524
13	germacreno B	204	29,65	13,49	1556	1556
14	Espatuleno	220	30,45	1,73	1577	1576
15	Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	216	32,5	15,72	1631	1634
16	α-muurolo	222	32,95	0,76	1643	1645
17	Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona-epóxido	232	36,91	11,98	1753	1747
18	NI	234	39,87	0,48	1840	-
Monoterpenos				-		
Sesquiterpenos				92,54		
<b>Total</b>				<b>92,54</b>		

\* Adams (1995) e Adams (2007). MM: Massa molecular; t<sub>R</sub>: tempo de retenção (minutos); IR: índice de retenção; NI: não identificado.

A fração volátil recuperada ao longo da extração supercrítica das folhas de *E. uniflora* analisada por CG-EM apresentou como compostos majoritários selina-1,3-7(11)-

trien-8-ona (15,72 %), germacreno-D (15,0 %) e trans-cariofileno (14,18 %) e, na sequência, apareceram germacreno-B (13,49 %), biciclogermacreno (12,26 %) e selina-1,3-7(11)-trien-8-epóxido (11,98 %). Estes compostos também foram encontrados no óleo essencial da planta obtido por hidrodestilação (VICTORIA et al., 2012; OGUNWANDE et al., 2005; MORAIS et al., 1996). No total, foram identificados 16 compostos correspondentes a 92,54 % do extrato volátil.

Extratos supercríticos (SC) e extratos supercríticos voláteis (SV-V) de *E. uniflora* foram obtidos por Martinez-Correa et al. (2011) a 60 °C e 400 bar. Os extratos SV-V apresentaram como compostos majoritários a selina-1,3-7(11)-trien-8-epóxido (15,54 %) e selina-1,3-7(11)-trien-8-ona (11,59 %), seguidos de germacreno-B, germacreno-D e trans-cariofileno. Peixoto, Oliveira e Cabral (2010), obtiveram extratos supercríticos de folhas de *E. uniflora* a pressões entre 100 e 300 bar e 50 e 60 °C. Os extratos SC apresentaram rendimentos globais entre 1,45 % e 3,17 %, com presença de compostos majoritários como C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>, curzereno e germacreno B. A fração mais volátil (SC-V) apresentou rendimento global próximo a 0,1 % e compostos majoritários como germacreno B curzereno, germacreno D e C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>.

Diferentes pesquisadores relataram a presença de outros compostos, não identificados neste trabalho, no óleo essencial de *E. uniflora* como: curzereno (RODRIGUES et al. 2013), furanodieno e furanoelemeno (MELO et al., 2007) . Essas diferenças podem estar associadas ao método de extração e ao quimiotipo da planta. Segundo a ANVISA (2005), o termo quimiotipo se aplica a planta aromática que se distingue de outras da mesma espécie botânica por apresentar composição química diferente. Logo esta amostra de *E. uniflora* se enquadraria no quimiotipo I, com predominância dos sesquiterpenos da Selina (LOPES, 2008).

Com relação aos voláteis de *L. sidoides*, sua composição química obtida por CG-EM é apresentada na Tabela 5.4.

**Tabela 5.4** – Composição da fração rica em compostos voláteis da *Lippia sidoides* Cham.

Pico	Composto identificado	MM	t <sub>R</sub> (min)	% Relativa	IR calculado	IR literatura*
1	o-cimeno	134	8,3	0,57	1024	1022
2	1,8-cineol	154	8,52	1,23	1030	1031
3	γ-terpineno	136	9,47	0,59	1057	1059
4	cis-sabineno	154	9,8	0,36	1067	1068
5	timol metil éter	164	16,5	2,21	1234	1235
6	timol	150	19,43	78,35	1304	1289
7	carvacrol	150	19,67	traços	1310	1299
8	α-copaeno	204	22,38	1,04	1375	1376
9	trans-cariofileno	204	24,18	9,32	1420	1418
10	germacreno D	204	26,65	1,62	1480	1480
11	biciclogermacreno	204	27,26	1,00	1495	1494
12	δ-cadineno	204	28,33	0,79	1522	1524
				Monoterpenos	83,31	
				Sesquiterpenos	13,77	
<b>Total</b>				<b>97,08</b>		

\* Adams (1995) e Adams (2007). **MM**: Massa molecular; **t<sub>R</sub>**: tempo de retenção (minutos); **IR**: índice de retenção.

No extrato de *L. sidoides*, 12 compostos representam 97,08 % do óleo essencial de *L. sidoides*. Destacam-se como compostos majoritários: timol (78,35 %) e trans-cariofileno (9,32 %). Estes compostos são também apresentados como constituintes majoritários por Cavalho et. al (2013).

Alguns autores relataram a presença de outros compostos no óleo essencial de *L. sidoides* obtido por hidrodestilação, alguns não identificados na matriz vegetal utilizada nesse trabalho ou em quantidades diferentes como no caso do carvacrol: timol (67,60 %) e carvacrol (6,30 %) (GOMES et al., 2012); timol (84,9%), p- cimeno (5,33 %) e carvacrol (0,41 %) (VERAS et al., 2012); timol (42,33 %) p-cimeno (11,97 %), trans-cariofileno (11,03 %) e carvacrol (4,56 %) (CARVALHO et al. 2013); timol (78,37%) p-cimeno (6,32 %), trans-cariofileno (6,17%) (DE MEDEIROS et al., 2011)

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a combinação de processos pode ser considerada um método eficaz na obtenção de extratos com diferentes composições e funcionalidades e que a influência da extração supercrítica como primeira etapa depende da matriz vegetal e dos compostos de interesse na extração.

O processo em três etapas foi o mais eficiente quando se desejou obter extratos com alto rendimento global de extração e de fenóis e flavonoides totais. A exceção foi o rendimento de flavonoides da *L. sidoides*, onde o extrato etanólico em leito fixo (ELF) foi significativamente maior que o sequencial em três etapas (SC+SCE+SCA).

A extração prévia com CO<sub>2</sub> supercrítico diminuiu o rendimento global de extração das etapas subsequentes, quando estas foram comparadas às extrações etanólica e aquosa em etapa única.

Em relação às extrações em uma etapa, os maiores rendimentos globais de extração foram na extração aquosa em leito fixo em primeiro lugar, seguido da extração aquosa convencional, depois nos extratos etanólicos e por último nos extratos supercríticos para ambas as matrizes vegetais.

No geral, as extrações a 60° C e 400 bar mostraram-se mais eficientes no rendimento e na extração dos componentes de interesse deste trabalho do que as extrações a baixa pressão (convencionais).

O efeito da extração prévia com CO<sub>2</sub> supercrítico permitiu obter extratos com maior conteúdo de fenóis totais nas extrações etanólica e aquosa posteriores para *E. uniflora*. O mesmo não foi observado no caso da *L. sidoides*.

A utilização do etanol como solvente, tanto em processos em etapa única quando na extração sequencial, permitiu a obtenção de extratos mais concentrados em compostos fenólicos para as duas matrizes vegetais. O extrato etanólico obtido após a extração supercrítica (SCE) e o extrato etanólico em leito fixo (ELF) foram os mais concentrados em fenóis, para *E. uniflora* e a *L. sidoides*, respectivamente.

Quando se leva em consideração os respectivos rendimentos globais de extração, a extração sequencial (SC+SCE+SCA) apresentou os maiores rendimentos de fenóis totais para as duas plantas. Os melhores resultados em etapa única foram na extração aquosa a alta pressão (ALF) para *E. uniflora* e na extração etanólica em leito fixo (ELF) para a *L. sidoides*.

No caso da extração de flavonoides, as maiores concentrações para *E. uniflora* foram obtidas no extrato supercrítico (SC) e para *L. sidoides* nos extrato etanólico a alta pressão (ELF).

Considerando a tendência em relação ao rendimento global, é mais adequado o uso da extração etanólica em leito fixo (ELF), se o objetivo for obter extratos de *L. sidoides* com alta concentração e rendimento de flavonoides. No caso da *E. uniflora*, o método mais eficaz na obtenção destes compostos foi a extração sequencial (SC+SCE+SCA).

Em geral, os resultados apontam a presença de flavonoides nos extratos de *L. sidoides* e em menor concentração nos extratos de *E. uniflora*.

Dependendo do objetivo do processo no caso da *L. sidoides*, pode-se empregar a extração etanólica em leito fixo (ELF) para obter-se extratos concentrados em fenóis e flavonoides totais ou o melhor rendimento de flavonoides, ou então, a extração em três etapas (SC+SCE+SCA) para obter-se o máximo rendimento de fenóis.

No caso da *E. uniflora* é mais adequado o uso do da extração supercrítica (SC) quando se deseja obter extratos mais concentrados em flavonoides ou a extração etanólica pós supercrítica (SCE) para se obter extratos mais ricos em polifenóis. Quando o alvo do processo for o rendimento desses compostos, o melhor método é a extração sequencial (SC+SCE+SCA).

No geral, a extração sequencial em três etapas nas condições estudadas de temperatura e pressão mostrou ser eficiente na extração dos componentes de interesse deste trabalho.

## 7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography – mass spectrometry**. Allured Publishing Corporation, 469 pp, 1995.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography – mass spectrometry**, Allured Publishing Corporation, 804 pp. 2007.
- ALMEIDA, M. C. S. de; ALVES, L. A.; SOUZA, L. G. da S.; MACHADO, L. L.; MATOS, M. C. de; OLIVEIRA, M. C. F. de; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1877-1881, 2010.
- AMAT, A. G.; DE BATTISTA, G. A.; ULIANA, R. F. Diuretic activity of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) aqueous extract. In: MARTINO, V.;CAFFINI, N., et al (Ed.). **Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare Wocmap-2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicines, Toxicology**, p.155-158. (Acta Horticulturae). 1999.
- AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, vol. 16, no. 10, pp. 923–928, 2009.
- ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Consulta Pública nº 98, de 26 de dezembro de 2005. D.O.U. de 27/12/2005.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**, 16th ed., Washington, DC: Association Of Official Analytical Chemists, 1997.
- AOCS. American Oil Chemist’s Society. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist’s Society**, 6<sup>th</sup> ed., v.1, p.1 (Ca 23-55). AOCS Press, champaign, 1998.
- APPEL, H. M.; GOVENOR, H. L.; D’ASCENZO, M.; SISKI, E.; SCHULTZ, J. C. **Journal of Chemical Ecolog.** vol. 27 issue 4 April 2001.
- ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n.1-3, p.307-314, 1999.

A.S.A.E. **Standards, Method of determining and expressing fineness of feed materials by sieving**, ASAE S319.3, 547. 1997.

AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.1, p. 55 - 61, 2003.

BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. de O.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss and *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 405-412, 2007.

