



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA – FEQ

ELISSANDRO JAIR KLEIN

**OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE α E β -AMIRINA A PARTIR
DE FOLHAS DE UVAIA (*Eugenia pyriformis* Cambess.)**

CAMPINAS
2020

ELISSANDRO JAIR KLEIN

**OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE α E β -AMIRINA A PARTIR
DE FÓLHAS DE UVAIA (*Eugenia pyriformis* Cambess)**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Melissa Gurgel Adeodato Vieira

Coorientador: Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO/TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO, E
ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a.
MELISSA GURGEL ADEODATO VIEIRA.

Campinas

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Klein, Elissandro Jair, 1992-

K672o Obtenção e purificação de α e β -amirina a partir de folhas de uvaia
(*Eugenia pyriformis* Cambess.) / Elissandro Jair Klein. – Campinas, SP : [s.n.],
2020.

Orientador: Melissa Gurgel Adeodato Vieira.

Coorientador: Edson Antonio da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Química.

1. Extração por solventes. 2. Compostos bioativos. 3. Extração com fluido
supercrítico. 4. Extração com líquido pressurizado. 5. Terpenos. I. Viera,
Melissa Gurgel Adeodato, 1979-. II. Silva, Edson Antonio da, 1969-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Obtaining and purifying α and β -amirina from uvaia leaves
(*Eugenia pyriformis* Cambess.)

Palavras-chave em inglês:

Solvent extraction

Bioactive compounds

Supercritical fluid extraction

Pressurized liquid extraction

Terpenes

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora:

Melissa Gurgel Adeodato Vieira [Orientador]

Roberta Ceriani

Mariana Conceição da Costa

Vladimir Ferreira Cabral

Jaqueline Hoscheid

Data de defesa: 30-10-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: 0000-0002-4731-3608

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4933773221061736>

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por ELISSANDRO JAIR KLEIN, no dia 30 de outubro de 2020, pela banca examinadora constituída pelos doutores.

Profa. Dra. Melissa Gurgel Adeodato Vieira
Presidente e Orientadora
FEQ / UNICAMP
Videoconferência

Profa. Dra. Roberta Ceriani
FEQ / UNICAMP
Videoconferência

Profa. Dra. Mariana Conceição da Costa
FEQ / UNICAMP
Videoconferência

Dr. Vladimir Ferreira Cabral
Universidade Estadual de Maringá – UEM
Videoconferência

Dra. Jaqueline Hoscheid
Universidade Paranaense
Videoconferência

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo...

À minha família, em especial meus pais Vitor e Valesca, pela inspiração, apoio, incentivo e por tudo que me ensinaram. Aos meus irmãos, Marlon e Adriano, e a minha cunhada Dábila pela amizade e apoio, e aos sobrinhos Luis e Bianca pela alegria que proporcionam.

À professora Dra. Melissa Gurgel Adeodato Viera e ao professor Dr. Edson Antonio da Silva, pela orientação, dedicação e confiança.

Aos amigos de longa data e aos mais recentes em especial à Bruna Schuh, Camila Neves, Israel Borges, Kátia Santos, Marconi Madruga, Pedro Sztokfisz, Ricardo Bernardo, pela paciência e companheirismo em todos os momentos.

Ao Gabriel Sartori, que entrou na minha vida na reta final deste doutorado e, com o amor, tornou meus dias mais leves e felizes, sendo fundamental na conclusão desta etapa.

Aos colegas de laboratório que acabaram virando amigos: Emanuelle Freitas, Gabriella Simon Maia, Geovani Freitas, Julia de Andrade, Letícia Lima, Maria Fernanda, Raissa Antonelli e Thiago Lopes, agradeço ao companheirismo e suporte em tantos momentos bons e ruins.

À melhor aluna de IC que eu poderia ter encontrado: Francieli Narok, por ter me ajudado tanto nos experimentos dessa longa jornada.

Ao Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Vegetais, sob a responsabilidade da prof^a Maria Angela de Almeida Meireles Petenate. E ao suporte recebido de: Grazielle Nathia, Renata Vardanega e Pedro Ivo de Carvalho.

Ao prof^o Dan Staerk, às técnicas de laboratório Arife Önder e Louise Kjærulff e aos colegas da *University of Copenhagen*: Ida K. Straad, Chao Liang, Nhung Thi Dinh, Mohamad, Dawwas, Sanaz Sadani, pelo suporte e acolhimento recebidos durante o período de estágio de pesquisa no exterior.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Unicamp pela infraestrutura e equipe excepcionais. Agradeço aos professores que aceitaram compor as bancas avaliadoras pelas valiosas contribuições à minha tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2015/22952-9 e 2019/07596-2.

RESUMO

A *Eugenia pyriformis* Cambess (Uvaia) é uma espécie arbórea típica da Mata Atlântica brasileira, que possui poucos relatos na literatura relacionados a processos de extração de compostos bioativos de partes vegetais da planta. Os compostos α -amirina e β -amirina são triterpenos pentacíclicos estudados nos últimos anos com diversos potenciais terapêuticos. Neste projeto de doutorado foi realizada uma investigação aprofundada do potencial dessa planta, levando em consideração os resultados promissores obtidos em estudos anteriores e na falta de informações na literatura. Desta forma, o principal objetivo foi a obtenção de extratos vegetais ricos em α -amirina e β -amirina a partir de diversos processos de extração, bem como realizar estudos de processo de purificação. Foram avaliados os efeitos dos métodos de extração e da variação de condições utilizadas nos processos sobre o rendimento global de extratos obtidos e sobre a composição química deles. Na extração com CO_2 supercrítico o melhor rendimento global (1,75% m/m) foi obtido na condição de 200 bar e 60 °C, enquanto que a maior concentração (63,85% m/m) foi obtida com 200 bar e 80 °C. O modelo fenomenológico desenvolvido baseado nas equações de equilíbrio de Freundlich foi o que, estatisticamente, melhor descreveu as cinéticas de extração. A adição de cossolvente na extração com CO_2 supercrítico aumentou consideravelmente o rendimento global das extrações, chegando em 3,95% ao utilizar-se 15% m/m de etanol. Nesta mesma condição, o rendimento de amirinas foi o maior da técnica de extração com fluido supercrítico (16,12 g kg⁻¹ MP). Na análise econômica deste processo, verificou-se que os menores custos de produção foram estimados para a extração com fluido supercrítico com adição de cossolventes. Na avaliação de diferentes solventes, o maior rendimento global foi obtido utilizando-se metanol na extração com líquido pressurizado (20,30% m/m). A maior concentração de α -/ β -amirina (73,01% m/m) nos testes de solventes foi encontrada nos extratos obtidos com hexano na extração assistida por ultrassom. O melhor rendimento global (1,74% m/m) e rendimento de amirinas (13,11 g kg⁻¹ de matéria-prima) da extração assistida por ultrassom foi, obtido na condição de 200 W/L, 60 °C e razão amostra/solvente 1:25 g:mL. Para a extração com líquido pressurizado o melhor rendimento global (3,56% m/m) foi obtido na condição de 100 °C e 150 bar. Entretanto, o rendimento de amirinas (15,74 g kg⁻¹ MP) foi obtida na condição de 40 °C, 150 bar. Na extração por maceração o melhor rendimento global (1,70% m/m) foi obtido com 60 °C, 100 RPM e 20 minutos de extração. Nessa mesma condição o rendimento de amirinas foi 12,34 g kg⁻¹ MP. Já na extração por soxhlet o rendimento global foi de 2,84% m/m, rendimento de amirinas de 13,55 g kg⁻¹ MP. Em relação à capacidade antioxidante, somente os extratos obtidos com solventes polares (metanol e etanol) apresentaram resultados positivos. O processo de purificação desenvolvido neste trabalho mostrou-se bastante eficaz, resultando em uma fração com pureza da mistura de α -/ β -amirina de 93,75%. Cabe ainda ressaltar os resultados de bioatividade encontrados durante o estágio de pesquisa no exterior demonstraram o potencial uso para o tratamento de diabetes tipo 2.

Palavras-chave: Processos de extração, *Eugenia pyriformis*, α -amirina, β -amirina, compostos bioativos.

ABSTRACT

Eugenia pyriformis Cambess (*Uvaia*) is a fruit tree originally from the Brazilian Atlantic Forest, however, the extraction of its bioactive compounds has so far been poorly described on the body of worldwide literature. Over the last number of years, pentacyclic triterpenes (α -amyrin and β -amyrin) have showed several therapeutic potentials. Considering the lack of a detailed body of investigation associated with *Eugenia pyriformis* as well as a recent master's degree research, this doctoral project additionally evaluated relative potential characteristics of the before mentioned arboreal specie. Therefore, the main objective of this project was to obtain plant extracts, rich in α -amyrin and β -amyrin, using different extraction processes, as well as to perform assessments of related purification process. The effects of the extraction methods and the variation of conditions used in the processes on the global yield of extracts obtained along with their chemical composition were evaluated. In the supercritical CO₂ extraction, the best yield (1.75%) was obtained in the condition of 200 bar and 60 °C, while the highest purity was obtained with 200 bar and 80 °C, reaching 63.85% w/w. The phenomenological model based on the Freundlich equilibrium equations was the one that statistically best described the extraction kinetics. The addition of co-solvent to the supercritical CO₂ extraction considerably increased the extraction yield, reaching 3.95% w/w when using 15% w/w ethanol. In the same condition, α -/ β -amyrin recovery was the highest in the supercritical fluid extraction technique (16.12 g kg⁻¹ MP). As far as the economic evaluation concerned, lower manufacturing costs were estimated for the supercritical fluid extraction with co-solvent addition. In the evaluation of different solvents in the extractions, the highest yield was obtained using methanol in pressurized liquid extraction (20.30% w/w). The highest concentration of α -/ β -amyrin (73.01% w/w) in the solvent tests was found in extracts obtained with hexane on ultrasound assisted extraction. The best yield of ultrasound assisted extraction was 1.74% w/w, obtained in the condition of 200 W/L, 60 °C and sample / solvent ratio of 1:25 g : mL. The highest concentration of α -/ β -amyrin (81.56% w/w) was obtained under the same experimental conditions, resulting in a recovery of 13.11 g kg⁻¹. For the extraction with pressurized liquid, the best yield (3.56% w/w) was obtained in the condition of 100 °C and 150 bar. However, higher amyirin recovery (15.74 g kg⁻¹RM) was obtained under the condition of 40 °C, 150 bar. In the extraction by maceration, the best yield (1.70% w/w) was obtained with 60 °C, 100 RPM and 20 minutes of extraction. In this same condition, the obtained recovery of 12.34 g kg⁻¹RM. In the soxhlet extraction, the yield was 2.84% w/w, recovery of 13.55 g kg⁻¹RM. With regards to antioxidant activity, only the extracts obtained with polar solvents (methanol and ethanol) was associated with positive results. The purification process herewith developed, showed to be fundamentally efficient, resulting in a fraction with purity of 93.75%. It is worthwhile mentioning that the bioactivity results performed during the attended international exchange program demonstrated its potential use for the treatment of type 2 diabetes mellitus.