BATISTELA, C. B.; WOLF, M. M. R. Modeling, simulation and analysis of molecula distillators: centrifugal and falling film. **Computers and Chemical Engineering**, v.20, n.5, p.19-24, 1996.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. **Fenômenos de transporte**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2004.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BRUNNER, G. **Gas extraction : an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. Darmstadt; New York: Steinkopff; Springer, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21-33, 2005.

CARTEA, M. E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 251-280, Jan 2011.

CARVALHO JUNIOR, W. G. O.; MELO, M. T. P.; MARTINS, E. R. Fenologia do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em área de Cerrado, no norte de Minas Gerais, **Brasil. Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 13, n. 2, 2011.

CARVALHO, A. F.; MELO V. M.; CRAVEIRO A. A.; MACHADO M. I.; BANTIM M. B.; RABELO E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.

CARVALHO, R. R. da C. e; LARANJEIRA, D.; CARVALHO FILHO, J. L. S. de; SOUZA, P. E. de; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; JESUS, H. C. R. de; WARWICK, D. R. N. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, 2013.

CASSANO, A.; DONATO, L.; CONIDI, C.; DRIOLI, E. Recovery of bioactive compounds in kiwifruit juice by ultrafiltration. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 556-562, 2008.

CAVALCANTI, E. S.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. Larvicidal Activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products : detection, isolation, and structural determination**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacol**, Limeric. v. 81, p. 57-63, 2002.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 66-67, 2002.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural Products From Plants**. 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, USA, 2006.

DE MEDEIROS, MD.; DA SILVA A.C.; CITÓ, A.M.; BORGES, A.R.; DE LIMA, S.G.; LOPES J.A.; FIGUEIREDO, R.C. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v. 60, n. 3, p. 237-241, Sep 2011.

FAMUYIWA, F. G.; ADEBAJO, A. C.; ALADESANMI, J. A. Larvicidal activity of *Eugenia uniflora* in *Aedes aegypti*. **Planta Medica**, v. 77, n. 12, p. 1445-1445, Aug 2011.

FARIAS-JUNIOR, P. A.; RIOS, M. C.; MOURA, T. A.; ALMEIDA, R. P.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; FERNANDES, R. P. M.; SCHER, R. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 399-402, 2012.

FIUZA, T. S.; SABÓIA MORAIS, S. M. T.; PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F.; CARMO FILHO, J. R.; PIMENTA, F. C. Antimicrobial Activity of the Crude Ethanol Extract and Fractions from *Eugenia uniflora* Leaves Against *Pseudomonas aeruginosa*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 892-898, Nov-Dec 2009. ISSN 0326-2383.

GALHIANE, M. S.; RISSATO, S. R.; CHIERICE, G. O.; ALMEIDA, M. V.; SILVA, L.C. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. **Talanta**, v. 70, p. 286–292, 2006.

GALVÃO, E.L. Extração do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* J. com CO<sub>2</sub> pressurizado. 2004. 99 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, Apr. 2007.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M.; SENRA, T. de O.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. da S.; DAEMON, E.; GOIS, R. W.; SANTIAGO, G. M.; DE CARVALHO, M. G. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2423-2430, Dec 2012.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928-2935, 2005.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of Some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-31, 2002.

IBIKUNLE, G. F.; ADEBAJO, A. C.; FAMUYIWA, F. G.; ALADESANMI, A. J.; ADEWUNMI, C. O. *In vitro* evaluation of anti-trichomonal activities of *Eugenia uniflora* leaf. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 2, p. 170-176, 2011.

IGNAT, I.; VOLFF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, Jun 15 2011.

ISENGARD, H. D. Water content, one of the most important properties of food. **Food Control**, v. 12, n.7, p.395-400, 2001.

KADE, I. J.; IBUKUN, E. O.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.60, n.4-5, p.365-371, 2008.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, Supplement 2, p. 71-88, 2002.

LACOSTE, E.; CHAUMONT, J. P.; MANDIN, D.; PLUMEL, M. M.; MATOS, F. J. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Annales pharmaceutiques françaises** 54:5 pg 228-30, 1996.

LEE, M. I.; NISHIMOTO, S.; YANG, L. L.; YEN, K.Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, Y. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v.44, p.1343-1349, 1997.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. das G.; MORAES, J. C.; CARVALHO, S. M.; RODRIGUES, V. G.; GUIMARÃES, L. G. L. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (coleoptera: tenebrionidae). **Ciencia E Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 664-671, Jul-Aug 2011.

LOPES, M. M. Composição química, atividade antibacteriana e alelopática dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L. e *Myrciaria glazioviana* (kiersk) G. M. Barrosos & Sobral (Myrtaceae). 2008. 60 p. **Dissertação** (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 2008.

MARTINEZ-CORREA, H. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998-1006, Jan 2011.

MARTINEZ-CORREIA, H. A. Compostos bioativos de extratos naturais: combinação de processos de extração com dióxido de carbono supercrítico, etanol e água. 2010. 254 p. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2010.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.79, p.84-7, 1998.

MCHUG, M.; KRUKONIS, V., Eds. **Supercritical fluid extraction: principles and practice**. Stonehan: Butterworth-Heinemann, p.512, 2 ed. 1994.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process design data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, p. 321-330, 2003.

MELO, R. M.; CORRÊA, V. F. S.; AMORIM, A. C.; MIRANDA, A. L.; REZENDE, C. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. **Journal of Brazilian Chemical Society**., v. 18, n. 1, p. 179-183, 2007.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. de; ARAÚJO, E. de L.; AMORIM, E. L. C. DE. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, Oct. 2005.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.109-122, 2006.

MORAIS, S. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W.; MATOS, J. A. Volatiles constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, p.449-451, 1996.

MUKHOPADHYAY, M., Ed. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. Boca Raton: CRC Press, Boca Ranton. 2000.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v.15, p.147–152, 2005.

OLIVEIRA, T. C. de. Caracterização e comportamento de acessos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) mantidos em banco ativo de germoplasma em São Cristóvão – SE. 2008. 94 p. **Dissertação** (Mestrado em Agrossistemas) – Universidade Federal do Sergipe. São Cristóvão, 2008.

OREOPOULOU, V. Extraction of natural antioxidants. In: TZIA, C e LIADAKIS, G. **Extraction optimization in Food Engineering**, cap. 10. Marcel Dekker, 2003.

- PEIXOTO, C. A. Extração supercrítica de folhas de *Eugenia Uniflora L.* 2008. 153p. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- PEIXOTO, C. A., OLIVEIRA, A. L., CABRAL, F. A. Composition of supercritical carbon dioxide extracts of pitanga (*Eugenia uniflora L.*) leaves. **Journal of Food Process Engineering**, 2010.
- PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.
- PIANTINO, C. R.; AQUINO, W. B.; FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; CABRAL, F. A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **Journal of supercritical Fluids**, v.47, p.209–214, 2008.
- RAHMAN, M. S.; PERERA, C. O.; DONG CHEN, X.; DRISCOLL, R. H.; LAL POTLURI, P. Density, shrinkage and porosity of calamari mantle meat during air drying in a cabinet dryer as a function of water content. **Journal of Food Engineering**, v.30, n.1-2, p.135-145, 1996.
- RATTMANN, Y. D.; DE SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G.L.; GORIN P. A.; IACOMINI, M. Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against Murine Sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2012 9 pages, 2012.
- RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO<sub>2</sub> extraction in food processing industry: an overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 5, p. 269-284, 2002.
- RODRIGUES, K. A. da F.; AMORIM, L. V.; OLIVEIRA, J. M. G. de; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; ANDRADE, E. H. de; MAIA, J. G. S.; CERNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. de A. *Eugenia uniflora L.* essential oil as a potential anti-Leishmania agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- SARTOR, B. R. Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor. 2009. 75 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
- SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L.; ALICE C. B.; HENRIQUES A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora L.* **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, pp.137–142, 1994.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from calycorectes, campomanesia, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v.16, p.373-374, 1995.

SHI, J.; KASSAMA L. S.; KAKUDA, Y. In: **Functional Food Ingredients and Nutraceuticals Processing Technologies**. Ed. Shi, J. Taylor And Francis, CRC Press, Boca Raton, Fl, p. 371, 2007.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA A. dos S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010a.

SILVA, V.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, M.S.V.; SIQUEIRA JÚNIOR, JP.; PEREIRA, AV.; HIGINO, JS. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. extract on biological isolates of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010b.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SOUSA, E. M. B. D.; CHIAVONE-FILHO, O.; MORENO, M.T.; SILVA, D.N.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. using pressurized carbon dioxide. **Brazilian Journal of chemical engineering**, v. 19, n. 2, p. 229-241, 2002.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> - I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.

UQUICHE, E.; DEL VALLE, J. M.; ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) oleoresin, **Journal of Food Engineering**, v.65, n.1, p.55-66, 2004.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible Mechanism of Action. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 179-185, Feb 2013.

VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; COLARES, A. V.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. M. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 508-512, Apr 2012.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; DA SILVA, W. P.; DA MOTTA ADE, S.; NASCENTE, P. da S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L. Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, Aug 2012.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**, v. 17, 2003.

VIZZOTTO, M. Pitanga: uma fruta especial. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2008. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/pitanga-uma-fruta-especial-2>>, Acesso em: 07/06/2012.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, n.4, p.555-559, 1999.



## **8 APÊNDICE**

- APÊNDICE A:** Especificações de equipamentos, materiais e reagentes.
- APÊNDICE B:** Análise granulométrica diferencial das matrizes vegetais.
- APÊNDICE C:** Dados experimentais obtidos das extrações.
- APÊNDICE D:** Curva padrão para determinação de fenóis totais e flavonoides totais.
- APÊNDICE E:** Dados experimentais obtidos das análises dos extratos.
- APÊNDICE F:** Cromatogramas da fração volátil s extratos de *Eugenia uniflora* L. e *Lippia sidoides* Cham.



## **APÊNDICE A**

### **ESPECIFICAÇÕES DE EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES**

**Tabela A.1** - Especificações dos equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Nome/Descrição	Modelo	Marca	Cidade/UF	País	Obs.
<b>1. Caracterização da matéria-prima</b>					
ESTUFA A VÁCUO	MA-030/12	MARCONI	PIRACICABA/SP	BRASIL	CONECTADA A BOMBA DE VÁCUO (MA-057-13)
MOINHO DE FACAS	MA-340	MARCONI	PIRACICABA/SP	BRASIL	COM PENIERA MESH 20
PENEIRAS	NE*	BERTEL	CAIEIRAS/SP	BRASIL	24 A 270 MESH
AGITADOR ELETROMAGNÉTICO DE PENEIRAS	NE*	BERTEL	CAIEIRAS/SP	BRASIL	-
BALANÇA ANALÍTICA	U210A	BEL	PIRACICABA/SP	BRASIL	REPRODUTIBILIDADE (DESVIO PADRÃO): 0,1mg LINEARIDADE $\pm 0,3$ mg
FREEZER (220)	BVR28GBANA	BRSTEMP	SÃO PAULO/SP	BRASIL	TEMPERATURA: -26 °C
KARL-FISCHER	701 KF TITRINO	METROHM	SÃO PAULO/SP	BRASIL	DETERMINAÇÃO VOLUMÉTRICA DE ÁGUA
FORNO THERMOPREP	832 KF	METROHM	SÃO PAULO/SP	BRASIL	UTILIZADO EM AMOSTRAS COM POUCA UMIDADE CONECTADO AO KARL FISHER
PICNÔMETRO AUTOMÁTICO	ULTRAPYC 1200e	QUANTACHROME	FLORIDA	EUA	PRECISÃO $\pm 0,02$ a $\pm 3,0\%$ (Instituto de Química)
BOMBA DE VÁCUO	MA-057-13	MARCONI	PIRACICABA/SP	BRASIL	CONECTADA A ESTUFA A VÁCUO (MA-030/12)
<b>2. Procedimentos de extração</b>					
BANHO DE REFRIGERAÇÃO	12101-31	COLE PARMER	VERNON HILLS/ILLINOIS	EUA	-
BOMBA DE ALTA PRESSÃO	PN: 1018AA-100-5	ELDEX LABORATORIES INC.	NAPA/CA	EUA	-
BOMBA (ETANOL/ÁGUA)	A-30-5	ELDEX LABORATORIES INC.	NAPA/CA	EUA	-
BOMBA PERISTÁLTICA	MESTERFLEX L/S 77200-62	COLE PARMER	VERNON HILLS/ILLINOIS	EUA	-

\*NE: informação não encontrada.

**Tabela A.2** - Especificações dos equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho (*continuação*).

Nome/Descrição	Modelo	Marca	Cidade	País	Obs.
<b>2. Procedimentos de extração (<i>continuação</i>)</b>					
MEDIDOR DE VAZÃO	32908-69	COLE-PARMES	NAPA/CA	EUA	-
TOTALIZADOR DE VOLUME	G1	LAO	OSASCO/SP	BRASIL	-
MANÔMETRO	MT 160 AL	ABSI	SÃO PAULO	BRASIL	-
MANÔMETROS TIPO BOURDON	NE*	RECORD	SÃO PAULO/SP	BRASIL	-
BANHO TERMOSTATIZADO	NE*	SULAB		BRASIL	-
EXTRATOR	ASI 316	SUPRILAB		BRASIL	AÇO INOX COM CAPACIDADE DE 50 mL
TANQUE PULMÃO	AISI 316	SUPRILAB		BRASIL	AÇO INOX COM CAPACIDADE DE 500 mL
AGITADOR MAGNÉTICO	752	FISATOM	SÃO PAULO/SP	BRASIL	-
BANHO (QUENTE)	P12C	LAUDA	NE	NE	-
BANHO (FRIO)	VISCOTHERM VT2	PAAR PHYSICA	NE	NE	-
BOMBA DE VÁCUO	C	FANEM	SÃO PAULO/SP	BRASIL	-
ESTUFA A VÁCUO (idem item 1)	MA-030-12	MARCONI	PIRACICABA/SP	BRASIL	CONECTADA A BOMBA DE VÁCUO (MA-057-13)
BOMBA DE VÁCUO (idem item 1)	MA-057-13	MARCONI	PIRACICABA/SP	BRASIL	-
LIOFILIZADOR	L101	LIOBRAS	SÃO CARLOS/SP	BRASIL	-
EVAPORADOR ROTATIVO	MA-120	MARCONI	PIRACICABA/SP	BRASIL	CONECTADO A BOMBA DE VÁCUO (MA-058/ MARCONI)
BOMBA DE VÁCUO	MA-058	MARCONI	PIRACICABA/SP	BRASIL	CONECTADA AO EVAPORADOR ROTATIVO
BALANÇA ANALÍTICA (idem item 01)	U210A	BEL	PIRACICABA/SP	BRASIL	REPRODUTIBILIDADE (DESVIO PADRÃO): 0,1mg LINEARIDADE $\pm$ 0,3 mg
ESPECTROFOTÔMETRO	UV-VIS LAMBDA 40	PERKIN ELMER	WALTHAM / MASSACHUSETTS	EUA	-
CROMATÓGRAFO GASOSO ACOPLADO A ESPECTROMETRIA					ANÁLISE FEITA NO CPQBA/UNICAMP

\*NE: informação não encontrada.

**Tabela A.3** - Especificações de materiais e reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Nome/Descrição	Lote	Marca	Cidade	País	Obs.
<b>1. Descrição da matéria-prima</b>					
NITROGÊNIO	11280/11	WHITE MARTINS GASES INDUSTRIAIS	OSASCO/SP	BRASIL	UTILIZADO NO FORNO THERMOPREP
<b>2. Procedimentos de extração</b>					
DIÓXIDO DE CARBONO (CO <sub>2</sub> )	113C/12	WHITE MARTINS GASES INDUSTRIAIS	OSASCO/SP	BRASIL	-
ETANOL (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	AE8828RA	ÊXODO	HORTOLÂNDI A/SP	BRASIL	99,8% v/v PM: 46,07
ÁGUA ULTRA PURA MILI-Q	NE	MILLI-Q	BILLERICA, MA	EUA	-
PORAPAK-Q	160 (20331)	SUPELCO	BELLEPHONE/P A	EUA	80/100 MESH
PAPEL FILTRO	NE	QUALY	SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/SP	BRASIL	GRAMATURA: 80g/m <sup>2</sup> ; CINZA: 0,5%; MIORIA DOS POROS 14 microm; ESPESSURA: 205 micrometro
LÃ DE VIDRO	040208	ISOFAR	DUQUE DE CAXIAS/SP	BRASIL	-
ACETATO DE ETILA (CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> H <sub>3</sub> )	AE2089RA	ÊXODO	HORTOLÂNDI A/SP	BRASIL	99,5 % v/v PM: 88,1
DICLOROMETANO	K43243344216	MERK	NE*	ALEMANHA	99,0 % PM: 84,93
HEXANO C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	135524	SYNTH	DIADEMA/SP	BRASIL	98,5 % v/v

\*NE: informação não encontrada.

**Tabela A.4** - Especificações de materiais e reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho. (*continuação*).

Nome/Descrição	Lote	Marca	Cidade	País	Obs.
<b>3. Análise química dos extratos</b>					
ÁCIDO GÁLICO (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> . H <sub>2</sub> O)	0806387	VETEC	RIO DE JANEIRO/RJ	BRASIL	99,0 % m/m PM: 188,14
REAGENTE FOLIN-CIOCALTEU	35193	DINÂMICA	DIADEMAS/SP	BRASIL	
CARBONATO DE SÓDIO (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	CS5179RA	ÊXODO	HORTOLÂNDI A/SP	BRASIL	99,5 % m/m PM: 105,99
ÁGUA ULTRA PURA	*NE	Millipore direct-Q3 UV	BILLERICA, MA	EUA	-
ETANOL (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	AE8828RA	ÊXODO	HORTOLÂNDI A/SP	BRASIL	99,8 % v/v
CATEQUINA <b>HIDRATADA</b>	356B270	SIGMA ALDRICH INC.	ST. LOUIS/MO	USA	98,0 % m/m
NITRITO DE SÓDIO (NaNO <sub>2</sub> )	17746	ECIBRA	SANTO AMARO/SP	BRASIL	97,0 % m/m PM: 69
HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NaOH)	HS6012RA	ÊXODO	HORTOLÂNDI A/SP	BRASIL	95,0 % m/m PM: 40
CLORETO DE ALUMÍNIO (AlCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O)	17375	ECIBRA	SANTO AMARO/SP	BRASIL	99,0 % m/m PM: 241,44
ACETATO DE ETILA (CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> H <sub>3</sub> )	AE2089RA	ÊXODO	HORTOLÂNDI A/SP	BRASIL	99,5 % v/v PM: 88,1
HÉLIO (gás de arraste)					ANÁLISE FEITA NO CPQBA/UNICAMP

\*NE: informação não encontrada.



## **APÊNDICE B**

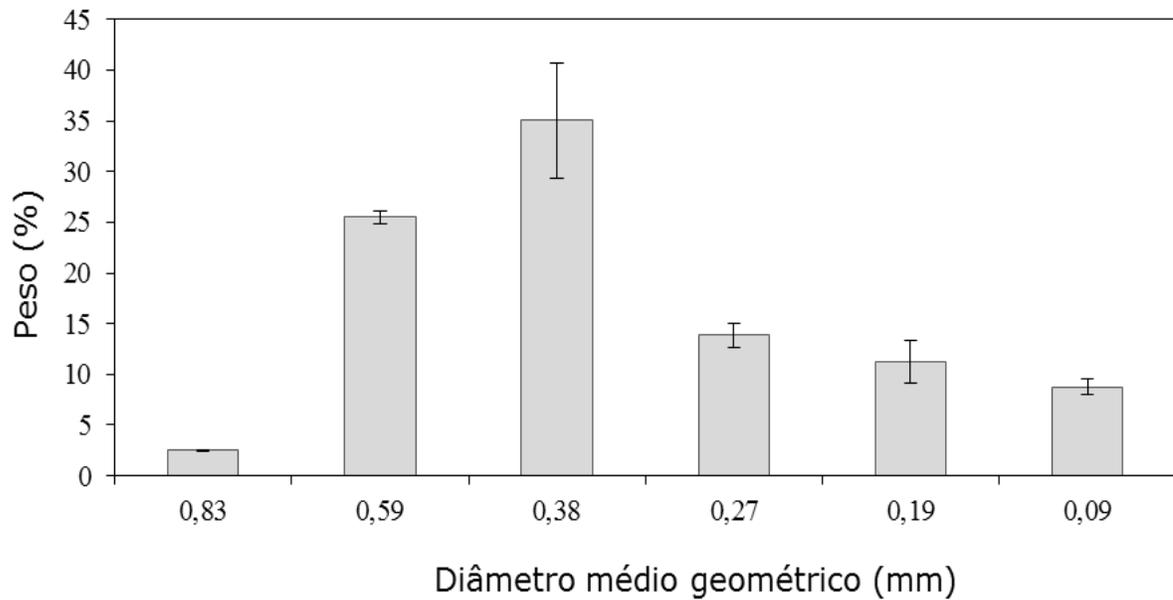
### **ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DIFERENCIAL DAS MATRIZES VEGETAIS**

**Tabela B.1** - Análise granulométrica da *Eugenia uniflora* L.

Mesh	Diâmetro médio (mm)*	(% ) Retida			Média	Desvio Padrão
		CORRIDA 01 (100,01 g)	CORRIDA 02 (100,07 g)	CORRIDA 03 (100,07 g)		
24	0,83	2,55	2,55	2,44	2,51	0,06
32	0,59	26,19	24,93	25,41	25,51	0,64
48	0,38	28,53	38,63	38,07	35,08	5,68
60	0,27	14,26	14,81	12,49	13,85	1,21
100	0,19	9,16	11,27	13,32	11,25	2,08
270	0,09	9,63	8,10	8,53	8,75	0,79