Keywords: Extraction processes, *Eugenia pyriformis*, α -amyrin, β -amyrin, bioactive compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Ramo de uvaieira em frutificação e fruto de uvaia.	30
Figura 2.2 - Diagrama de fases (P_c - Pressão Crítica e T_c – Temperatura Crítica)...	32
Figura 2.3 – Extração por cavitação	38
Figura 2.4 - Esquema do sistema de extração por ultrassom de sonda	39
Figura 2.5 - Estrutura química de α -amirina (a) e β -amirina (b).	45
Figura 3.1 - Esquematização do módulo de EFS.	55
Figura 3.2 - Fluxograma de simulação para extratos obtidos por extração de CO_2 supercrítico (A) e extração de CO_2 supercrítico + cossolvente (B).....	70
Figura 3.3 - Gráfico de Gantt de operações para o processo de extração de CO_2 supercrítico (A) e processo de extração de CO_2 supercrítico + cossolvente (B)	72
Figura 3.4 - Esquematização do módulo de ELP.	80
Figura 3.5 - Cromatograma dos padrões α e β -amirina.	82
Figura 4.1 - Aspecto visual dos extratos de Uvaia obtidos na EFS.	93
Figura 4.2 - Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis pressão e temperatura no rendimento da EFS.	96
Figura 4.3 - Superfície de resposta para o rendimento global da EFS.	97
Figura 4.4 - Curvas cinéticas das EFS das condições utilizadas no planejamento experimental.....	98
Figura 4.5 - Representações individuais das curvas cinéticas de EFS	99
Figura 4.6 - Curvas cinéticas da triplicata do ponto central (175 bar e 70 °C).	100
Figura 4.7 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos empíricos	102
Figura 4.8 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos: A – modelo de segunda ordem, B – modelo de equilíbrio, C – modelo BIC, D – Modelo de equilíbrio de Langmuir e E – modelo de equilíbrio de Freundlich	105
Figura 4.9 - Curvas cinéticas de EFS na condição de 60 °C, 200 bar e vazão de $2,0 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$ e variando-se os tamanhos de partículas	109
Figura 4.10 - Curvas cinéticas de EFS na condição de 60 °C, 200 bar e diâmetro de partícula de 0,602 mm e variando-se as vazões	110
Figura 4.11 – Rendimentos globais obtidos nas extrações das folhas de uvaia com CO_2 supercrítico a 60 °C usando diferentes pressões. Letras diferentes indicam diferença estatística (5% de significância).	111
Figura 4.12 – Rendimentos globais dos extratos obtidos a partir das folhas de uvaia por extração supercrítica realizada a 60 °C e 200 bar. Letras diferentes indicam diferença estatística (5% de significância).	112
Figura 4.13 – Curvas cinéticas de extração realizadas a 60 °C e 200 bar com e sem a adição de cossolvente. ■ CO_2 puro; ▲ CO_2 + 5% AcEt.	113
Figura 4.14 – Curvas cinéticas de extração de aumento de escala determinadas a 60 °C e 200 bar utilizando CO_2 + 5% AcEt: ▲ escala original; ■ 5 X de aumento; ● 10 X de aumento.	116
Figura 4.15 - Curvas cinéticas experimentais e curvas geradas pelo modelo <i>spline</i>	117
Figura 4.16 - Curvas com os parâmetros de lucratividade	119
Figura 4.17 - Curvas de pureza de amirinas em comparação com os custos de produção	120
Figura 4.18 - Variação do custo de produção e dos custos específicos em função da escala de produção	122

Figura 4.19 - Distribuição dos custos específicos em função da escala adotada ...	122
Figura 4.20 - Custo total em função do custo fixo de equipamento em diferentes escalas	124
Figura 4.21 - Curva cinética da EAU na condição de 55 °C, 250 W/L de potência, razão massa de folha/volume de solvente de 1:20 g/mL	126
Figura 4.22 - Curva cinética da ELP na condição de 60 °C, 100 bar e vazão de solvente de 5 mL min ⁻¹ utilizando-se hexano como solvente.....	131
Figura 4.23 - Curva cinética da extração por maceração na condição de 55 °C, 100 RPM, razão massa de folha/volume de solvente de 1:20 g/mL.....	136
Figura 4.24 - Resultados de concentração e rendimento de α -/ β -amirina nos extratos obtidos por EFS.....	139
Figura 4.25 - Curva cinética de extração considerando os resultados de rendimento de α -/ β -amirina nas extrações com CO ₂ supercrítico puro e com adição de 5% de AcEt	143
Figura 4.26 - Resultado de concentração e rendimento de α -/ β -amirina nos extratos obtidos com diferentes solventes nas extrações por maceração, ELP e EAU	144
Figura 4.27 - Resultados obtidos na quantificação dos compostos α -/ β -amirina presentes nos extratos obtidos pela extração assistida por ultrassom.....	145
Figura 4.28 - Resultados de quantificação dos compostos α -/ β -amirina obtidos nas extrações com líquido pressurizado	147
Figura 4.29 - Quantificação de α -/ β -amirina nos extratos obtidos por maceração e soxhlet.....	149
Figura 4.30 - Aparência típica de uma placa de CCD após a análise de capacidade antioxidante	151
Figura 4.31 - Imagem obtida por MEV das faces adaxial (a) e abaxial (b) de partículas de folha de uvaia que não passaram por nenhum processo de extração – ampliação 200 X.....	153
Figura 4.32 – Vista lateral obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 1000 X.....	154
Figura 4.33 - Imagem obtida por MEV da face abaxial de uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 1000 X.....	154
Figura 4.34 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 3000 X.....	155
Figura 4.35 – Ampliações de 3000 X e 15000 X da vista lateral obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração	156
Figura 4.36 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após a extração com CO ₂ supercrítico com 200 bar e 60 °C – ampliação 3000 X	156
Figura 4.37 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após extração por maceração com hexano – ampliação 3000 X.....	157
Figura 4.38 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após extração por soxhlet com hexano – ampliação 3000 X.....	157
Figura 4.39 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após 1 min de EAU com hexano – ampliação 3000 X	158
Figura 4.40 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após 20 min de EAU com hexano – ampliação 3000 X	159
Figura 4.41 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após extração com hexano pressurizado – ampliação 3000 X	160
Figura 4.42 - Imagem obtida por MEV do extrato obtido com CO ₂ supercrítico – ampliação 3000 X.....	160

Figura 4.43 - Curvas da análise termogravimétrica (TGA) e da primeira derivada (DTG) do extrato obtido com EFS de folhas de uvaia	161
Figura 4.44 - Curva de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o extrato obtido com EFS das folhas de uvaia	162
Figura 4.45 - Difratoograma de raios X para o extrato obtido por EFS	163
Figura 4.46 - Comparativo do difratograma da amostra com os picos do padrão de α -amirina disponíveis na base de dados PDF-2	164
Figura 4.47 - O espectro de FTIR obtido a partir dos extratos de <i>Eugenia pyriformis</i>	165
Figura 4.48 – Gráfico de pontuação do PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média. A coloração varia de acordo com os solventes utilizados no método de extração. Vermelho: scCO ₂ puro, amarelo: EtOH, verde: AcEt, rosa: hexano, azul: metanol.	169
Figura 4.49 – Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média como na figura anterior. A coloração está de acordo com os valores de IC ₅₀ para a atividade de inibição da α -glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde: média atividade de inibição, amarelo: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.	170
Figura 4.50 - Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média como na Figura 4.61. A coloração está de acordo com os valores de IC ₅₀ para a atividade de inibição da α -amilase. Azul: alta atividade de inibição, verde: média atividade de inibição, amarelo: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.	170
Figura 4.51 – Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de Pareto. A coloração é de acordo com os solventes utilizados no método de extração. Vermelho: scCO ₂ puro, amarelo: EtOH, verde: AcEt, rosa: hexano, azul: metanol.	171
Figura 4.52 - Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de Pareto como na Figura 4.65. A coloração está de acordo com os valores de IC ₅₀ para a atividade de inibição de α -glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde: média alta atividade de inibição, amarelo: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.	172
Figura 4.53 – Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de Pareto como na Figura 4.65. A coloração está de acordo com os valores de IC ₅₀ para a atividade de inibição de α -amilase. Azul: alta atividade de inibição, verde: média alta atividade de inibição, amarelo: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.	172
Figura 4.54 - Gráfico de carregamento de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média e escalados de Pareto	173
Figura 4.55 – Cromatogramas de todos os diferentes extratos de folhas de uvaia. A coloração está de acordo com os valores de IC ₅₀ para a atividade de inibição da α -glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde escuro: média alta atividade de inibição, verde claro: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.	173
Figura 4.56 – Gráfico de pontuação de PCA de espectros de RMN de ¹ H de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de UV. A coloração é de acordo com os solventes utilizados no método de extração. Vermelho: scCO ₂ puro, amarelo: EtOH, verde: AcEt, rosa: hexano, azul: metanol.	174
Figura 4.57 – Gráfico de pontuação de PCA de espectros de RMN de ¹ H centrados na média e em escala de UV de extratos de folhas de uvaia. Coloração como na Figura	

4. A coloração está de acordo com os valores de IC ₅₀ para a atividade de inibição da α-glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde escuro: média alta atividade de inibição, verde claro: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.	175
Figura 4.58 – Gráfico de carregamento de PCA de espectros de RMN de ¹ H de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de UV.	176
Figura 4.59 – Espectros de ¹ H NMR de todos os diferentes extratos de folhas de uvaia. A coloração está de acordo com os valores de IC ₅₀ para a atividade de inibição da α-glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde escuro: média alta atividade de inibição, verde claro: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.	176
Figura 4.60 – Cromatograma de HPLC (parte superior) do extrato bruto UAE_MET e perfis de inibição de α-glicosidase de alta resolução correspondentes (parte inferior). Perfil de gradiente de eluição: 0 min, 50% B, 20 min 100% B, 30 min 100% B, 32 min 50% B, 39 min 50% B.	177
Figura 4.61 – Cromatograma de HPLC (parte superior) do extrato bruto UAE_MET e perfis de inibição de α-glicosidase de alta resolução correspondentes (parte inferior). Perfil de gradiente de eluição: 0 min, 0% B, 30 min 20% B, 50 min 100% B, 60 min 100% B, 61 min 0% B, 71 min 0% B. Injetados 10 µL de solução de extrato com 2 mg/mL em MeOH.	179

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Pontos críticos de solventes utilizados em extrações supercríticas	33
Tabela 2.2 – Faixa de valores aproximados de propriedades físico-químicas de líquidos, gases e fluidos supercríticos	33
Tabela 2.3 - Resultados de algumas quantificações de amirinas (α e β) encontradas na literatura (g kg^{-1})	46
Tabela 3.1 - Planejamento experimental para EFS	54
Tabela 3.2 - Principais parâmetros econômicos usados para estimativa de COM....	75
Tabela 3.3 - Extratos utilizados nos experimentos desenvolvidos no estágio de pesquisa no exterior	86
Tabela 4.1 - Distribuição Granulométrica das folhas de Uvaia após secagem e moagem	91
Tabela 4.2 - Condições do operacionais das EFS e seus respectivos rendimentos globais	94
Tabela 4.3 – Tabela de efeitos para as variáveis pressão e temperatura no rendimento global da EFS	95
Tabela 4.4 – ANOVA do modelo cuja resposta é rendimento global da EFS	97
Tabela 4.5 - Parâmetros ajustáveis obtidos nos modelos fenomenológicos para a extração com fluido supercrítico	101
Tabela 4.6 - Parâmetros de comparação dos modelos utilizados nas cinéticas de extração	103
Tabela 4.7 - Parâmetros ajustados e avaliação estatística dos modelos testados..	104
Tabela 4.8 – Efeitos do tamanho de partícula sobre o rendimento global da extração com fluido supercrítico	108
Tabela 4.9 – Avaliação do efeito da vazão de CO_2 sobre o rendimento global das extrações com fluido supercrítico	109
Tabela 4.10 - Parâmetros OEC estimados pelo modelo <i>spline</i>	117
Tabela 4.11 - Custos específicos e COM	123
Tabela 4.12 – Rendimentos globais obtidos com o uso de diferentes solventes na extração assistida por ultrassom	125
Tabela 4.13 - Condições do operacionais das EAU e seus respectivos rendimentos globais	127
Tabela 4.14 – Avaliação dos efeitos de tamanho de partícula da matéria-prima sobre o rendimento global da extração assistida por ultrassom	128
Tabela 4.15 – Resultados de rendimento global da extração assistida por ultrassom obtidos utilizando-se ciclos de pulsos de sonicação.	129
Tabela 4.16 – Rendimentos globais obtidos com o uso de diferentes solvente na extração com líquido pressurizado	130
Tabela 4.17 – Avaliação inicial do efeito da temperatura e pressão sobre o rendimento global da extração com líquido pressurizado.	132
Tabela 4.18 – Rendimentos globais obtidos ao avaliar-se o efeito da vazão de solvente e de tamanho de partículas de matéria-prima na ELP	133
Tabela 4.19 – Rendimentos globais obtidos com o uso de diferentes solvente na extração por maceração	134
Tabela 4.20 - Rendimentos globais da extração por maceração obtidos com diferentes temperaturas.	136
Tabela 4.21 – Composição química do extrato determinada por CG-EM	138

Tabela 4.22 - Capacidade antioxidante dos extratos obtidos com diferentes técnicas de extração.....	152
Tabela 4.23 - Resultados obtidos nos processos de purificação.....	166
Tabela 4.24 - Valores de triagem da atividade de inibição para cada um dos 19 diferentes extratos de folhas de <i>Eugenia pyriformis</i>	167
Tabela 4.25 - Valores de IC ₅₀ da atividade de inibitório (µg/mL) para cada um dos 19 diferentes extratos de folhas de <i>Eugenia pyriformis</i>	168

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AIC = critério de seleção de Akaike

A_p = área superficial das partículas no leito (m^2)

C = concentração de soluto no solvente (kg/m^3)