\* Diâmetro médio ( $d_m$ ) =  $(d_i \cdot d_{i+1})^{1/2}$

Diâmetro médio das partículas:  $0,336 \pm 0,0025$  mm



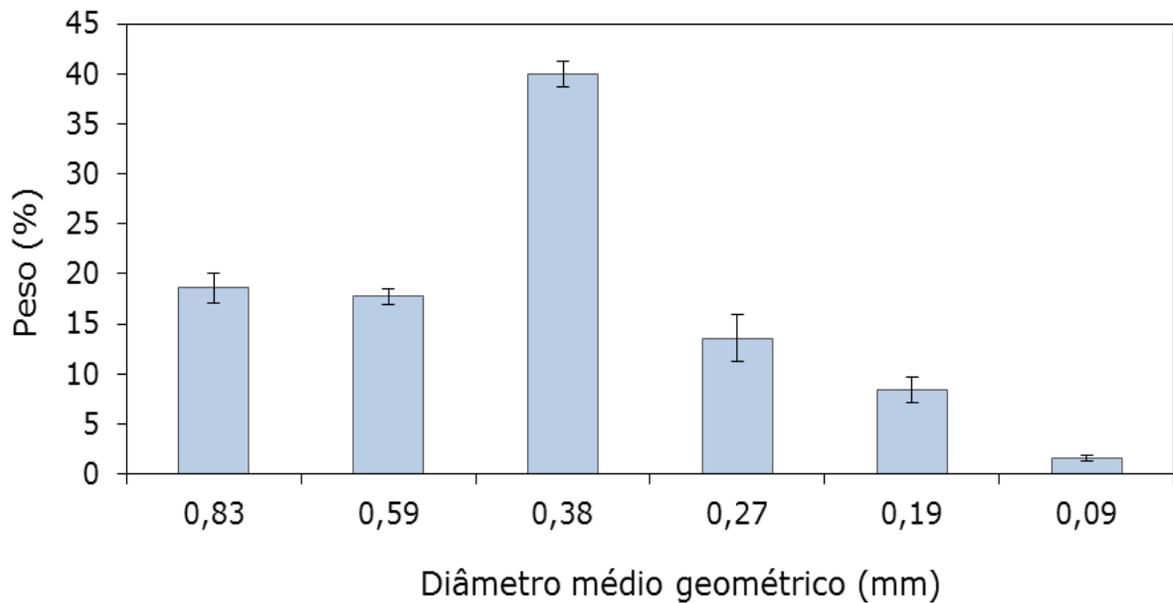
**Figura B.1** - Análise granulométrica da *Eugenia uniflora* L.

**Tabela B.2** - Análise granulométrica da *Lippia sidoides* Cham.

Mesh	Diâmetro médio (mm)*	(% ) Retida			Média	Desvio Padrão
		CORRIDA 01 (50,05 g)	CORRIDA 02 (50,06 g)	CORRIDA 03 (50,05 g)		
24	0,83	19,86	18,96	16,92	18,58	1,50
32	0,59	18,56	17,32	17,30	17,73	0,72
48	0,38	38,94	41,39	39,52	39,95	1,28
60	0,27	11,35	13,32	16,06	13,58	2,37
100	0,19	9,59	7,05	8,61	8,42	1,28
270	0,09	1,26	1,80	1,64	1,56	0,28

\* Diâmetro médio ( $d_m$ ) =  $(d_i \cdot d_{i+1})^{1/2}$

Diâmetro médio das partículas:  $0,420 \pm 0,0097$  mm



**Figura B.2** - Análise granulométrica da *Lippia sidoides* Cham.



## **APÊNDICE C**

### **DADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS DAS EXTRAÇÕES**

**Tabela C.1** - Dados da extração sequencial em leito fixo da *Eugenia uniflora* L. a 400 bar e 60 °C. Corrida 01 (massa amostra: 7,0340g).

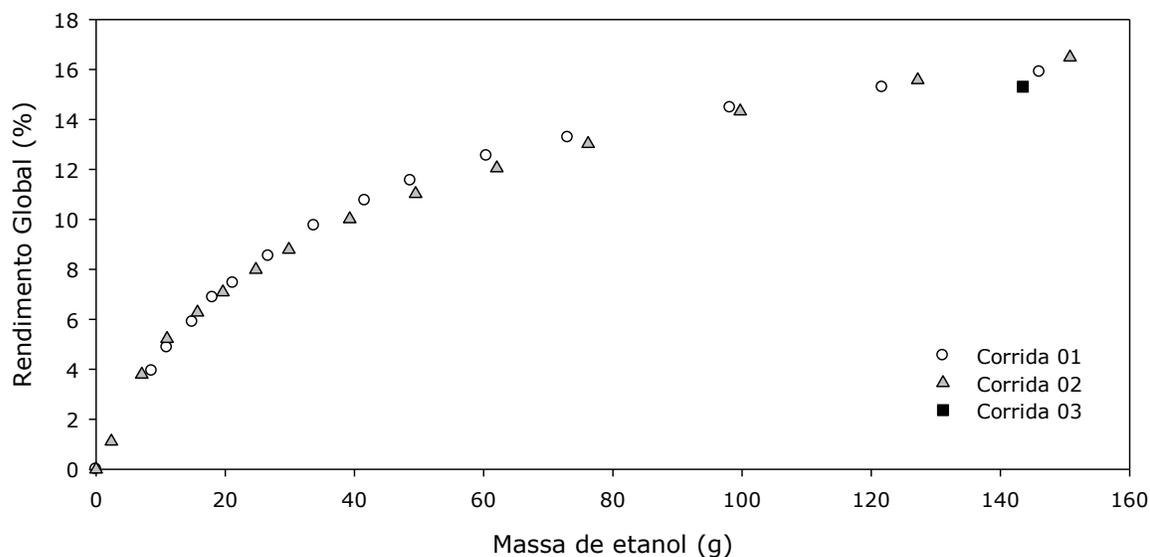
Solvente	Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Rendimento (%)	Massa de solvente acumulada (g)	Massa de solvente/ massa de amostra (g)
CO <sub>2</sub>	0	0	0	0,00	0	0,00
	15	0,1965	0,1965	2,79	37,13	5,28
	15	0,0400	0,2365	3,36	74,25	10,56
	15	0,0346	0,2711	3,85	111,38	15,83
	15	0,0260	0,2971	4,22	148,50	21,11
	15	0,0298	0,3269	4,65	185,63	26,39
	20	0,0210	0,3479	4,95	235,13	33,43
	20	0,0207	0,3686	5,24	284,63	40,46
	30	0,0168	0,3854	5,48	358,88	51,02
	30	0,0319	0,4173	5,93	433,13	61,58
	60	0,0057	0,4230	6,01	581,63	82,69
	60	0,0080	0,4310	6,13	730,13	103,80
	60	0,0288	0,4598	6,54	878,63	124,91
	ETANOL	10	0,2766	0,7364	10,47	887,26
10		0,0659	0,8023	11,41	889,62	126,47
10		0,0717	0,8740	12,43	893,54	127,03
10		0,0692	0,9432	13,41	896,69	127,48
10		0,0406	0,9838	13,99	899,83	127,93
15		0,0758	1,0596	15,06	905,32	128,71
15		0,0858	1,1454	16,28	912,39	129,71
20		0,0707	1,2161	17,29	920,24	130,83
20		0,0558	1,2719	18,08	927,31	131,83
30		0,0698	1,3417	19,07	939,09	133,51
30		0,0517	1,3934	19,81	951,65	135,29
61		0,0842	1,4776	21,01	976,78	138,87
60		0,0572	1,5348	21,82	1000,33	142,21
60		0,0433	1,5781	22,44	1024,68	145,67
ÁGUA	10	0,0209	1,5990	22,73	1029,68	146,39
	10	0,1696	1,7686	25,14	1033,68	146,95
	10	0,0843	1,8529	26,34	1038,68	147,67
	10	0,1420	1,9949	28,36	1043,68	148,38
	10	0,1149	2,1098	29,99	1048,68	149,09
	15	0,1434	2,2532	32,03	1056,48	150,20
	15	0,1093	2,3625	33,59	1063,98	151,26
	20	0,1229	2,4854	35,33	1073,98	152,68
	20	0,1019	2,5873	36,78	1083,98	154,11
	30	0,1379	2,7252	38,74	1098,98	156,24
	30	0,1144	2,8396	40,37	1113,98	158,37
	60	0,1653	3,0049	42,72	1143,98	162,64
	60	0,0697	3,0746	43,71	1173,98	166,90
	30	0,0258	3,1004	44,08	1188,98	169,03

**Tabela C.2** - Dados da extração sequencial em leito fixo da *Eugenia uniflora* L. a 400 bar e 60 °C. Corrida 02 (massa amostra: 6,9988g).