CAPEX = despesa de capital

C_{eq} = concentração de equilíbrio do soluto no solvente, kg/m^3

CER = período de taxa de extração constante

COL = custo operacional com operadores

COM = custo de produção

CRM = custos com matérias-primas

CUT = custos com insumos

$C_{Z=H}$ = concentração de soluto no solvente na saída do extrator (kg/m^3)

DC = período com taxa de extração controlada

D_i = coeficiente de difusão interna (m^2/s)

DMC = custos diretos de produção

F = massa total de sólido no extrator (kg)

FCM = custo fixo com equipamento

FMC = custos fixos de produção

FER = período de taxa de extração decrescente

F_o = função objetivo

GE = despesas gerais

GM = margem bruta

GMP = boas práticas de fabricação

H = comprimento do extrator (m)

$J(x,y) = I(x,y)$ taxa de transferência de massa entre as fases ($kg/m^3 \text{ min}^y$)

K = coeficiente de transferência de massa (m^2)

k = constante cinética ($m^3/kg \text{ min}$)

k_f = coeficiente de transferência de massa no filme externo (min^{-1})

K_{fa} = coeficiente global de transferência de massa na fase fluida (min^{-1})

k_p = coeficiente de partição (adimensional)

$K_{sa} K_{sa}$ = coeficiente global de transferência de massa na fase sólida (min^{-1})

M_{CER} = taxa da transferência de massa no período CER

ME = erro médio relativo

m_e = massa de soluto no sólido no tempo t (kg)

m_{ext} = massa de soluto extraída (kg)

$\dot{m}_f$ = vazão mássica do solvente (g/min)

m_{extj}^{exp} = massa de soluto extraída obtida experimentalmente (kg).

m_{extj}^{calc} = massa calculada de soluto extraído (kg)

MP = matéria-prima

m^∞ = massa extraída extrapolada para $t \rightarrow \infty$ (kg)

n = parâmetro do modelo de Freundlich

n_{exp} = número de dados experimentais

OEC = curva geral de extração

OPEX = despesas operacionais

PCA = Análise por componentes principais

PT = tempo de retorno

q = concentração de soluto na matriz sólida (kg/m³)

Q = vazão mássica de solvente (kg/min)

q_0 = concentração inicial de soluto na matriz sólida (kg m⁻³)

q^* = concentração de soluto na interface sólido-fluido (kg/m³)

q_{max} = capacidade máxima de adsorção (g/g)

R^2 = coeficiente de correlação

R_{CER} = rendimento relativo ao período de CER

r_k = fração de soluto fixo (extrato de difícil acesso) (adimensional)

ROI = retorno sobre o investimento

S/F = relação massa de solvente / massa de alimentação de matéria-prima (kg/kg)

S/F_{CER} = razão de massa de solvente pela alimentação de matéria-prima, em relação ao período CER

t = tempo de extração (min)

t_{CER} = tempo de duração do período CER (min)

t_r = tempo de residência do solvente no leito (min)

t_i = tempo de difusão interna (min⁻¹)

T_x = taxa de extração (kg/min)

u = velocidade intersticial do solvente no leito empacotado (m/s)

V = volume do extrator (m³)

w = vazão volumétrica de solvente (m^3/min)

x = concentração de soluto na fase sólida (kg/kg)

x_0 = concentração inicial de soluto na fase sólida (kg/kg)

x_k = concentração de soluto na fase sólida, no instante em que termina a extração do soluto livre (kg/kg)

y = concentração de soluto no solvente (kg/kg)

Y_{CER} = razão em massa do soluto na fase supercrítica na saída da coluna

$y_r y_r$ = solubilidade do soluto no solvente (kg/kg)

$Y_{Z=0}$ = razão mássica entre soluto e solvente na entrada do reator (kg/kg)

$Y_{Z=L}$ = razão mássica entre soluto e solvente na saída de reator (kg/kg)

z = coordenada axial do leito (m)

LISTA DE SÍMBOLOS

ε = porosidade do leito (adimensional)

ρ_{bed} = densidade do leito (kg/m^3)

ρ_{solvent} = densidade do solvente (kg/m^3)

ρ_{solid} = densidade do sólido (kg/m^3)

v = fator forma para o cálculo do tempo de difusão (adimensional)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Motivação da Pesquisa	24
1.2 Objetivos	26
1.2.1 Objetivo Geral	26
1.2.2 Objetivos Específicos	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 Uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess.)	29
2.2 Métodos de extração	31
2.2.1 Extração com Fluido Supercrítico	32
2.2.1.1 Dióxido de carbono supercrítico	34
2.2.1.2 Modelagem matemática do processo de extração supercrítica	35
2.2.2 Extração Assistida por Ultrassom	37
2.2.2.1 Modelagem matemática do processo de extração assistida por ultrassom ..	40
2.2.3 Extração com líquido pressurizado (ELP)	40
2.3 Extratos vegetais	44
2.3.1 Terpenos	44
2.3.1.1 α -Amirina e β -Amirina	44
2.4 Considerações sobre a revisão	48
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Preparo da matriz vegetal para extração	50
3.2 Determinação da umidade do material vegetal	51
3.3 Caracterização do material vegetal	51
3.4 Métodos Convencionais de extração	52
3.4.1 Extração por maceração	52
3.4.2 Extração com aparato Soxhlet	53
3.5 Extração com CO ₂ Supercrítico	53
3.5.1 Extração com CO ₂ supercrítico sem adição de cossolvente	53
3.5.2 Extração com CO ₂ supercrítico com adição de cossolvente	56
3.5.3 Modelagem matemática empírica das cinéticas de extração com fluido supercrítico	57
3.5.4 Modelagem matemática fenomenológica das cinéticas de extração com fluido supercrítico	59

3.5.4.1	Modelo de segunda ordem	59
3.5.4.2	Modelo de equilíbrio	61
3.5.4.3	Modelo de células intactas e rompidas	62
3.5.4.4	Modelo matemático desenvolvido a partir das equações de equilíbrio de adsorção de Freundlich	63
3.5.4.5	Modelo matemático desenvolvido a partir das equações de equilíbrio de adsorção de Langmuir	65
3.5.4.6	Parâmetros dos modelos e resolução matemática	66
3.5.5	Experimentos de aumento de escala e avaliação econômica do processo de extração supercrítica	67
3.5.5.1	Extrações supercríticas com aumento de escala	67
3.5.5.2	Crêterios do aumento de escala	68
3.5.5.3	Modelagem da curva cinética de extração	68
3.5.5.4	Modelos de simulação de processo	69
3.5.5.5	Aumento de escala e análise de sensibilidade	73
3.5.5.6	Parâmetros para a avaliação econômica	73
3.5.5.7	Parâmetros de lucratividade	77
3.6	Extração assistida por ultrassom	77
3.7	Extração com líquido pressurizado	79
3.8	Composição química por CG-EM	80
3.9	Quantificação de α -Amirina e β -Amirina por CLAE	81
3.10	Análise térmica do extrato	82
3.11	Difração de Raio X (DRX)	83
3.12	Isolamento e purificação das amirinas	83
3.13	Determinação da capacidade antioxidante dos extratos obtidos	84
3.14	Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos	85
3.15	Perfil de bioatividade dos extratos brutos obtidos com as diferentes técnicas de extração	85
3.15.1	Extratos utilizados	86
3.15.2	Bioensaios de avaliação de atividade antidiabética	87
3.15.3	Separação por CLAE em escala analítica e perfil de inibição de alta resolução de α -glicosidase	88
3.15.4	Experimentos de CLAE-EMAR e RMN	88

3.15.5 Análise por componentes principais dos cromatogramas de CLAE e dos espectros de RMN.....	89
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
4.1 Caracterização do material vegetal	91
4.2 Extração com fluido supercrítico	92
4.2.1 Rendimento global de extrato obtido por EFS	93
4.2.2 Curvas cinéticas obtidas nos experimentos do planejamento experimental ...	98
4.2.3 Modelagem matemática das cinéticas de extração utilizando modelos empíricos.....	100
4.2.4 Modelagem matemática das cinéticas de extração utilizando modelos fenomenológicos	103
4.2.5 Avaliação de efeitos secundários sobre o rendimento global da EFS	108
4.2.6 Adição de cossolvente na extração com fluido supercrítico.....	111
4.2.6.1 Avaliação do efeito da pressão na EFS.....	111
4.2.6.2 Efeitos da adição de cossolvente na extração com CO ₂ supercrítico.....	112
4.2.6.3 Cinéticas de extração obtidas com a adição de cossolvente.....	113
4.2.7 Aumento de escala e avaliação econômica do processo de extração supercrítica.....	114
4.2.7.1 Modelos de simulação	114
4.2.7.2 Critério de aumento de escala.....	115
4.2.7.3 Otimização técnico-econômica.....	116
4.2.7.4 Aumento de escala e análise de sensibilidade	121
4.3 Extração com solvente assistida por ultrassom	124
4.3.1 Avaliação de solventes	124
4.3.2 Cinética de extração assistida por ultrassom.....	125
4.3.3 Rendimento global.....	126
4.3.4 Avaliação de efeitos secundários sobre o rendimento global	128
4.4 Extração com líquido pressurizado	129
4.4.1 Avaliação de Solventes.....	129
4.4.2 Determinação do tempo total de extração	130
4.4.3 Determinação das melhores condições de Pressão e Temperatura	131
4.4.4 Avaliação de efeitos secundários sobre o rendimento global da extração com líquido pressurizado.	133

4.5 Extração com solvente por métodos convencionais	134
4.5.1 Avaliação de solventes na extração por maceração.....	134
4.5.2 Cinética de extração por maceração	135
4.5.3 Avaliação do efeito da temperatura de extração sobre o rendimento global da extração por maceração.....	136
4.5.4 Extração convencional com aparato Soxhlet	137
4.6 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)	137
4.7 Quantificação de α -amirina e β -amirina por CLAE.....	139
4.7.1 Quantificação de α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos extração com fluido supercrítico.....	139
4.7.2 Avaliação da influência do tipo de solvente sobre a quantidade de α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom, com líquido pressurizado e por maceração	143
4.7.3 Quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos na extração assistida por ultrassom	144
4.7.4 Quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado.....	147
4.7.5 Quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos por maceração e soxhlet	149
4.8 Determinação da capacidade antioxidante dos extratos obtidos	151
4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura do Material Vegetal	152
4.10 Análise térmica do extrato.....	161
4.11 Difração de raios X (DRX).....	163
4.12 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .	164
4.13 Isolamento e purificação das amirinas	165
4.14 Perfil de bioatividade dos extratos obtidos com os diferentes solventes e técnicas de extração	166
4.14.1 Inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase.....	166
4.14.2 PCAs para os cromatograma de CLAE-EMAR e espectros de RMN de ^1H dos extratos relacionados com os valores de IC_{50}	168
4.14.3 Perfil de inibição de alta resolução de α -glicosidase	177
4.14.4 Identificação dos metabólitos por CLAE-EMAR e RMN.....	179
5 CONCLUSÕES	181

5.1 Conclusões gerais	181
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	183
6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	185
6.1 Patente depositada	185
6.2 Publicações em periódicos	185
6.3 Publicações em eventos científicos	186
6.4 Publicações em elaboração	186
7 REFERÊNCIAS.....	187
APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS COM OS PADRÕES ANALÍTICOS DE α -AMIRINA E β -AMIRINA	202
APÊNDICE B – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE AMIRINAS NOS EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO ..	203
APÊNDICE C – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE AMIRINAS UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES	205
APÊNDICE D – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE AMIRINAS NOS EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM ..	207
APÊNDICE E – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE AMIRINAS NOS EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO	209
APÊNDICE F – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE AMIRINAS NOS EXTRATOS OBTIDOS POR MACERAÇÃO	211

1 INTRODUÇÃO

1.1 Motivação da Pesquisa

O interesse no estudo de plantas nativas aumentou consideravelmente nos últimos anos, bem como a busca por métodos eficazes de obtenção de extratos vegetais ricos em compostos bioativos. Vários ramos industriais utilizam extratos vegetais e compostos obtidos a partir destes para diversas finalidades.

Alimentos, cosméticos e medicamentos podem ser produzidos utilizando-se compostos naturais. Entretanto, em relação à Uvaia, poucas informações estão disponíveis no que diz respeito aos métodos de extração de compostos bioativos e caracterização dos extratos (APEL et al., 2004; HAMINIUK et al., 2011, 2012; STEFANELLO et al., 2009).

A Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) é uma espécie arbórea subtropical e típica da região sul do Brasil (LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011). Pertence à família Myrtaceae, mesma família da pitanga, jabuticaba e outras plantas, amplamente consumidas e estudadas (LUZIA; BERTANHA; JORGE, 2010; PERES et al., 2013; STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009).

Amirinas são geralmente encontradas em extratos de plantas medicinais e óleo-resinas de cascas de algumas espécies de árvores. Elas são estudadas *in vivo* e *in vitro* devido às suas propriedades químicas e farmacológicas (VÁZQUEZ et al., 2012). Entre os estudos sobre as potenciais aplicações biológicas e farmacológicas, pode-se destacar os efeitos: gastroprotetor (OLIVEIRA et al., 2004b), antidepressivo (ARAGÃO et al., 2006), analgésico (HOLANDA PINTO et al., 2008; SIMÃO DA SILVA et al., 2011; SOLDI et al., 2008), antioxidante (SINGH et al., 2015; SUNIL et al., 2014), antimicrobiano (ABDEL-RAOUF et al., 2013; DÍAZ-RUIZ et al., 2012; JOHANN et al., 2007) e anti-inflamatório (MATOS et al., 2013).

Em um estudo anterior (KLEIN et al., 2018), as folhas de uvaia mostraram-se promissoras para obtenção de extratos ricos em α -amirina e β -amirina quando utilizados CO₂ supercrítico e extração com hexano assistida por ultrassom. Desta forma, novos estudos são importantes para avaliar outros tipos de solventes, além de

demais técnicas de extração, bem como estudos da purificação dos extratos a fim de obter extratos mais ricos nestes compostos.

A extração com fluido supercrítico oferece uma alternativa interessante para a obtenção de compostos bioativos, superando algumas limitações apresentadas pelas técnicas convencionais de extração. O dióxido de carbono (CO_2) é o solvente mais utilizado nos processos de extração com fluido supercrítico, pois é inofensivo, pode ser utilizado em temperaturas moderadas e protege os extratos da oxidação durante o processo de extração. A extração com fluido supercrítico oferece ainda boas condições de transferência de massa, controle da densidade a partir de modificações das condições experimentais, fornecendo rápidas taxas de extração (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

A extração assistida por ultrassom é um método de extração considerado ambientalmente amigável, pois utiliza menos solvente que as técnicas convencionais e pode ser realizada em menos tempo e com menos gasto energético (CHEMAT et al., 2017). A extração é favorecida pela implosão das bolhas de cavitação geradas pelo ultrassom, o que gera ruptura das células da matriz vegetal e facilita a penetração do solvente, intensificando a transferência de massa (TOMA et al., 2001).

Extrações com líquido pressurizado são realizadas em altas pressões e temperaturas, o que aumenta a capacidade dos solventes de solubilizar os analitos, nessas condições a viscosidade dos solventes é menor promovendo uma melhor penetração do solvente na matriz (PÉRES et al., 2006). A extração com líquido pressurizado é adequada para uma vasta gama de solutos, polares e apolares (MUSTAFA; TURNER, 2011). É um processo de extração que utiliza pequenos tempos de extração e pequenas quantidades de solventes tóxicos, sendo uma excelente alternativa aos processos convencionais de extração e apresentando um potencial para uso na obtenção de compostos bioativos (OSORIO-TOBÓN et al., 2013).

Os processos de isolamento e purificação são muito importantes para o melhoramento dos extratos vegetais a fim de obter os compostos bioativos de interesse isolados dos demais compostos extraídos das plantas. As substâncias naturais isoladas podem ser utilizadas como matéria-prima no preparo de diversos produtos industrializados (VIEIRA JÚNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005).

É de grande importância o estudo dos extratos obtidos a partir de plantas, visto que é crescente a necessidade do desenvolvimento de novas formulações para diversos ramos industriais. Dentre os compostos estudados nos últimos anos, destacam-se os que apresentam potencial de utilização nas áreas biológicas e farmacológicas, principalmente quando os extratos são obtidos a partir da utilização de técnicas ecologicamente corretas e com menores prejuízos para a saúde humana.

Entre as potenciais aplicações farmacológicas dos compostos naturais obtidos a partir de plantas, é possível destacar o tratamento de diabetes tipo 2. Visto que tais compostos geralmente não apresentam os efeitos colaterais associados ao uso dos agentes farmacológicos convencionais de regulação dos níveis de glicose no sangue, como tiazolidinediona, sulfonilureias e inibidores da α -glicosidase (acarbose, voglibose e miglitol) (SOMTIMUANG; OLATUNJI; OVATLARNPORN, 2018). Outro alvo para o controle do diabetes tipo 2 é a enzima α -amilase e as plantas podem ser uma boa fonte de compostos que possuem atividade inibitória contra esta enzima (OKUTAN et al., 2014).

A escassez de estudos envolvendo a obtenção de extratos a partir de folhas de uvaia demonstra a necessidade da avaliação de diferentes técnicas de extração. A presença dos compostos bioativos α -amirina e β -amirina nos extratos das folhas de uvaia aumenta a importância da busca por técnicas adequadas de extração e de isolamento/purificação. A pesquisa proposta contribuiu na determinação de métodos e condições de extração ideais para obtenção de extratos com alta percentagem de α -amirina e β -amirina a partir das folhas de uvaia, além de estudar formas de isolamento e purificação desses compostos, possibilitando seu uso em diversas aplicações, principalmente farmacêuticas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes métodos de extração de compostos bioativos das folhas de Uvaia, visando obter extratos ricos em α -amirina e β -amirina e estudar processos de purificação para obter extratos com alta pureza. Busca-se, assim, o

desenvolvimento de uma tecnologia que possa utilizar o potencial dessa planta nativa brasileira como fonte de compostos com possíveis usos terapêuticos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos de Uvaia por métodos convencionais (maceração) e não-convencionais (extração com fluido supercrítico, assistida por ultrassom e com líquido pressurizado) de extração, a fim de avaliar a eficiência de cada método, bem como identificar qual solvente mais indicado para cada processo;
- Avaliar o efeito dos parâmetros utilizados em cada extração sobre o rendimento e teores de α -amirina e β -amirina. Para a extração supercrítica: temperatura, pressão, tempo de extração, tamanho de partícula da matéria-prima, vazão de CO₂ e adição de cossolvente. Para a extração assistida por ultrassom: temperatura, potência de sonicação, tempo de extração, razão entre massa de amostra e volume de solvente, tipo de solvente utilizado e tamanho de partícula. Para a extração com líquido pressurizado: vazão de solvente, temperatura, pressão, tempo de extração e tamanho de partícula da matéria-prima. Para a maceração será avaliado o efeito da temperatura e do tempo de extração;
- Determinar a composição química dos extratos obtidos em cada método de extração e quantificar os compostos α -amirina e β -amirina;
- Avaliar o teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante dos extratos obtidos;
- Estudar métodos de separação e purificação a fim de determinar o melhor método de purificação dos compostos α -amirina e β -amirina;
- Avaliar diferentes modelos matemáticos, tanto empíricos quanto fenomenológicos para descrever os processos de extração supercrítica;
- Desenvolver modelos matemáticos a partir de balanços de massa no extrato na fase fluida e na fase sólida para a extração com fluido supercrítico;
- Realizar estudos de aumento de escala e avaliação econômica do processo de extração com fluido supercrítico;

- Avaliar os extratos brutos obtidos com diferentes solventes e técnicas de extração quanto à sua capacidade de inibição das enzimas α -amilase, α -glicosidase e PTP1B;
- Construir o perfil inibitório de alta resolução do extrato com melhor atividade e verificar quais picos são responsáveis pela atividade;
- Realizar a identificação química dos compostos responsáveis pela inibição das enzimas relacionadas com o potencial terapêutico contra a diabetes tipo 2.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresentará uma revisão da literatura com as principais informações em relação à matéria-prima dessa pesquisa, a Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.). Trará ainda as características, limitações e possíveis influências das condições operacionais dos métodos de extração que serão empregados na obtenção dos compostos bioativos. A fim de demonstrar a importância da obtenção de extratos com os compostos α -amirina e β -amirina, bem como a necessidade de isolamento/purificação dos mesmos, serão apresentadas as características dos compostos e os potenciais usos deles.

2.1 Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.)

A uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) é uma espécie arbórea, com até 15 metros de altura, casca lisa, cinzento-amarelada e manchada de cor mais clara. Apresenta frutos de 2,0 a 2,4 cm de comprimento, vilosos, piriformes, amarelos, suculentos e comestíveis (MATTOS, 1984). Pertence à família Myrtaceae, mesma família de outras espécies de árvores cujos frutos são amplamente consumidos, como a jabuticaba (*Plinia cauliflora*), a goiaba (*Psidium guajava*) e a pitanga (*Eugenia uniflora*) (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009).

A planta (cujas sinônimas são *Pseudomyrcianthes pyriformis* (Camb.) Kaus. e *Eugenia uvalha* Camb.) ocorre naturalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, estando presente ainda no nordeste argentino e no Paraguai (LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011). O nome uvaia tem origem do tupi *iwa* 'ya que significa fruto ácido (RASEIRA *et al.*, 2004), também é popularmente conhecida como uvaieira, uvaia-do-campo, uvalha e uvalha-do-campo (ARMSTRONG; DO ROCIO DUARTE; MIGUEL, 2012).

Na Figura 2.1, são apresentados um ramo em frutificação e um fruto cortado de forma a exibir suas sementes.

Figura 2.1 - Ramo de uvaieira em frutificação e fruto de uvaia.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

A uvaieira tem grande potencial econômico de exploração, pois é de fácil cultivo, com baixo custo de implantação e manutenção (PEREIRA *et al.*, 2012). O fruto, levemente ácido, suculento e muito aromático, pode ser utilizado na fabricação de sucos, sorvetes, doces e geleias (LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011).

Até o momento, poucos estudos foram realizados em relação à uvaia. O óleo essencial dos frutos de uvaia foi avaliado em relação à capacidade antioxidante e microbiana, sendo que o fruto não se mostrou uma fonte apreciável de antioxidantes, mas teve atividade bacteriostática frente a diversas bactérias (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009). O óleo essencial obtido por hidrodestilação a partir das folhas frescas de uvaia apresentou como principais compostos: α -cadinol (14,0%), δ -cadinene (12,4 %), T-cadinol (11,9%), bicyclogermacrene (10,2 %) e β -caryophyllene (7,2 %) (APEL *et al.*, 2004). Óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de diferentes partes da planta apresentam diferentes composições, nas folhas os principais compostos encontrados foram β -pineno, limoneno, 1,8-cineol e óxido de cariofileno. No óleo essencial das flores, os compostos majoritários encontrados foram E-cariofileno e germacreno D, enquanto que no óleo das frutas foram os compostos: óxido de cariofileno e limoneno (STEFANELLO *et al.*, 2009).

Extratos obtidos das frutas de uvaia apresentaram boa capacidade antioxidante medida pelo método do DPPH• e apresentaram altas concentrações de ácido gálico e quercetina (HAMINIUK *et al.*, 2011, 2012).

2.2 Métodos de extração

A extração é uma operação unitária em que substâncias de interesse são separadas de suas matrizes, utilizando-se processos químicos, físicos ou mecânicos. O método aplicado e o solvente utilizado são determinantes para o rendimento e composição dos extratos obtidos. A solubilidade dos compostos se dá de acordo com a afinidade química entre as espécies, fazendo com que diferentes substâncias sejam extraídas em função da polaridade do solvente utilizado (NAWAZ et al., 2020).

Atualmente, praticamente todas as linhas de produção das mais diversas áreas industriais utilizam processos de extração (maceração, extração com solvente, hidrodestilação, etc.), entre as atividades industriais estão: nutracêutica, farmacêutica, cosmética, alimentícia, entre outras (CHEMAT et al., 2017).

Para que um método de extração seja considerado ideal, é necessário que apresente rendimento elevado, sem degradação dos compostos extraídos e o extrato precisa ser facilmente separado do solvente usado (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

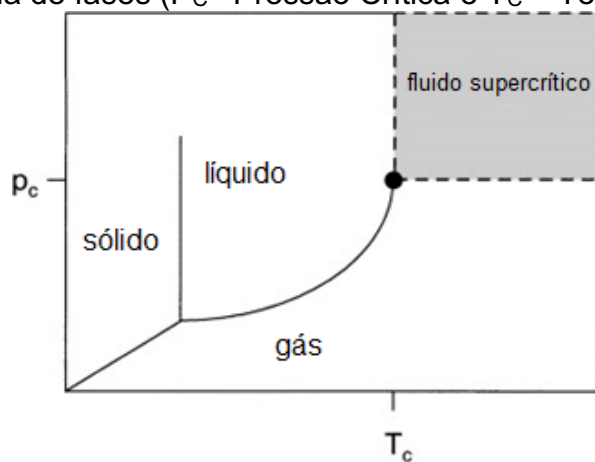
Técnicas convencionais de extração como soxhlet, extração sólido-líquido e extração líquido-líquido não são as mais adequadas para obtenção de compostos bioativos, pois eles geralmente são sensíveis, termolábeis e encontrados em baixas concentrações (MUSTAFA; TURNER, 2011). Os métodos convencionais de extração apresentam baixa eficiência e necessitam de longos tempos de extração, sendo inadequados para alguns processos, pois muitos produtos naturais podem ser degradados durante as extrações com altas temperaturas e longos períodos (PÉRES et al., 2006).