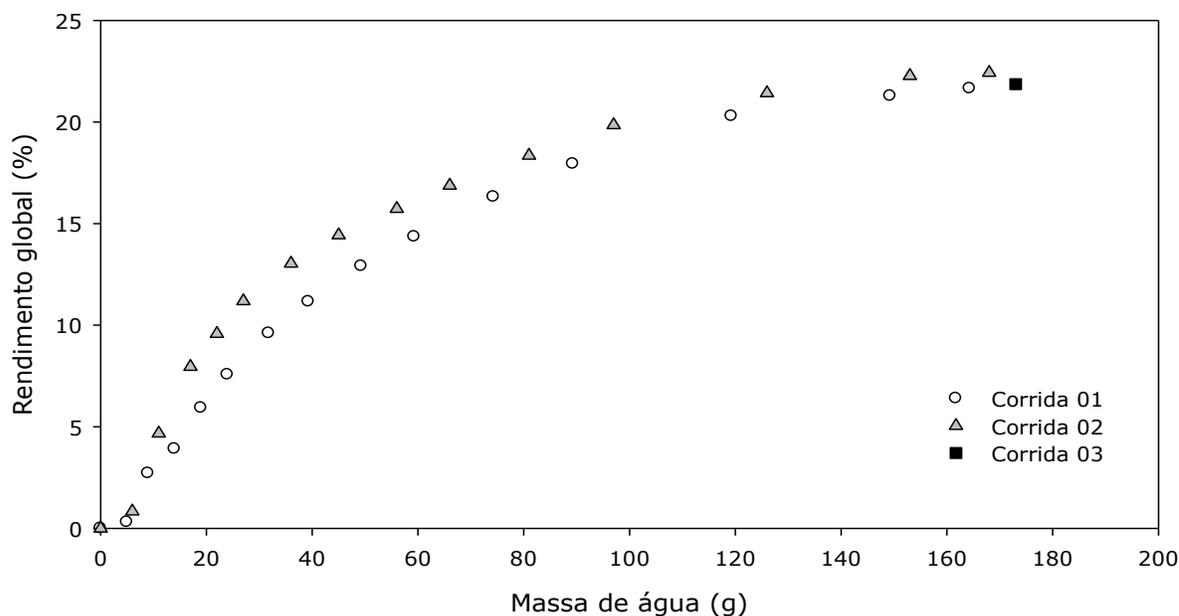
Solvente	Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Rendimento (%)	Massa de solvente acumulada (g)	Massa de solvente/ massa de amostra (g)
CO <sub>2</sub>	0	0	0	0,00	0	0,00
	15	0,1556	0,1556	2,20	37,13	5,26
	15	0,0540	0,2096	2,97	74,25	10,52
	15	0,0288	0,2384	3,38	111,38	15,78
	15	0,0230	0,2614	3,70	148,50	21,04
	15	0,0152	0,2766	3,92	185,63	26,30
	20	0,0157	0,2923	4,14	235,13	33,31
	20	0,0126	0,3049	4,32	284,63	40,33
	30	0,0116	0,3165	4,48	358,88	50,85
	30	0,0197	0,3362	4,76	433,13	61,37
	60	0,0155	0,3517	4,98	581,63	82,41
	60	0,0096	0,3613	5,12	730,13	103,44
	60	0,0087	0,3700	5,24	878,63	124,48
	ETANOL	10	0,0780	0,4480	6,40	880,98
10		0,1875	0,6355	9,08	885,69	126,55
10		0,1002	0,7357	10,51	889,62	127,11
10		0,0738	0,8095	11,57	894,33	127,78
10		0,0566	0,8661	12,37	898,26	128,34
15		0,0631	0,9292	13,28	903,36	129,07
15		0,0561	0,9853	14,08	908,46	129,80
20		0,0857	1,0710	15,30	917,89	131,15
20		0,0708	1,1418	16,31	928,09	132,61
30		0,0716	1,2134	17,34	940,66	134,40
30		0,0686	1,2820	18,32	954,79	136,42
60		0,0908	1,3728	19,61	978,35	139,79
60		0,0877	1,4605	20,87	1005,83	143,71
60		0,0635	1,5240	21,78	1029,39	147,08
ÁGUA	10	0,0584	1,5824	22,61	1035,39	147,94
	10	0,2686	1,8510	26,45	1040,39	148,65
	10	0,2299	2,0809	29,73	1046,39	149,51
	10	0,1135	2,1944	31,35	1051,39	150,22
	10	0,1126	2,3070	32,96	1056,39	150,94
	15	0,1296	2,4366	34,81	1065,39	152,22
	15	0,0978	2,5344	36,21	1074,39	153,51
	20	0,0904	2,6248	37,50	1085,39	155,08
	20	0,0801	2,7049	38,65	1095,39	156,51
	30	0,1035	2,8084	40,13	1110,39	158,65
	30	0,1049	2,9133	41,63	1126,39	160,94
	60	0,1103	3,0236	43,20	1155,39	165,08
	60	0,0593	3,0829	44,05	1182,39	168,94
	30	0,0110	3,0939	44,21	1197,39	171,08

**Tabela C.3** - Dados da extração sequencial em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 03 (massa amostra: 6,9836 g).

Solvente	Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Rendimento (%)	Massa de solvente acumulada (g)	Massa de solvente/massa de amostra (g)
CO <sub>2</sub>	6h00	0,3019	0,3019	4,32	885,23	126,76
ETANOL	6h00	1,0692	1,3711	19,63	1028,69	147,30
ÁGUA	5h30	1,527	2,8981	41,50	1201,69	172,07



**Figura C.1** – Cinética e rendimentos de extração etanólica sequencial (2ª etapa) a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) utilizando etanol (0,5 mL/min\*) como solvente. \*Vazão medida a 0,93 bar e 25 °C.



**Figura C.2** – Cinética e rendimentos de extração aquosa sequencial (3ª etapa) a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) utilizando água (0,5 mL/min\*) como solvente. \*Vazão medida a 0,93 bar e 25 °C.

**Tabela C.4** - Dados da extração sequencial em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 01 (massa amostra: 7,0475g).

Solvente	Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Rendimento (%)	Massa de solvente acumulada (g)	Massa de solvente/ massa de amostra (g)
CO <sub>2</sub>	0	0	0	0,00	0	0,00
	15	0,2097	0,2097	2,98	37,13	5,27
	15	0,0256	0,2353	3,34	74,25	10,54
	15	0,0187	0,2540	3,60	111,38	15,80
	15	0,0243	0,2783	3,95	148,50	21,07
	15	0,0197	0,2980	4,23	185,63	26,34
	20	0,0192	0,3172	4,50	235,13	33,36
	20	0,0195	0,3367	4,78	284,63	40,39
	30	0,0162	0,3529	5,01	358,88	50,92
	30	0,0228	0,3757	5,33	433,13	61,46
	60	0,0224	0,3981	5,65	581,63	82,53
	60	0,0114	0,4095	5,81	730,13	103,60
	60	0,0126	0,4221	5,99	878,63	124,67
	ETANOL	10	0,3052	0,7273	10,32	881,77
10		0,2826	1,0099	14,33	885,69	125,67
10		0,1790	1,1889	16,87	889,62	126,23
10		0,1082	1,2971	18,41	892,76	126,68
10		0,0789	1,3760	19,52	896,69	127,23
15		0,0845	1,4605	20,72	902,57	128,07
15		0,0671	1,5276	21,68	908,46	128,91
20		0,0700	1,5976	22,67	916,32	130,02
20		0,0590	1,6566	23,51	924,17	131,13
30		0,0723	1,7289	24,53	935,95	132,81
30		0,0599	1,7888	25,38	947,72	134,48
61		0,0876	1,8764	26,63	971,28	137,82
60		0,0628	1,9392	27,52	994,05	141,05
60		0,0454	1,9846	28,16	1017,61	144,39
ÁGUA	10	0,0035	1,9881	28,21	1022,61	145,10
	10	0,0073	1,9954	28,31	1027,61	145,81
	10	0,0220	2,0174	28,63	1032,61	146,52
	10	0,2438	2,2612	32,09	1037,61	147,23
	10	0,1729	2,4341	34,54	1042,61	147,94
	15	0,1881	2,6222	37,21	1050,61	149,08
	15	0,1485	2,7707	39,31	1058,61	150,21
	20	0,0854	2,8561	40,53	1068,61	151,63
	20	0,0330	2,8891	40,99	1078,61	153,05
	30	0,0348	2,9239	41,49	1093,61	155,18
	30	0,0265	2,9504	41,86	1108,61	157,31
	60	0,0347	2,9851	42,36	1138,61	161,56
	60	0,0247	3,0098	42,71	1168,61	165,82
	60	0,0179	3,0277	42,96	1198,61	170,08

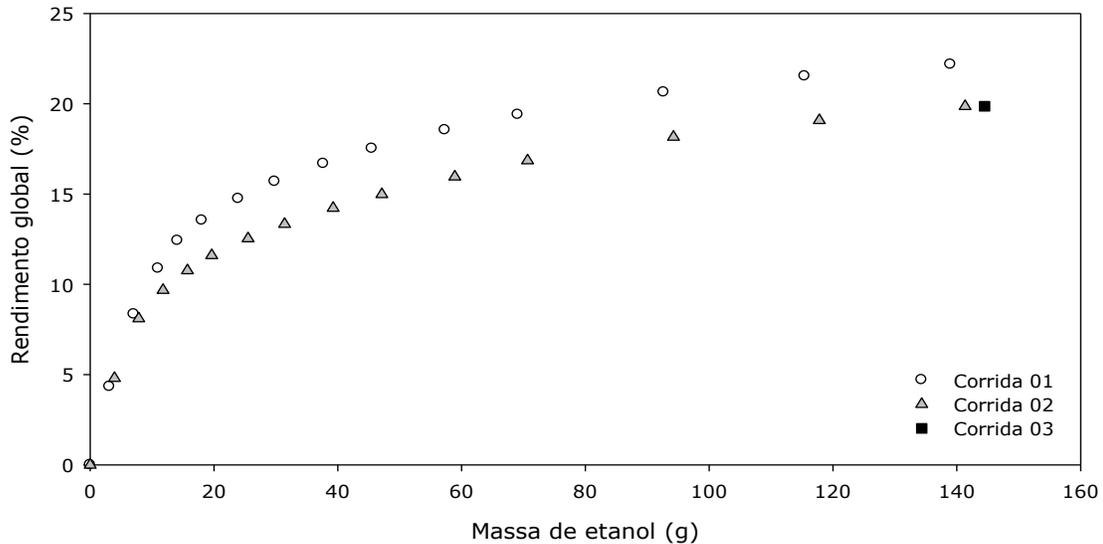
**Tabela C.5** - Dados da extração sequencial em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 02 (massa amostra: 7,0498g).

Solvente	Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Rendimento (%)	Massa de solvente acumulada (g)	Massa de solvente/ massa de amostra (g)
CO <sub>2</sub>	0	0	0	0,00	0	0,00
	15	0,2974	0,2974	4,22	37,13	5,27
	15	0,0269	0,3243	4,60	74,25	10,54
	15	0,0151	0,3394	4,81	111,38	15,80
	15	0,0121	0,3515	4,99	148,50	21,07
	15	0,0090	0,3605	5,11	185,63	26,34
	20	0,0095	0,3700	5,25	235,13	33,36
	20	0,0064	0,3764	5,34	284,63	40,39
	30	0,0114	0,3878	5,50	358,88	50,92
	30	0,0116	0,3994	5,67	433,13	61,46
	60	0,0184	0,4178	5,93	581,63	82,53
	60	0,0127	0,4305	6,11	730,13	103,60
	60	0,0144	0,4449	6,31	878,63	124,67
	ETANOL	10	0,3387	0,7836	11,11	882,55
10		0,2325	1,0161	14,41	886,48	125,79
10		0,1110	1,1271	15,99	890,40	126,34
10		0,0768	1,2039	17,08	894,33	126,90
10		0,0592	1,2631	17,92	898,26	127,46
15		0,0653	1,3284	18,84	904,14	128,29
15		0,0564	1,3848	19,64	910,03	129,13
20		0,0628	1,4476	20,53	917,89	130,24
20		0,0535	1,5011	21,29	925,74	131,36
30		0,0686	1,5697	22,27	937,52	133,03
30		0,0635	1,6332	23,17	949,29	134,70
60		0,0920	1,7252	24,47	972,85	138,04
60		0,0651	1,7903	25,39	996,41	141,38
60		0,0545	1,8448	26,17	1019,96	144,73
ÁGUA	10	0,0328	1,8776	26,63	1025,96	145,58
	12	0,0640	1,9416	27,54	1031,96	146,43
	10	0,3054	2,2470	31,87	1036,96	147,14
	10	0,2287	2,4757	35,12	1041,96	147,85
	10	0,1648	2,6405	37,45	1046,96	148,56
	16:40	0,1049	2,7454	38,94	1055,29	149,74
	15	0,0452	2,7906	39,58	1062,79	150,80
	20	0,0346	2,8252	40,07	1072,79	152,22
	20	0,0278	2,8530	40,47	1082,79	153,64
	30	0,0329	2,8859	40,94	1097,79	155,77
	30	0,0256	2,9115	41,30	1112,79	157,90
	60	0,0381	2,9496	41,84	1142,79	162,16
	60	0,0274	2,9770	42,23	1172,79	166,41
	60	0,0214	2,9984	42,53	1202,79	170,67