O uso de compostos ativos nos mais diversos setores industriais, tais como alimentício, farmacêutico e químico demonstra a necessidade de utilização de métodos de extração adequados para obtenção de compostos ativos de plantas (AZMIR et al., 2013). Dessa forma, a utilização de métodos de extração que não apresentem as desvantagens dos métodos convencionais é cada vez mais importante. Alguns exemplos de novos métodos de extração são: extração com fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom e extração com líquido pressurizado.

2.2.1 Extração com Fluido Supercrítico

A extração supercrítica baseia-se no poder de solvatação de fluidos no estado supercrítico, ou seja, quando a pressão e a temperatura estão acima de seu ponto crítico (AZMIR et al., 2013). Na Figura 2.2 é possível visualizar o ponto crítico de um fluido em seu diagrama de fases.

Figura 2.2 - Diagrama de fases (P_c - Pressão Crítica e T_c – Temperatura Crítica)



Fonte: Adaptado de KNEZ *et al.*, 2013.

Acima do ponto crítico não é possível distinguir entre as fases líquida e gasosa. Nessas condições, o fluido não pode ser liquefeito aumentando a sua pressão isotermicamente ou diminuindo a temperatura isobaricamente (CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001). Na Tabela 2.1 são apresentadas as condições do ponto crítico de alguns solventes, sendo possível observar que o CO_2 apresenta uma temperatura crítica baixa, o que o torna interessante para extrações com risco menor de degradação térmica.

Tabela 2.1 - Pontos críticos de solventes utilizados em extrações supercríticas

Solvente	Temperatura Crítica - T_c (°C)	Pressão Crítica - P_c (bar)
Etano	32,3	48,7
Água	374,3	221,2
Etileno	9,4	50,4
Propileno	91,9	46,0
Propano	96,8	42,5
CO ₂	31,1	73,8

Fonte: Adaptado de CAVALCANTI; MEIRELES, 2012

Fluidos supercríticos apresentam propriedades de fluidos intermediárias entre gás e líquido (Tabela 2.2). A viscosidade de um fluido supercrítico é semelhante à viscosidade de um gás e a massa específica e o poder de solvatação são semelhantes às apresentadas por um líquido. A difusividade é intermediária aos dois estados. Outra característica interessante é que a massa específica pode ser facilmente modificada, pela mudança de temperatura e/ou pressão do sistema de extração (HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006).

Tabela 2.2 – Faixa de valores aproximados de propriedades físico-químicas de líquidos, gases e fluidos supercríticos

Estado do fluido	Massa específica (ρ , g/cm ³)	Difusividade (D_{AB} , cm ² /s)	Viscosidade (μ , g/cm s)
Líquido P = 1 atm; T = 15-30 °C	1	<10 ⁻⁵	10 ⁻²
Gás P = 1 atm; T = 21 °C	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
Supercrítico P = P_c ; T = T_c	0,3 – 0,8	10 ⁻³ – 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ – 10 ⁻³

Fonte: Adaptado de HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006

A extração com fluido supercrítico ocorre basicamente em duas etapas, sendo que na primeira delas, o solvente passa através do leito empacotado, solubilizando os compostos presentes na matriz. Na segunda etapa, o solvente presente no leito de extração transporta os compostos solubilizados nele para fora do

sistema de extração e com a diminuição da temperatura e pressão o solvente é separado do extrato (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

A extração com fluido supercrítico (EFS) é uma técnica ambientalmente amigável, pois não oferece riscos à saúde humana e não apresenta os inconvenientes das técnicas convencionais de extração, como uso de solventes tóxicos e de difícil remoção e longos períodos de extração, sendo assim, a EFS é uma das técnicas mais promissoras para obtenção de compostos bioativos (FARIAS-CAMPOMANES; MEIRELES, 2013).

Um sistema básico de extração com fluido supercrítico é composto por algumas partes como: recipiente de armazenamento de solvente (geralmente um cilindro de CO₂), uma bomba de pressurização do fluido, um leito de extração com um sistema de aquecimento e controle de temperatura, sistema de controle de pressão e vazão (válvulas, controladores e instrumentos de medição) e um recipiente de coleta de extrato (AZMIR et al., 2013).

2.2.1.1 Dióxido de carbono supercrítico

O dióxido de carbono (CO₂) é um dos solventes mais utilizados na extração com fluido supercrítico, pois apresenta moderada temperatura crítica (31 °C), o que é importante na extração de compostos bioativos e os extratos são preservados do contato com o ar e luz, devido à configuração dos módulos de extração, evitando que ocorram processos de oxidação (BARBOSA et al., 2014).

Outra vantagem do uso do dióxido de carbono é que por ser um gás em condição ambiente, ele é facilmente separado dos extratos ao fim da extração, simplesmente pela despressurização do sistema. Em escala industrial, o CO₂ utilizado nos processos de extração pode ser reciclado e reutilizado em outras extrações, reduzindo os custos e diminuindo a geração de resíduos (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

Devido à baixa polaridade do CO₂, ele é mais eficiente na extração de compostos apolares, entretanto, essa limitação pode ser superada adicionando-se um cossolvente polar (água, etanol, dentre outros.), que promove um aumento na

quantidade de compostos polares extraídos (FARIAS-CAMPOMANES; MEIRELES, 2013).

2.2.1.2 Modelagem matemática do processo de extração supercrítica

A modelagem matemática dos processos de extração com fluido supercrítico é muito importante para estudos de otimização, viabilidade econômica e aumento de escala (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014). Para uma descrição matemática apropriada dos processos de extração com fluido supercrítico é essencial o conhecimento dos mecanismos de transferência de massa do processo de extração e uma representação matemática adequada (HUANG; SHI; JIANG, 2012).

Os modelos matemáticos utilizados para descrever processos de extração podem ser classificados em empíricos, baseados em analogia entre transferência de calor e massa, e aqueles por balanço de massa diferencial ou integral (REVERCHON; MARCO, 2006).

Nos modelos empíricos, os resultados são descritos por expressões matemáticas simples, fornecendo soluções fáceis e rápidas. Diversos modelos empíricos podem ser encontrados na literatura, sendo que estes geralmente são construídos em função da concentração inicial de soluto na matriz e envolvem um parâmetro ajustável, não permitindo interpretação física do processo, entretanto fornecem ajustes confiáveis (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014). As aproximações empíricas podem ser usadas quando faltam informações relacionadas ao mecanismo que rege o fenômeno de transferência de massa e de equilíbrio. Entretanto, como os modelos empíricos não descrevem os processos fenomenológicos de transferência de massa, não são adequados para um aumento de escala de um processo experimental para industrial (HUANG; SHI; JIANG, 2012).

Os modelos baseados em analogia entre transferência de calor e de massa, e os baseados em balanço de massa diferencial ou integral podem ser incluídos em um único grupo de modelos fenomenológicos (SOVOVÁ, 2012). Esses modelos descrevem matematicamente a cinética de extração a partir de equações que definem a concentração de soluto no extrator em função do tempo e de

coordenadas espaciais. Esses modelos geralmente não são preditivos e alguns parâmetros podem ser estimados a partir de correlações encontradas na literatura, mas ao menos um parâmetro precisa ser ajustado por dados experimentais (SOVOVÁ; STATEVA, 2011).

Alguns modelos são muito utilizados na modelagem matemática dos processos de extração supercrítica, entre eles: Modelo de dessorção de primeira ordem (TAN; LIOU, 1989); Modelo de células quebradas e intactas (SOVOVÁ, 1994); Modelo de núcleo retrátil (GOTO; ROY; HIROSE, 1996) e modelo híbrido entre o modelo de células quebradas e intactas e o modelo de núcleo retrátil (FIORI; BASSO; COSTA, 2009).

2.2.1.2.1 Modelo de Naik

A equação do modelo empírico proposto por NAIK; LENTZ; MAHESHWARI (1989) é usada para descrever dados experimentais de cinéticas de extração supercrítica sem levar em conta a interação entre o soluto e a matriz sólida e representa o rendimento em função do tempo de extração nos termos de uma isoterma de adsorção de Langmuir.

$$y = \frac{y_0 t}{b + t} \quad (2.1)$$

Em que:

y é a massa de soluto extraída (g extrato/g matriz vegetal) no tempo t ;

y_0 é a concentração inicial de soluto na matriz sólida (g extrato)

Os parâmetros ajustáveis do modelo são y_0 (g extrato) e b (min^{-1}).

2.2.1.2.2 Modelo de Barton

O modelo desenvolvido por BARTON; HUGHES; HUSSEIN (1992) assume que a extração com fluido supercrítico de óleo resinas segue um modelo de reação química de primeira ordem. Esse modelo utiliza uma constante cinética em vez de parâmetros de equilíbrio ou de transferência de massa (CHÁFER; BERNA, 2014). Nesse modelo, a taxa de extração é proporcional à concentração de extrato restante na partícula vegetal (c_s), onde b é a taxa constante.

$$c_s = c_{s0}e^{-bt} \quad (2.2)$$

Baseado na condição inicial $t = 0$, $c_s = c_{s0}$, a expressão a seguir (denominada como modelo de Barton) pode ser obtida por integração. Assim, o rendimento global da extração pode ser expresso como:

$$y = y_0(1 - e^{-bt}) \quad (2.3)$$

Em que:

y é a massa de soluto extraída (g extrato/g matriz vegetal) no tempo t ;

y_0 é a concentração inicial de soluto na matriz sólida (g extrato)

Os parâmetros ajustáveis do modelo são y_0 (g extrato) e b (min^{-1}).

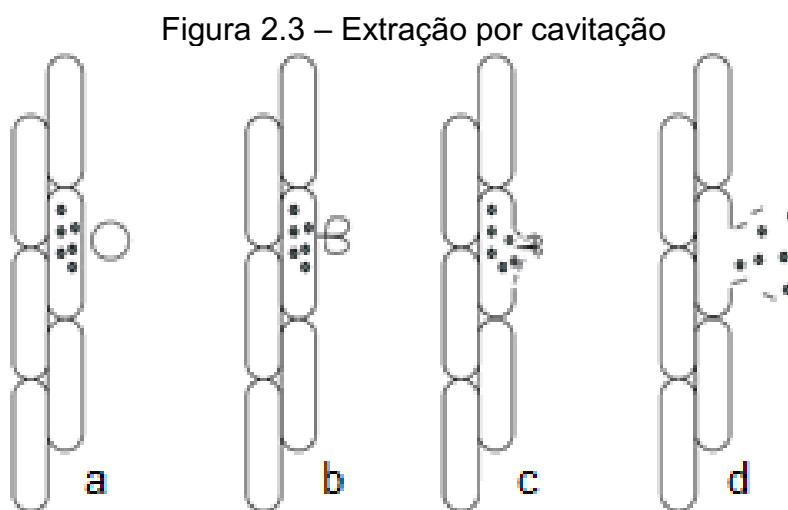
2.2.2 Extração Assistida por Ultrassom

A técnica de extração com uso de ultrassom é considerada uma tecnologia “verde” de extração, pois pode ser completada em poucos minutos, com alta reprodutibilidade, consumo reduzido de solvente e facilidade de execução (CHEMAT et al., 2017).

Ultrassom é um tipo de onda sonora, inaudível pelo sistema auditivo humano, geralmente com frequências entre 20 kHz e 10 MHz. Essas ondas passam através do meio, criando compressão e expansão, gerando um processo conhecido como cavitação, no qual bolhas são produzidas, crescem e sofrem colapso (AZMIR et al., 2013).

A implosão das bolhas de cavitação gera um microjato que quando atinge a superfície da matriz vegetal causa descamação superficial, erosão e diminuição do tamanho das partículas. Além disso, a implosão das bolhas de cavitação ainda causam macroturbulências e micromisturas (CHEMAT et al., 2017).

Na Figura 2.3 são demonstradas as etapas do processo de extração por cavitação, sendo eles: geração de bolha próxima à superfície do sólido (a), ciclo de compressão e colapso (b), projeção do microjato em direção à superfície (b e c) e a destruição da parede celular da matriz vegetal, liberando o conteúdo (d).