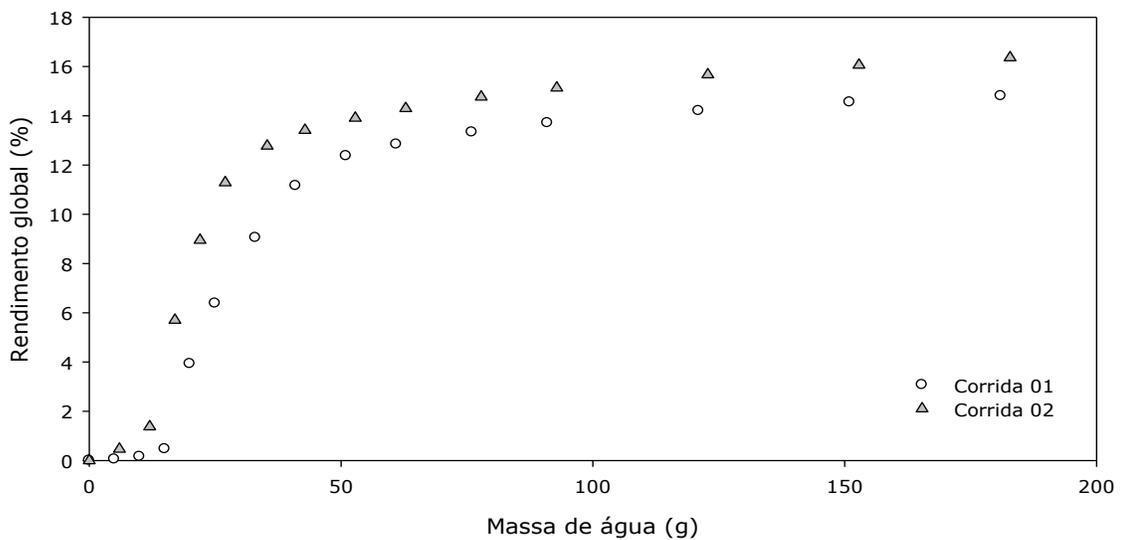
**Tabela C.6** - Dados da extração sequencial em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 03 (massa amostra: 7,0073g).

Solvente	Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Rendimento (%)	Massa de solvente acumulada (g)	Massa de solvente/massa de amostra (g)
CO <sub>2</sub>	6h00	0,3535	0,3535	5,04	885,23	126,33
ETANOL	6h00	1,3915	1,745	24,90	1029,71	146,95
ÁGUA	6h00	2,1314	3,8764	*	*	176,06

\* Não foi possível calcular o rendimento global da 3ª etapa da extração sequencial (água) devido à perda de parte da amostra. O rendimento médio global foi calculado com base na média dos valores obtidos nas corridas 01 e 02 ± amplitude.



**Figura C.3** – Cinética e rendimentos de extração etanólica sequencial (2ª etapa) a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) utilizando etanol (0,5 mL/min\*) como solvente. \*Vazão medida a 0,93 bar e 25 °C.



**Figura C.4** – Cinética e rendimentos de extração aquosa sequencial (3ª etapa) a 400 bar e 60 °C (leito fixo) de extratos de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) utilizando água (0,5 mL/min\*) como solvente. \*Vazão medida a 0,93 bar e 25 °C.

**Tabela C.7** - Dados da extração etanólica em leito fixo da *Eugenia uniflora* L. a 400 bar e 60 °C. Corrida 01 (massa amostra: 6,9946g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Massa de Etanol (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0,0	0
10	0,1894	0,1894	4,3	2,71
10	0,1847	0,3741	8,2	5,35
10	0,1611	0,5352	12,6	7,65
10	0,1149	0,6501	16,9	9,29
10	0,0782	0,7283	20,8	10,41
15	0,0820	0,8103	27,9	11,58
15	0,0579	0,8682	33,0	12,41
20	0,0624	0,9306	40,8	13,30
20	0,0573	0,9879	48,7	14,12
30	0,0972	1,0851	60,5	15,51
30	0,0697	1,1548	72,2	16,51
60	0,1036	1,2584	95,8	17,99
60	0,0711	1,3295	120,1	19,01
60	0,0512	1,3807	143,7	19,74

**Tabela C.8** - Dados da extração etanólica em leito fixo da *Eugenia uniflora* L. a 400 bar e 60 °C. Corrida 02 (massa amostra: 7,0355 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Massa de Etanol (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0,0	0
10	0,1599	0,1599	3,9	2,27
10	0,1260	0,2859	7,9	4,06
10	0,0880	0,3739	11,8	5,31
10	0,0716	0,4455	15,7	6,33
10	0,0617	0,5072	19,6	7,21
15	0,0827	0,5899	25,5	8,38
15	0,0705	0,6604	31,4	9,39
20	0,0795	0,7399	39,3	10,52
20	0,0763	0,8162	47,1	11,60
30	0,0920	0,9082	58,9	12,91
30	0,0736	0,9818	70,7	13,95
60	0,1148	1,0966	94,2	15,59
60	0,0945	1,1911	118,6	16,93
60	0,0811	1,2722	142,1	18,08

**Tabela C.9** - Dados da extração etanólica em leito fixo da *Eugenia uniflora* L. a 400 bar e 60 °C. Corrida 03 (massa amostra: 7,0332 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa de Etanol (g)	Rendimento (%)	Média das 3 corridas (%)	Desvio P. (%)
6h00	1,4709	146,8	20,91	19,58	1,42

**Tabela C.10** - Dados da extração etanólica em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 01 (massa amostra: 7,0012g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Massa de Etanol (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0,0	0
10	0,1655	0,1655	3,5	2,36
10	0,2639	0,4294	7,1	6,13
10	0,2502	0,6796	11,0	9,71
10	0,2101	0,8897	14,9	12,71
10	0,1346	1,0243	18,8	14,63
15	0,1282	1,1525	24,3	16,46
15	0,0750	1,2275	29,8	17,53
20	0,0848	1,3123	37,7	18,74
20	0,0611	1,3734	45,5	19,62
30	0,0791	1,4525	57,3	20,75
30	0,0659	1,5184	69,1	21,69
60	0,1090	1,6274	92,7	23,24
60	0,0825	1,7099	116,2	24,42
60	0,0687	1,7786	139,8	25,40

**Tabela C.11** - Dados da extração etanólica em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 02 (massa amostra: 7,0136 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Massa de Etanol (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0,0	0
10	0,2500	0,2500	4,3	3,56
10	0,2281	0,4781	8,6	6,82
10	0,1839	0,6620	12,6	9,44
10	0,1290	0,7910	17,3	11,28
10	0,0849	0,8759	21,6	12,49
15	0,0811	0,9570	27,5	13,64
15	0,0578	1,0148	33,0	14,47
20	0,0743	1,0891	40,0	15,53
20	0,0715	1,1606	47,9	16,55
30	0,1049	1,2655	59,7	18,04
30	0,0772	1,3427	72,2	19,14
60	0,1110	1,4537	96,6	20,73
60	0,0863	1,5400	120,1	21,96
60	0,0721	1,6121	143,7	22,99

**Tabela C.12** - Dados da extração etanólica em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 03 (massa amostra: 7,0059 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa de Etanol (g)	Rendimento (%)	Média das 3 corridas (%)	Desvio P. (%)
6h00	1,8474	141,3	26,37	24,92	1,74

**Tabela C.12** - Dados da extração aquosa em leito fixo da *Eugenia uniflora* L. a 400 bar e 60 °C. Corrida 01 (massa amostra: 7,0184 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Massa de Água (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0,0	0
10	0,3413	0,3413	5,5	4,86
10	0,2785	0,6198	11,5	8,83
10	0,2150	0,8348	17,0	11,89
10	0,1925	1,0273	22,5	14,64
10	0,1434	1,1707	27,5	16,68
15	0,1744	1,3451	37,0	19,17
15	0,1586	1,5037	44,0	21,43
20	0,1822	1,6859	55,0	24,02
20	0,1372	1,8231	66,0	25,98
30	0,1596	1,9827	83,0	28,25
30	0,1047	2,0874	104,0	29,74
60	0,1223	2,2097	132,5	31,48
60	0,0726	2,2823	159,0	32,52
30	0,0283	2,3106	173,0	32,92

**Tabela C.13** - Dados da extração aquosa em leito fixo da *Eugenia uniflora* L. a 400 bar e 60 °C. Corrida 02 (massa amostra: 6,9986 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Massa de Água (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0,0	0
10	0,2815	0,2815	6,0	4,02
10	0,2623	0,5438	11,5	7,77
10	0,1749	0,7187	18,0	10,27
10	0,1469	0,8656	23,0	12,37
10	0,1275	0,9931	28,0	14,19
15	0,1671	1,1602	34,5	16,58
15	0,1451	1,3053	41,5	18,65
20	0,1702	1,4755	51,0	21,08
20	0,1408	1,6163	60,0	23,09
30	0,1828	1,7991	74,0	25,71
30	0,1613	1,9604	89,0	28,01
60	0,2424	2,2028	119,5	31,47
60	0,1206	2,3234	149,5	33,20
30	0,0299	2,3533	164,5	33,63

**Tabela C.14** - Dados da extração aquosa em leito fixo da *Eugenia uniflora* L. a 400 bar e 60 °C. Corrida 03 (massa amostra: 7,0448 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa de Água (g)	Rendimento (%)	Média das 3 corridas (%)	Desvio P. (%)
5h30	2,3164	165,0	33,88	33,48	0,50

**Tabela C.15** - Dados da extração aquosa em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 01 (massa amostra: 7,0072 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Massa de Água (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0,0	0
10	0,3156	0,3156	4,0	4,50
10	0,5898	0,9054	10,0	12,92
10	0,4500	1,3554	15,0	19,34
10	0,3086	1,6640	20,0	23,75
10	0,2013	1,8653	25,0	26,62
15	0,1534	2,0187	33,0	28,81
15	0,0991	2,1178	41,0	30,22
20	0,0961	2,2139	51,0	31,59
20	0,0795	2,2934	61,0	32,73
30	0,0952	2,3886	76,0	34,09
30	0,0675	2,4561	91,0	35,05
60	0,0780	2,5341	121,0	36,16
60	0,0401	2,5742	151,0	36,74
60	0,0247	2,5989	181,0	37,09

**Tabela C.16** - Dados da extração aquosa em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 02 (massa amostra: 7,0038 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa acumulada do extrato (g)	Massa de Água (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0,0	0
10	0,3492	0,3492	5,0	4,99
10	0,3463	0,6955	10,5	9,93
10	0,2734	0,9689	15,0	13,83
10	0,2582	1,2271	20,0	17,52
10	0,2063	1,4334	25,0	20,47
15	0,2320	1,6654	32,5	23,78
15	0,1903	1,8557	40,0	26,50
20	0,1555	2,0112	50,0	28,72
20	0,0926	2,1038	60,0	30,04
30	0,0922	2,1960	75,0	31,35
30	0,0724	2,2684	91,0	32,39
60	0,0836	2,3520	121,0	33,58
60	0,0431	2,3951	151,0	34,20
60	0,0237	2,4188	181,0	34,54

**Tabela C.17** - Dados da extração aquosa em leito fixo da *Lippia sidoides* Cham. a 400 bar e 60 °C. Corrida 03 (massa amostra: 6,9984 g).