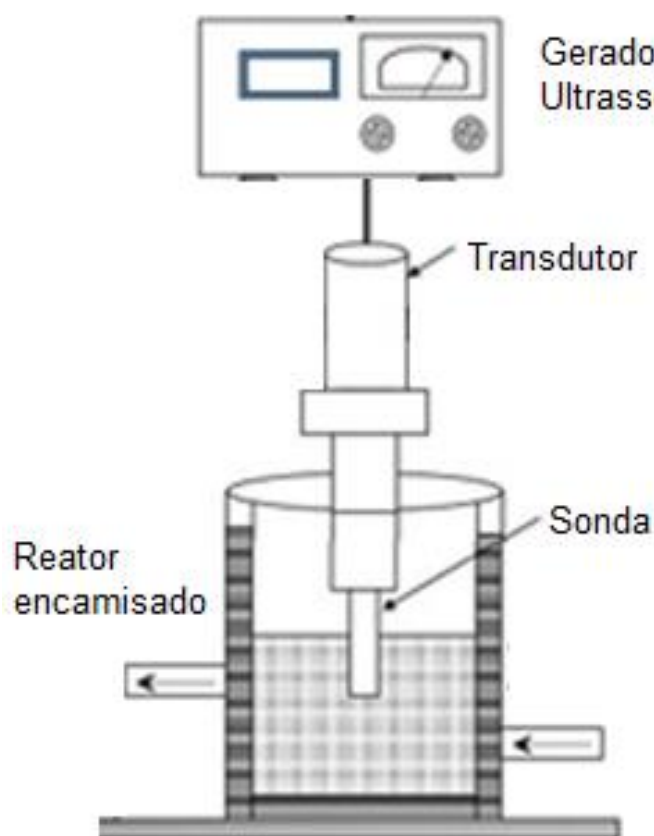


Fonte: CHEMAT et al., 2011.

Os fatores mais importantes no processo de extração assistida por ultrassom são temperatura, pressão, frequência e tempo de sonicação. Outros fatores que também influenciam no processo são tamanho de partícula, tipo de solvente e umidade da amostra (AZMIR et al., 2013). Shirsath et al. (2012) citam ainda que a razão entre massa de amostra e volume de solvente, além da polaridade do solvente influenciam na extração.

Extrações assistidas por ultrassom podem ser realizadas basicamente em dois tipos de equipamentos: banho ultrassônico e tipo sonda. Ambos utilizam transdutores para gerar a potência de ultrassom. O sistema que utiliza sonda é mais potente e apresenta maior reprodutibilidade, visto que no equipamento de banho ultrassônico a intensidade do ultrassom é atenuada pela água do banho. No sistema com sonda existe menor perda de energia ultrassônica, pois a sonda é imersa diretamente no solvente de extração (CHEMAT et al., 2017). O equipamento que utiliza sonda é esquematizado na Figura 2.4.

Figura 2.4 - Esquema do sistema de extração por ultrassom de sonda



Fonte: Adaptado de DANLAMI et al., 2014.

Normalmente as extrações são realizadas utilizando equipamentos com frequências próximas a 20 kHz, potências entre 100 e 800 Watts, tempo de extração entre 120 segundos e 1 hora, faixas de temperatura que variam entre 20 e 80 °C, sendo mais comum entre 30 e 40 °C. Os solventes podem ser escolhidos de acordo com o tipo de composto que se pretende extrair, a água extrai preferencialmente

compostos polares como carboidratos e aminoácidos e os solventes apolares extraem preferencialmente compostos aromáticos, por exemplo (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

2.2.2.1 Modelagem matemática do processo de extração assistida por ultrassom

O processo de extração assistida por ultrassom pode ser modelado utilizando-se alguns modelos matemáticos. Um exemplo deles é o modelo fenomenológico, que envolve dois processos principais, sendo o primeiro deles a dissolução dos compostos bioativos solúveis localizados na superfície ou próximo da superfície das partículas da matriz vegetal, no segundo a transferência de massa dos compostos bioativos solúveis das partículas vegetais para a solução por difusão ou processos de osmose (MILIĆ et al., 2013).

Outros modelos são encontrados na literatura e baseiam-se em outras características do processo para representar matematicamente a cinética de extração. O modelo de Weibull é utilizado para analisar o processo de transferência de massa durante os processos de extração convencional e assistida por ultrassom de compostos bioativos (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2015). Ou ainda, a modelagem pode ser realizada utilizando-se modelos termodinâmicos para descrever o processo de extração assistida por ultrassom (ORPHANIDES; GOULAS; GEKAS, 2014).

2.2.3 Extração com líquido pressurizado (ELP)

Extração com líquido pressurizado (ELP) é uma técnica que utiliza solventes em elevadas temperaturas e pressões, melhorando o processo de extração quando comparado com técnicas convencionais de extração realizadas próximas da temperatura ambiente e pressão atmosférica (ERDOGAN et al., 2011).

Essa técnica utiliza solventes líquidos pressurizados a altas temperaturas, mas abaixo do seu ponto crítico, e tem recebido diversos nomes como: extração com líquido pressurizado (*pressurized liquid extraction – PLE*), extração com fluido pressurizado (*pressurized fluid extraction – PFL*), extração com solvente quente

pressurizado (*pressurized hot solvent extraction – PHSE*), extração com solvente em alta pressão (*high-pressure solvent extraction – HPSE*), extração acelerada com solvente (*accelerated solvent extraction – ASE*) e extração com solvente subcrítico (*subcritical solvent extraction – SSE*) (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005).

Considerando o crescimento do interesse na extração de compostos bioativos de plantas e ervas e o consenso na utilização de tecnologias “verdes”, a extração com líquido pressurizado surge como uma tecnologia promissora para cumprir essas demandas. É uma boa substituta para os métodos convencionais de extração, pois usa temperatura e pressão elevadas para aumentar a eficiência da extração e reduzir o consumo de solvente e tempo de extração. A configuração dos equipamentos de extração com líquido pressurizado promove uma proteção contra luz e oxigênio o que melhora a extração de compostos sensíveis a estes fatores (MUSTAFA; TURNER, 2011).

A extração com líquido pressurizado é realizada geralmente em temperatura elevadas (40 - 200 °C) e pressões de moderadas a altas (35 – 200 bar). Nessas condições, os solventes utilizados sofrem um aumento no coeficiente de difusão, sendo assim, a taxa de extração é aumentada e o volume de solventes orgânicos necessário para completar a extração é reduzido (TURNER; WALDEBÄCK, 2013). Além da redução da quantidade de solventes utilizada, outras características como tempo de extração reduzido e proteção dos compostos contra exposição à luz e oxigênio, dão a essa técnica vantagens em relação aos métodos convencionas de extração (OSORIO-TOBÓN et al., 2013). A eficiência da ELP depende da natureza da matriz, do analito a ser extraído e da localização do analito dentro da matriz vegetal (MUSTAFA; TURNER, 2011).

A extração dos solutos ocorre em algumas etapas, tais como: os compostos são desorvidos do interior da matriz, então eles são difundidos através da parte orgânica da matriz para poder alcançar a interface matriz/fluido. Nessa etapa os compostos se distribuem na fase de extração, em seguida, difunde-se através da fase de extração que está presente dentro dos poros, posteriormente, atinge a parte da fase de extração que é regida por convecção. A fase final do processo de extração é a coleta do extrato (TURNER; WALDEBÄCK, 2013).

Os equipamentos de ELP podem ser operados em duas configurações diferentes: estático e dinâmico. No modo estático, a extração consiste em um ou mais ciclos de extração com substituição de solvente entre os ciclos. O solvente é pressurizado dentro do leito de extração e a válvula de saída é mantida fechada (normalmente entre 5 e 10 minutos). Depois da extração, a válvula de saída é aberta, liberando a saída da mistura extrato + solvente. No modo dinâmico, o solvente é bombeado continuamente para dentro do leito de extração e a válvula de saída é mantida aberta durante a extração (TURNER; WALDEBÄCK, 2013).

No modo estático, os fatores críticos são temperatura e tempo de extração. A eficiência da extração depende da solubilidade do analito no solvente utilizado (MUSTAFA; TURNER, 2011). No modo dinâmico de extração, evita-se a saturação do solvente, pois o solvente puro é continuamente bombeado para dentro da célula de extração. Contudo, maior eficiência é obtida no modo de extração estático, pois ele permite maior penetração do solvente nos micro e nano poros da matriz (OSORIO-TOBÓN et al., 2013).

Alguns fatores podem influenciar na eficiência do processo de extração, como temperatura e pressão da extração, modo de extração (estático ou dinâmico) e mistura de solventes e aditivos (sendo que usando uma mistura de solventes é possível aumentar a eficiência da extração) (MUSTAFA; TURNER, 2011). A *performance* do processo é governada pelos fatores em ordem de importância: tipo de solvente, temperatura, tempo de extração e pressão, sendo pressão o fator menos importante, pois líquidos são fluidos incompressíveis (OSORIO-TOBÓN et al., 2013).

Para escolher adequadamente o solvente, é necessário planejar quais tipos de compostos deseja-se extrair, sendo que o uso de solventes apolares facilita a extração de compostos apolares, enquanto que solventes polares são mais indicados para extração de compostos polares. O solvente precisa ter as propriedades químicas adequadas para dissolver e dissolver os compostos de interesse, preferencialmente sem solubilizar outros compostos presentes na amostra (TURNER; WALDEBÄCK, 2013).

Os solventes mais utilizados nas ELP são etanol, metanol e n-hexano. Água também pode ser utilizada, sendo que em elevadas temperaturas e moderadas pressões, ela pode ter sua polaridade reduzida consideravelmente, atuando

semelhantemente ao etanol ou à acetona nas extrações (OSORIO-TOBÓN et al., 2013).

A temperatura de extração é um dos fatores críticos sobre a eficiência e a seletividade do processo de extração com líquido pressurizado. O uso de temperaturas elevadas favorece a eficiência do processo, pois aumenta os coeficientes de difusão, aumentando as taxas de transferência de massa. Além disso, auxilia na ruptura das interações entre matriz e compostos causada pelas forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e atração dipolo. Temperaturas elevadas diminuem a viscosidade do solvente líquido, facilitando a penetração na partícula da matriz vegetal, melhorando o processo de extração (OSORIO-TOBÓN et al., 2013).

A maior vantagem da aplicação de pressão durante os processos de extração é que permite que sejam utilizadas temperatura acima do ponto de ebulição dos solventes, mantendo-os no estado líquido. O aumento da pressão, bem como da temperatura, reduz a tensão superficial do solvente, facilitando o acesso do solvente para dentro dos poros das partículas, aumentando o contato com os solutos e melhorando a extração deles. O uso de pressão na extração pode resultar ainda na ruptura da matriz, facilitando a transferência de massa do soluto para o solvente (PÉRES et al., 2006).

O tamanho das partículas exerce importante influência sobre o processo, sendo que partículas menores geram maior percentagem de compostos extraíveis, permitindo maior recuperação de compostos bioativos. Além disso, a redução do tamanho das partículas aumenta a área específica e causa o rompimento das paredes celulares, facilitando ainda mais a liberação de compostos bioativos (OSORIO-TOBÓN et al., 2013).

A secagem da matriz antes de ser utilizada na extração é uma etapa muito importante a ser realizada, pois a umidade diminui a eficiência da extração, principalmente quando solventes apolares são utilizados. Ao utilizar solventes polares (metanol, acetonitrila, etc.) ou misturas de solventes (hexano/acetonitrila, hexano/acetona, etc.) as extrações podem ser realizadas em amostras com umidade (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005).

2.3 Extratos vegetais

Muitas fontes naturais são utilizadas para obtenção de diversos compostos bioativos com muitas aplicações, tais como: antibacteriano, antifúngico, antitumoral, anti-inflamatório, inseticida, antioxidante, antiviral, entre outras. A qualidade dos extratos depende de muitos fatores, como temperatura e tempo de extração, método de extração empregado e tipo de solvente utilizado (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

2.3.1 Terpenos

Os terpenos são formados por um grande conjunto de metabólitos vegetais, responsáveis por processos de interação entre plantas e o meio ambiente (PADOVAN et al., 2013). Eles podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono que possuem. Podem ser hemiterpenos (5 carbonos), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), triterpenos (30 C) e tetraterpenos (40 C), que são gerados a partir de diversas formas nas plantas, utilizando diferentes substratos e enzimas para sua biossíntese (KESZEI; BRUBAKER; FOLEY, 2008).

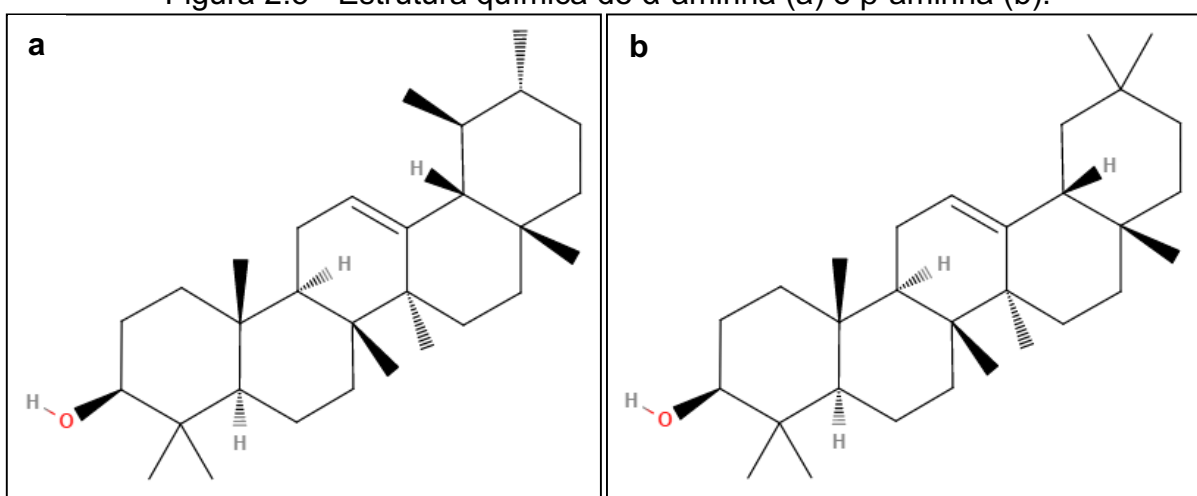
Os triterpenos formam uma das maiores e mais diversificadas classes de produtos naturais de origem vegetal. Possuem muitas aplicações em diversos setores da indústria, como alimentícia, biotecnológica e de medicamentos (THIMMAPPA et al., 2014). Nesta classe, além de diversos outros compostos, encontram-se os triterpenos pentacíclicos α -amirina e β -amirina. As amirinas são geralmente encontradas em plantas medicinais e óleo-resinas de cascas de algumas espécies de árvores. Sendo que são estudadas *in vivo* e *in vitro*, devidos às suas propriedades químicas e farmacológicas (VÁZQUEZ; PALAZON; NAVARRO-OCANÃ, 2012).

2.3.1.1 α -Amirina e β -Amirina

A α -amirina (Urs-12-en-3 β -ol) e a β -amirina (Olean-12-en-3 β -ol) são compostas por 30 carbonos, tendo como fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$, apresentando

faixa de temperatura de fusão entre 184 e 186 °C para α -amirina e entre 189 e 191 °C para a β -amirina (VÁZQUEZ; PALAZON; NAVARRO-OCANÃ, 2012). α -amirina e β -amirina são isômeros estruturais, tendo como esqueleto base diferentes subgrupos de triterpenóides pentacíclicos, sendo ursano a α -amirina e oleano a β -amirina. A diferença na estrutura está na posição do grupo metil ou no C-19 (α -amirina) ou C-20 (β -amirina) (HALDAR *et al.*, 2014). As estruturas químicas da α -amirina e da β -amirina são apresentadas na Figura 2.5.

Figura 2.5 - Estrutura química de α -amirina (a) e β -amirina (b).



Amirinas são encontradas em algumas plantas como *Hylocereus polyrhizus* - Pitaya (LUO *et al.*, 2014) *Moldenhawera nutans*, *Calotropis gigantea* (WAGH; GUJAR; GAIKAR, 2012), *Ouratea castaneifolia* (DO NASCIMENTO *et al.*, 2009), *Sideritis candicans* Ait - Selvageira (HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2004) e *Protium hepthaphyllum* - Almecegueira (VIEIRA JÚNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005). Podendo ser obtidas a partir de diversas partes das plantas, como cascas, folhas, madeira e resinas. Sendo necessário um pré-tratamento para isolar esses compostos, entre outros processos, pode-se destacar a secagem, extração com solventes variados (hexano, clorofórmio, diclorometano e metanol), derivatização e separação por métodos cromatográficos (VÁZQUEZ; PALAZON; NAVARRO-OCANÃ, 2012). A Tabela 2.3 apresenta resultados reportados na literatura e neste estudo, no que diz respeito à massa de amirinas por massa de matéria-prima utilizada.

Tabela 2.3 - Resultados de algumas quantificações de amirinas (α e β) encontradas na literatura (g kg^{-1})

Planta	α -amirina	β -amirina	α/β -amirina	Referência
<i>Protium sp</i> (resina)	3,1	1,7	4,8	(DIAS <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ficus carica</i> (látex)		1,2		(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Canarium sp</i> (resina)	2,4	1,1	3,5	(HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ <i>et al.</i> , 2010)
<i>Vitex agnus</i> (fruta)		0,63		(COSSUTA <i>et al.</i> , 2008)
<i>Eugenia pyriformis</i> (EFS - folhas)	2,49	8,91	11,40	(KLEIN, 2016)
<i>Eugenia pyriformis</i> (EAU - folhas)	2,41	9,71	12,13	(KLEIN, 2016)
<i>Eugenia pyriformis</i> (EFS - folhas)	2,27	8,22	10,49	(Neste estudo)

Os triterpenos α -amirina e β -amirina e seus derivados, estão sendo amplamente estudados nos últimos anos, com potencial para as mais variadas aplicações biológicas e farmacológicas, como:

- Citotóxica: derivados de α -amirina e β -amirina apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais humanas de leucemia promielocítica, sendo que esses compostos induziram morte dessa linhagem celular por apoptose (BARROS *et al.*, 2011).
- Indutora de sono: β -amirina foi capaz de aumentar o tempo total de sono em testes realizados com ratos, mostrando-se uma boa alternativa para tratamento de insônia com disfunção cognitiva (JEON *et al.*, 2015).
- Gastroprotetora: α -amirina e β -amirina isoladas da resina de *Protium heptaphyllum* demonstraram potencial gastroprotetor em ratos, ao reduzir os danos causados por etanol na mucosa estomacal (OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

- Antidepressiva: A mistura de α -amirina e β -amirina isoladas a partir de resina de *Protium heptaphyllum*, apresenta efeitos sedativos, ansiolíticos e antidepressivos em ratos (ARAGÃO *et al.*, 2006).
- Induz angiogênese: a β -amirina induz a angiogênese (crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes) em células endoteliais vasculares. Sendo assim, a β -amirina pode se tornar um novo agente terapêutico para doenças vasculares isquêmicas (ISHII *et al.*, 2015).
- Inseticida: β -amirina isolada de extratos metanólicos de *Sarcostemma acidum* demonstrou atividade de regulação de crescimento e antialimentar de contra a lagarta do tabaco (*Spodoptera litura*), atuando no aumento da duração dos períodos larval e pupal, ocasionando a mortalidade (KANNAN *et al.*, 2013).
- Antinociceptiva: α -amirina e β -amirina isoladas da resina de *Protium heptaphyllum* mostraram-se promissoras em atenuar a dor orofacial induzida em ratos Wistar, demonstrando potencial terapêutico para dores faciais e distúrbios dentários (HOLANDA PINTO *et al.*, 2008). Alguns derivados sintéticos de α -amirina e β -amirina também demonstraram uma atividade antinociceptiva muito boa no modelo de dor induzida por ácido acético em camundongos, sendo que as doses necessárias para reduzir a dor não causaram alterações comportamentais nas cobaias (SOLDI *et al.*, 2008). A mistura de α -amirina e β -amirina apresentou atividade antinociceptiva quando administradas por via sistêmica e avaliadas em modelos de dor persistente de origem inflamatória e neuropática em ratos, demonstrando-se compostos com potencial para utilização no alívio da dor (SIMÃO DA SILVA *et al.*, 2011).
- Antihiperglicêmico: derivados sintéticos de α -amirina demonstraram capacidade de reduzir os níveis de glicose no sangue de ratos diabéticos (NARENDER *et al.*, 2009).
- Hipocolesterolêmico: α -amirina e β -amirina reduziram os níveis de colesterol VLDL e LDL e elevaram os de HDL em ratos alimentados com um alto teor de gordura, possibilitando que a mistura seja estudada para o desenvolvimento de medicamentos para arteroesclerose (SANTOS *et al.*, 2012).
- Antiprurigenoso: α -amirina e β -amirina reduziram significativamente a coceira induzida em ratos, demonstrando a possível utilização desses compostos no tratamento de prurido (coceira) associada à dermatite atópica e dermatite de contato (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

- Antioxidante: β -amirina mostrou-se eficaz na eliminação de radicais livres em testes *in vitro* e *in vivo*. Podendo assim, ser útil na prevenção e retardamento do progresso de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo (SUNIL et al., 2014). A α -amirina obtida a partir do extrato alcoólico de casca de *Alstonia scholaris* Linn, apresentou-se como um potencial modulador contra o estresse oxidativo hepático em ratos Wistar, possibilitando o uso da α -amirina no desenvolvimento de fármacos contra danos hepáticos (SINGH et al., 2015).
- Antimicrobiana: derivados de α -amirina e β -amirina mostraram significativa atividade antifúngica contra *Candida albicans*, podendo possivelmente ser utilizados no desenvolvimento de tratamentos tópicos de candidíase oral (JOHANN et al., 2007). Amirinas e alguns de seus derivados mostraram-se capazes de inibir o crescimento bacteriano cariogênico, sendo promissores na prevenção de cáries (DÍAZ-RUIZ et al., 2012). A β -amirina isolada a partir da alga *Laurencia microcladia* apresentou forte atividade antibacteriana, possuindo potencial para utilização em muitas áreas médicas (ABDEL-RAOUF et al., 2013).
- Antiagregante plaquetário: β -amirina isolada a partir de extratos de *Ardisia elliptica*, foi seis vezes mais potente que o ácido acetilsalicílico na inibição da agregação plaquetária em sangue de coelhos (CHING et al., 2010).
- Anti-inflamatória: a mistura de α -amirina e β -amirina apresenta potencial de interesse terapêutico para o tratamento de doença inflamatória intestinal, por ter apresentado resultados satisfatórios em testes de colite induzida em ratos (MATOS et al., 2013).

2.4 Considerações sobre a revisão

A revisão da literatura mostra que a uvaia é uma espécie frutífera nativa brasileira e que aparece como potencial fonte de compostos bioativos, que podem ser obtidos a partir da utilização de técnicas não convencionais de extração. Essas técnicas apresentam vantagens em relação aos métodos convencionais de extração, sendo menos prejudiciais para o meio ambiente e para a saúde humana, além de necessitar menor consumo de solventes. Os extratos obtidos com essas técnicas a partir das folhas de uvaia apresentam os compostos α -amirina e β -amirina, sendo que

esses compostos, obtidos de outras fontes vegetais, estão sendo muito estudados nos últimos anos visando encontrar possíveis utilizações, principalmente no tratamento de diversas doenças.

Sendo assim, este estudo vem preencher uma lacuna na literatura no que diz respeito à utilização de técnicas não convencionais de extração para obtenção de extratos ricos em compostos bioativos (nesse caso a α -amirina e a β -amirina). Além disso, visa à procura pelas melhores condições operacionais de cada técnica de extração, além da busca por uma metodologia eficiente no isolamento/purificação dos compostos de interesse presentes nos extratos obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo apresentam-se os materiais utilizados para o desenvolvimento do estudo, as metodologias empregadas na preparação da matéria-prima vegetal, nos processos de obtenção de extratos, modelagem matemática dos processos de extração, determinação da composição química dos extratos, quantificação de α -amirina e β -amirina, isolamento e purificação das amirinas, determinação de capacidade antioxidante, e perfil de bioatividade.

Os experimentos realizados no presente estudo foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Ambiental e Laboratório de Engenharia e Processos Ambientais (LEA/LEPA), da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, sob a coordenação das Prof^{as} Meuris Gurgel Carlos da Silva e Melissa Gurgel Adeodato Vieira, além de diversos laboratórios parceiros do grupo de pesquisa. As parcerias foram realizadas com os seguintes laboratórios:

- Laboratório de Processos de Separação (LPS) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Toledo. Sob a responsabilidade do Prof. Edson Antônio da Silva;
- Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Vegetais (LASEFI) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, sob a responsabilidade da Prof^a. Maria Angela Meireles;
- Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp;
- Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Desenvolvimento de Medicamentos e Farmacologia de Universidade de Copenhague, sob coordenação do Prof. Dan Staerk - Dinamarca.