Tempo (min)	Massa do extrato (g)	Massa de Água (g)	Rendimento (%)	Média das 3 corridas (%)	Desvio P. (%)
6h00	2,6432	182,0	37,77	36,46	1,71

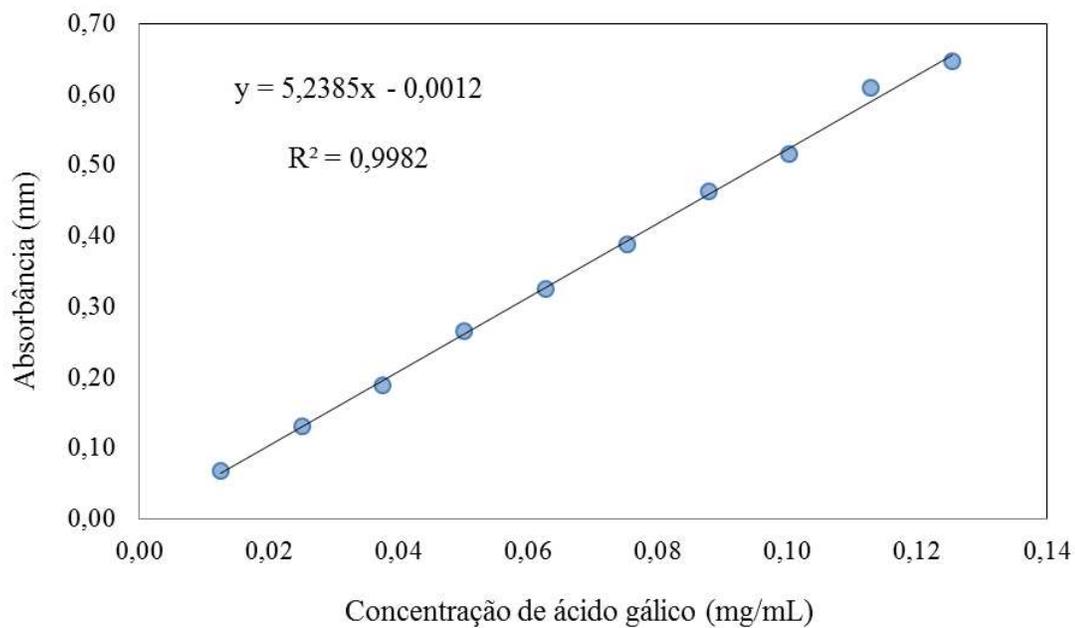


## **APÊNDICE D**

### **CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS**

**Tabela C.1** - Dados para obtenção da curva padrão de ácido gálico.

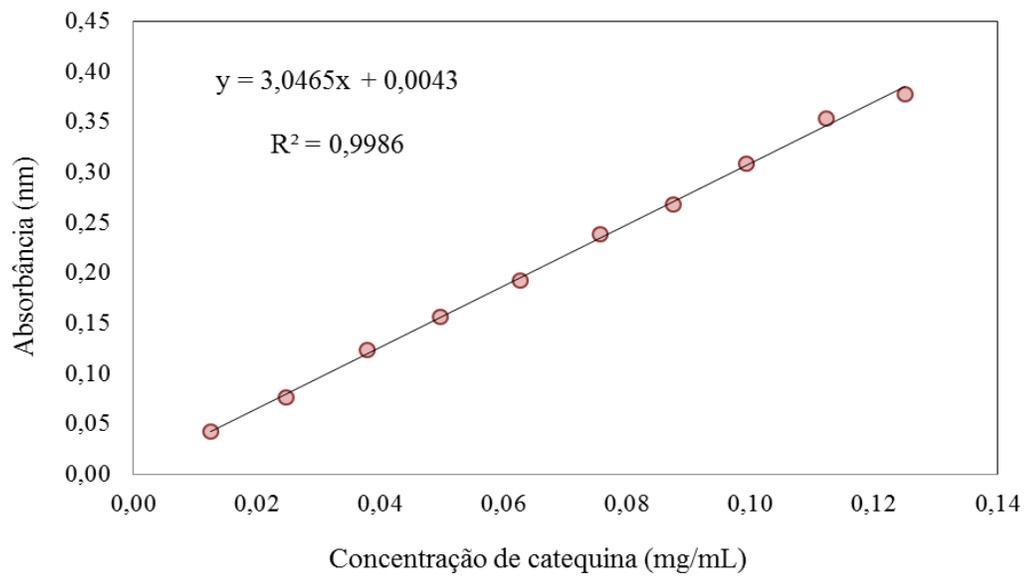
<b>Código da solução</b>	<b>Concentração da diluição (mg/mL)</b>	<b>Absorbância (nm)</b>	<b>Média (nm)</b>	<b>DP</b>
G1	0,0125	0,0670	0,0682	0,0014
		0,0698		
		0,0679		
G2	0,0251	0,1296	0,1309	0,0016
		0,1326		
		0,1304		
G3	0,0376	0,1892	0,1896	0,0005
		0,1901		
		0,1895		
G4	0,0501	0,2634	0,2646	0,0011
		0,2656		
		0,2648		
G5	0,0627	0,3258	0,3254	0,0004
		0,3250		
		0,3254		
G6	0,0752	0,3880	0,3876	0,0009
		0,3866		
		0,3883		
G7	0,0877	0,4636	0,4635	0,0007
		0,4627		
		0,4641		
G8	0,1003	0,5154	0,5149	0,0006
		0,5151		
		0,5142		
G9	0,1128	0,6090	0,6090	0,0002
		0,6092		
		0,6088		
G10	0,1254	0,6450	0,6463	0,0011
		0,6470		
		0,6468		



**Figura D.1-** Curva padrão de ácido gálico.

**Tabela D.2** - Dados para obtenção da curva padrão de catequina.

<b>Código da solução</b>	<b>Concentração da diluição (mg/mL)</b>	<b>Absorbância (nm)</b>	<b>Média (nm)</b>	<b>DP</b>
C1	0,0125	0,0417	0,0421	0,0004
		0,0425		
		0,0422		
C2	0,0248	0,0754	0,0761	0,0007
		0,0767		
		0,0761		
C3	0,0378	0,1236	0,1235	0,0001
		0,1236		
		0,1234		
C4	0,0496	0,1561	0,1559	0,0003
		0,1560		
		0,1555		
C5	0,0626	0,1925	0,1926	0,0003
		0,1929		
		0,1923		
C6	0,0756	0,2393	0,2380	0,0013
		0,2367		
		0,2379		
C7	0,0875	0,2667	0,2682	0,0013
		0,2685		
		0,2693		
C8	0,0993	0,3077	0,3086	0,0018
		0,3074		
		0,3106		
C9	0,1123	0,3533	0,3538	0,0006
		0,3544		
		0,3536		
C10	0,1251	0,3769	0,3778	0,0009
		0,3778		
		0,3786		



**Figura D.2** - Curva padrão de catequina.



## **APÊNDICE E**

### **DADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS DAS ANÁLISES DOS EXTRATOS**

**Tabela E.1** – Dados experimentais do conteúdo de fenóis totais de extratos de *Eugenia uniflora* L.

<b>Código*</b>	<b>Concentração (g extrato /mL solução)</b>	<b>Absorbância (nm)</b>	<b>Concentração (mg EAG/mL solução)</b>	<b>Fenóis (mg EAG/ g extrato)</b>	<b>Média Fenóis</b>	<b>DP Fenóis</b>	<b>Rendimento global (%)*</b>	<b>Rendimento (mg EAG/ g mp)</b>	<b>Média Rend.</b>	<b>DP Rend.</b>
SC-V	0,002	0,2726	0,0523	26,1334	25,96	0,15	0,31	0,08	0,08	0,001
		0,2698	0,0517	25,8662				0,08		
		0,2701	0,0518	25,8948				0,08		
EC	0,000442	0,3463	0,0663	150,0810	150,67	0,68	18,43	27,66	27,77	0,13
		0,3494	0,0669	151,4198				27,91		
		0,3473	0,0665	150,5128				27,74		
ELF	0,000438	0,3735	0,0715	163,3062	163,54	0,37	19,58	31,98	32,02	0,07
		0,3750	0,0718	163,9599				32,10		
		0,3736	0,0715	163,3498				31,98		
SCE	0,000415	0,5212	0,0997	240,2969	240,47	0,19	15,90	38,21	38,23	0,03
		0,5215	0,0998	240,4349				38,23		
		0,5220	0,0999	240,6649				38,27		
SC	0,002178	0,3715	0,0711	32,6659	32,70	0,03	5,37	1,75	1,76	0,00
		0,3721	0,0713	32,7185				1,76		
		0,3719	0,0712	32,7010				1,76		
AC	0,000419	0,2376	0,0456	108,7961	108,69	0,15	27,28	29,68	29,65	0,04
		0,2370	0,0455	108,5227				29,61		
		0,2375	0,0456	108,7505				29,67		
ALF	0,0004	0,3182	0,0610	152,4291	152,17	0,23	33,48	51,03	50,95	0,08
		0,3173	0,0608	151,9996				50,89		
		0,3175	0,0608	152,0951				50,92		
SCA	0,000403	0,4920	0,0941	233,6206	233,83	0,53	21,98	51,35	51,39	0,12
		0,4937	0,0945	234,4258				51,53		
		0,4916	0,0941	233,4311				51,31		

\* Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA).

**Tabela E.2** – Dados experimentais do conteúdo de flavonoides totais de extratos de *Eugenia uniflora* L.

Código*	Concentração (g extrato /mL solução)	Absorbância (nm)	Concentração (mg EC/mL solução)	Flavonoides (mg EC/ g extrato)	Média Flav.	DP Flav.	Rendimento global (%)*	Rendimento (mg EC/ g mp)	Média Rend.	DP Rend.
SC-V	0,0004	0,0841	0,0262	65,4850	64,39	1,00	0,31	0,20	0,20	0,003
		0,0817	0,0254	63,5155						
		0,0825	0,0257	64,1720						
EC	0,001105	0,2081	0,0669	60,5398	60,65	2,45	18,43	11,16	11,18	0,45
		0,2004	0,0644	58,2524						
		0,2169	0,0698	63,1538						
ELF	0,002192	0,2781	0,0899	41,0007	39,55	1,50	19,58	8,03	7,74	0,29
		0,2691	0,0869	39,6530						
		0,2581	0,0833	38,0058						
SCE	0,002076	0,1814	0,0581	28,0021	27,83	0,32	15,90	4,45	4,42	0,05
		0,1815	0,0582	28,0179						
		0,1780	0,0570	27,4645						
SCE	0,000436	0,2137	0,0687	157,6482	152,65	4,44	5,37	8,47	8,20	0,24
		0,2051	0,0659	151,1736						
		0,2024	0,0650	149,1409						
AC	0,002094	0,1457	0,0464	22,1652	20,18	1,94	27,28	6,05	5,51	0,53
		0,1326	0,0421	20,1117						
		0,1209	0,0383	18,2777						
ALF	0,002	0,1037	0,0326	16,3138	14,83	1,29	33,48	5,46	4,97	0,43
		0,0909	0,0284	14,2130						
		0,0894	0,0279	13,9668						
SCA	0,002016	0,1325	0,0421	20,8735	20,06	0,72	21,98	4,59	4,41	0,16
		0,1239	0,0393	19,4733						
		0,1262	0,0400	19,8478						

\* Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA).

**Tabela E.3** – Dados experimentais do conteúdo de fenóis totais de extratos de *Lippia sidoides* Cham.

Código*	Concentração (g extrato /mL solução)	Absorbância (nm)	Concentração (mg EAG / mL solução)	Fenóis (mg EAG/ g extrato)	Média Fenóis	DP Fenóis	Rendimento global (%)*	Rendimento (mg EAG/ g mp)	Média Rend.	DP Rend.
SC	0,000444	0,3025	0,0580	130,5734	132,21	1,42	5,78	7,55	7,64	0,08
		0,3079	0,0590	132,8951						
		0,3085	0,0591	133,1531						
SCE	0,000435	0,5078	0,0972	223,3683	221,44	1,80	20,63	46,08	45,68	0,37
		0,5027	0,0962	221,1302						
		0,4997	0,0956	219,8137						
ELF	0,000416	0,5008	0,0958	230,3581	230,50	0,12	24,92	57,41	57,44	0,03
		0,5013	0,0959	230,5875						
		0,5012	0,0959	230,5416						
EC	0,000402	0,4518	0,0865	215,1123	214,86	0,24	18,87	40,59	40,54	0,05
		0,4508	0,0863	214,6374						
		0,4512	0,0864	214,8274						
SC-V	0,000399	0,1925	0,0370	92,6723	93,28	0,54	0,95	0,88	0,89	0,01
		0,1941	0,0373	93,4378						
		0,1947	0,0374	93,7248						
ALF	0,000425	0,2601	0,0499	117,3663	117,83	0,45	36,47	42,80	42,97	0,16
		0,2612	0,0501	117,8604						
		0,2621	0,0503	118,2647						
SCA	0,001998	0,3986	0,0763	38,1980	38,16	0,06	15,58	5,95	5,94	0,01
		0,3984	0,0763	38,1789						
		0,3975	0,0761	38,0929						
AC	0,000417	0,1625	0,0312	74,9386	74,02	0,80	31,73	23,78	23,49	0,26
		0,1592	0,0306	73,4279						
		0,1598	0,0307	73,7026						

\* Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA).

**Tabela E.4** – Dados experimentais do conteúdo de flavonoides totais de extratos de *Lippia sidoides* Cham.

Código*	Concentração extrato /mL solução (g)	Absorbância (nm)	Concentração (mg EC / mL solução)	Flavonoides (mg EC/ g extrato)	Média Flav.	DP Flav.	Rendimento global (%)*	Rendimento (mg EC/ g mp)	Média Rend.	DP Rend.
SC	0,000444	0,1014	0,0319	71,7852	72,30	0,52	5,78	4,15	4,18	0,03
		0,1028	0,0323	72,8202						
		0,1021	0,0321	72,3027						
SCE	0,000218	0,1784	0,0571	262,1447	262,30	0,40	20,63	54,08	54,11	0,08
		0,1788	0,0573	262,7470						
		0,1783	0,0571	261,9941						
ELF	0,000208	0,1811	0,0580	279,0087	279,69	1,61	24,92	69,53	69,70	0,40
		0,1808	0,0579	278,5353						
		0,1827	0,0586	281,5337						
EC	0,000402	0,2913	0,0942	234,3444	234,89	2,25	18,87	44,22	44,32	0,43
		0,2950	0,0954	237,3656						
		0,2896	0,0936	232,9563						
SC-V	0,001997	0,2703	0,0873	43,7222	43,49	0,31	0,95	0,42	0,41	0,00
		0,2696	0,0871	43,6072						
		0,2667	0,0861	43,1305						
ALF	0,000425	0,1460	0,0465	109,4409	109,54	1,32	36,47	39,91	39,95	0,48
		0,1445	0,0460	108,2824						
		0,1479	0,0471	110,9084						
SCA	0,0004	0,0699	0,0215	53,8323	52,26	1,37	15,58	8,39	8,14	0,21
		0,0669	0,0205	51,3704						
		0,0671	0,0206	51,5674						
AC	0,000417	0,0851	0,0265	63,6025	62,37	1,13	31,73	20,18	19,79	0,36
		0,0832	0,0259	62,1069						
		0,0823	0,0256	61,3984						

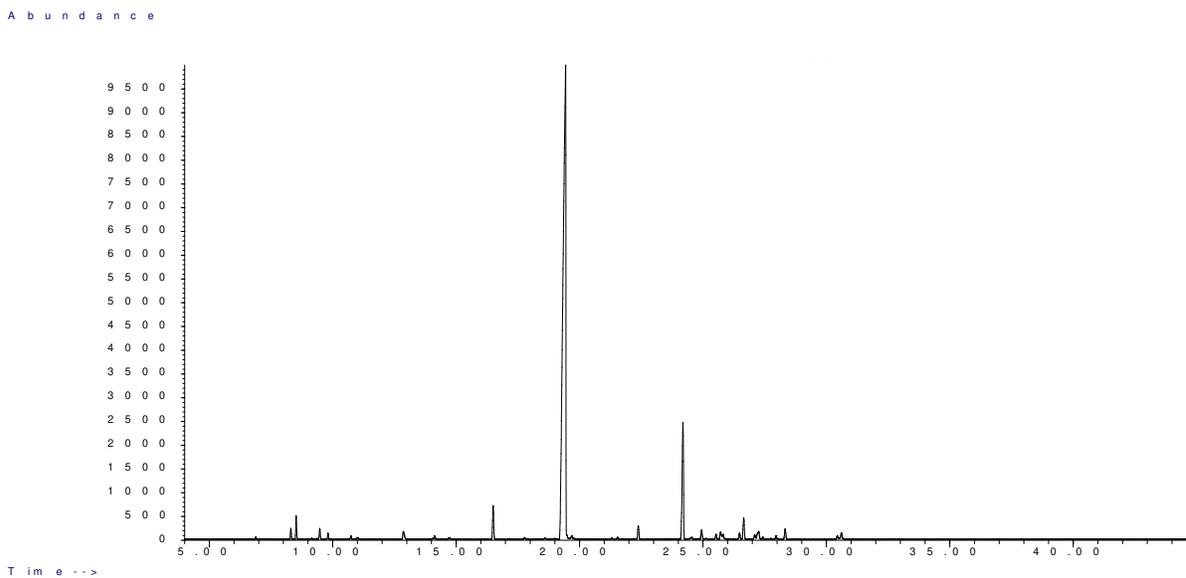
\* Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA).



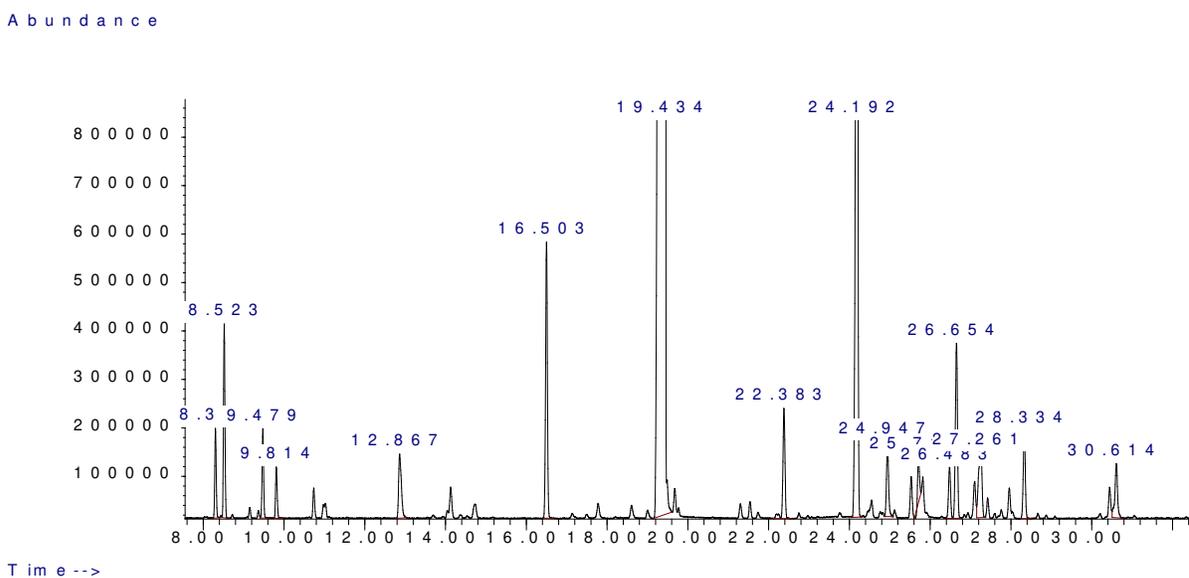
## APÊNDICE F

### CROMATOGRAMAS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS EXTRATOS DE *Eugenia uniflora* L. e *Lippia sidoides* Cham.





**Figura F.3** – Perfil químico por CG-EM da fração volátil de *Lippia sidoides* Cham. (normalizado).



**Figura F.4** – Cromatograma da fração volátil de *Lippia sidoides* Cham. com o respectivos tempos de retenção ( $t_R$  de 08 a 32 min) dos constituintes químicos.