3.1 Preparo da matriz vegetal para extração

Para as extrações foram utilizadas folhas coletadas no município de Marechal Cândido Rondon – PR, em árvores já identificadas e com confirmação

botânica da espécie. A coleta foi realizada nas coordenadas: 24°34'20,71"S 54°03'19,1"W.

As folhas foram secas em estufa com circulação/renovação de ar a 40 °C por 24 horas. Após secagem, as folhas foram trituradas e as partículas resultantes classificadas por peneiramento, utilizando-se uma série de peneiras MESH/TYLER a fim de garantir a homogeneidade do material que foi utilizado nas extrações. Cada classe granulométrica foi separada e as amostras armazenadas sob refrigeração a -15 °C.

3.2 Determinação da umidade do material vegetal

Após secagem e moagem, a umidade foi determinada pelo método gravimétrico, sendo que aproximadamente 2 gramas de folhas de uvaia, pesadas em balança analítica (AUX220 – Shimadzu), foram acondicionadas em placa de petri, devidamente tarada, e levadas a estufa a 105 °C até se obter massa constante. Após, foram retiradas da estufa e transferidas para dessecador contendo sílica gel para resfriamento até temperatura ambiente, sendo pesadas novamente. O percentual de umidade foi calculado pela diferença entre a massa antes e após o procedimento. A análise foi realizada em triplicata.

3.3 Caracterização do material vegetal

O material vegetal triturado foi caracterizado também por picnometria a gás Hélio utilizando-se o equipamento AccuPyc II 1340 (MICROMERITICS) para determinação da densidade real da matriz vegetal.

O material vegetal foi caracterizado morfológicamente utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), antes e após as extrações com cada método de extração utilizado. As amostras foram preparadas realizando-se um recobrimento metálico com ouro utilizando-se o equipamento Sputter Coater EMITECH, Modelo: K450. Para obtenção das micrografias, utilizou-se um microscópio

eletrônico de varredura modelo Leo 440i (LEO Electron Microscopy) com tensão de aceleração igual a 15 kV e corrente do feixe igual a 50 pA.

O material particulado utilizado nas extrações foi caracterizado quanto ao seu tamanho de partícula utilizando-se um analisador de tamanho de partículas por Difração à Laser modelo MASTERSIZER-3000 (Malvern Instruments). As medidas foram feitas no modo Via Seca com o módulo AERO S, utilizando alimentação de 50% e aspiração de 2,0 bar. Essa análise utiliza o modelo matemático de Mie, que considera que as partículas são esféricas e que não são opacas, desta forma leva em conta a difração e difusão da luz na partícula e no meio.

3.4 Métodos Convencionais de extração

3.4.1 Extração por maceração

Nas extrações por maceração com os solventes metanol, etanol, acetato de etila e hexano, o material vegetal (aproximadamente 3 gramas) foi colocado em contato com o solvente (50 mL) em erlenmeyers fechados numa mesa agitadora orbital e mantidos sob agitação constante (100 rpm) e temperatura controlada (60 °C) por 60 minutos, estas condições foram escolhidas levando em consideração testes prévios. Após a extração foi realizada a filtração e em seguida os extratos foram concentrados em evaporador rotativo e transferidos para estufa (60 °C) para evaporação completa dos solventes. A evaporação transcorre até massa residual constante, a qual é utilizada para determinar a massa de extrato e o rendimento global. Os extratos secos foram armazenados a -15 °C sob ausência de luz para análises posteriores.

Foram avaliados os efeitos da temperatura e do tempo de extração sobre o rendimento global e a composição química dos extratos obtidos com hexano como solvente.

3.4.2 Extração com aparato Soxhlet

A extração via Soxhlet foi realizada utilizando hexano como solvente ($T_{\text{ebulição}} = 68,7\text{ }^{\circ}\text{C}$). O aparato consistiu de um condensador Allihn e de uma câmara de extração com sifão para saída do solvente contendo o extrato. O material vegetal (10 g) foi acondicionado em cartuchos fechados de papel filtro.

Na extração, o solvente (250 mL de hexano) foi acondicionado em balão de fundo redondo que foi aquecido por manta de aquecimento até a temperatura de ebulição do solvente. Após o início da ebulição, o solvente chega ao condensador e condensa na câmara de extração onde está o cartucho com o material vegetal, deixando o cartucho imerso no solvente. Ao atingir o nível máximo do sifão, o solvente retorna ao balão e reinicia o enchimento da câmara de extração. Este processo repete-se até a saturação do solvente com os compostos do material vegetal, neste estudo a extração foi realizada durante 6 horas.

Após a extração a mistura solvente/extrato foi concentrada em evaporador rotativo e transferida para estufa ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) para evaporação. A evaporação transcorreu até massa residual constante, a qual foi utilizada para determinar a massa de extrato e o rendimento global. Os extratos secos foram armazenados a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob ausência de luz para análises seguintes.

3.5 Extração com CO_2 Supercrítico

3.5.1 Extração com CO_2 supercrítico sem adição de cossolvente

Para avaliar o efeito das variáveis independentes, temperatura e pressão, na extração com CO_2 supercrítico, foi elaborado um planejamento experimental completo 2^2 com triplicata no ponto central, totalizando 7 ensaios. Os níveis de temperatura e pressão são apresentados na Tabela 3.1. As variáveis resposta analisadas no planejamento experimental foram o rendimento global das extrações e a massa dos compostos α e β -amirina obtida por massa de folhas utilizadas.

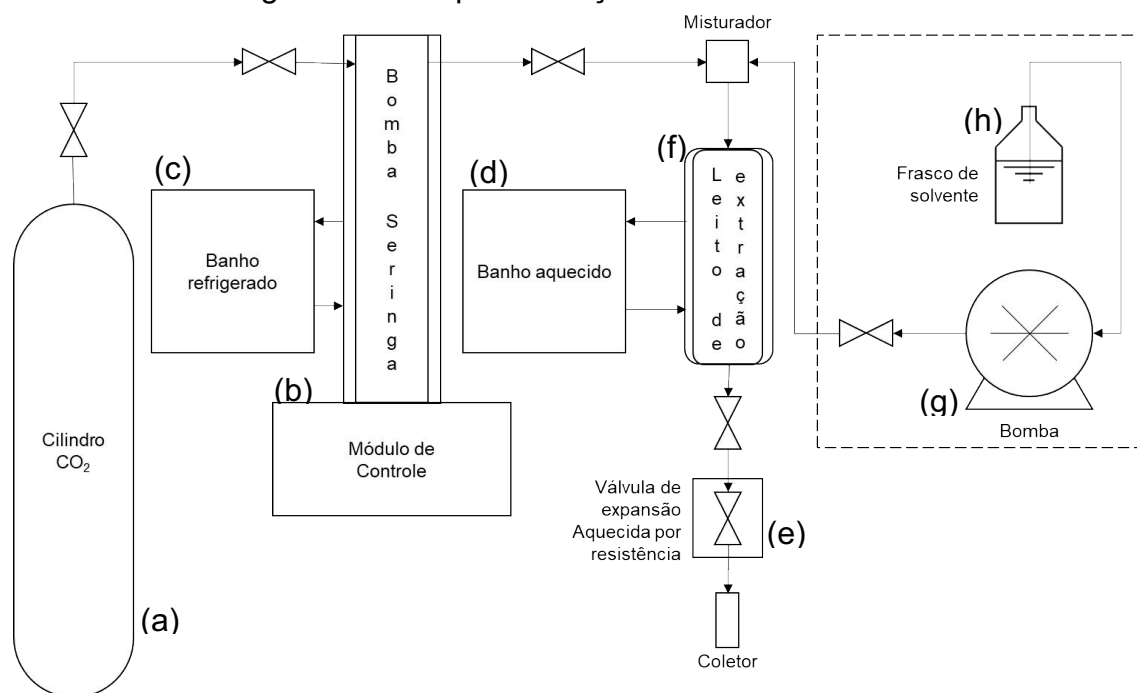
Tabela 3.1 - Planejamento experimental para EFS

Pressão (bar)	Temperatura (°C)
150 (-1)	60 (-1)
175 (0)	70 (0)
200 (+1)	80 (+1)

Nos experimentos do planejamento experimental a vazão de CO₂ foi mantida constante em $2,0 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$ e o diâmetro médio das partículas foi 0,602 mm. Na condição (temperatura e pressão) que apresentou os melhores resultados de extração empregando CO₂ supercrítico, foram realizados testes complementares para avaliar o efeito da vazão ($1,5 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$ e $2,5 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$), do tamanho de partícula (0,362 mm e 0,725 mm) e da adição de cossolventes na proporção de 5 e 15% m/m (etanol e acetato de etila) nas extrações. As condições experimentais utilizadas neste estudo foram escolhidas tendo como base os resultados obtidos no estudo anterior (KLEIN et al., 2018) e nos limites operacionais do equipamento.

Foi utilizado um módulo de extração supercrítica (sem cossolvente) apresentado na Figura 3.1, composto por: (a) Cilindro de armazenamento de CO₂, (b) Bomba Seringa modelo 500D (TELEDYNE ISCO); (c) banho termostático modelo FP-50 (Julabo) responsável pelo resfriamento do CO₂ bomba seringa; (d) banho termostático (MARCONI), responsável por aquecer o leito de extração; (e) termorregulador modelo MSC-04E (THOLZ), utilizado para manter a válvula micrométrica de expansão aquecida a 60 °C, evitando, assim, o congelamento; (f) leito cilíndrico encamisado de aço inox; (g) bomba de cossolvente; (h) frasco de armazenamento do solvente a ser usado como cossolvente. A parte destacada pela linha pontilhada é utilizada somente no experimentos com adição de cossolvente.

Figura 3.1 - Esquematização do módulo de EFS.



Fonte: Autoria própria

As dimensões da célula de extração, onde o leito empacotado é formado, são 1,91 cm de diâmetro interno e 16,8 cm de altura. A célula é abastecida completamente com as amostras em todos os experimentos (aproximadamente 14 gramas).

Após o resfriamento do CO₂ na bomba seringa, o mesmo é pressurizado até a condição escolhida para cada experimento, sendo em seguida bombeado para o leito de extração que já está na temperatura desejada.

Após a pressurização do leito com o CO₂, aguarda-se 15 minutos para estabilização do sistema (tempo de extração estática), para enfim iniciar-se a extração dinâmica com a abertura da válvula de expansão. A vazão do fluido é controlada utilizando-se a válvula micrométrica (expansão), verificando-se os valores informados no visor do controlador da bomba seringa.

Como na saída do extrator o CO₂ é submetido à pressão e temperatura ambiente, difunde-se para a atmosfera, separando-se do extrato que é coletado em um recipiente de vidro âmbar, previamente pesado em balança analítica modelo

AUX220 (Shimadzu). O frasco com o extrato é pesado em balança analítica a cada 10 minutos, até 180 minutos. Com os valores medidos da massa de extrato acumulada no recipiente são geradas as curvas da cinética de extração.

O rendimento global da extração foi calculado utilizando-se da equação 3.1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (3.1)$$

Em que m_{extrato} representa a massa total de extrato obtida ao final da extração e m_{amostra} representa a massa de folhas utilizada na extração desconsiderando-se a umidade, a fim de obter uma relação entre a massa de extrato e a massa de folhas secas. Os extratos foram armazenados a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob ausência de luz para análises posteriores.

3.5.2 Extração com CO_2 supercrítico com adição de cossolvente

As extrações realizadas com adição de cossolvente foram realizadas utilizando-se a unidade de extração com fluido supercrítico de escala laboratorial *MV-10 ASFE System* (Waters). Este sistema opera em modo semiautomático e utiliza vasos de extração de 25 mL. O vaso de extração é completado com aproximadamente 11,0 g de material vegetal. Após conectar o vaso de extração ao equipamento, o sistema é aquecido e pressurizado até as condições desejadas e mantido nessas condições por um período de extração estática de 15 minutos. Os rendimentos globais foram calculados de acordo com a equação 3.1 apresentada anteriormente.

Considerando que as extrações com adição de cossolvente foram realizadas com uma matéria-prima coletada em data diferente da anterior e utilizando um módulo de extração diferente do utilizado nas extrações com CO_2 puro e que estes resultados seriam utilizados para a elaboração de um artigo completo para periódico científico, novos testes foram realizados para complementar os dados experimentais e eliminar qualquer interferência causada pelo sistema utilizado. Sendo assim, foram avaliadas as pressões de 150, 200, 250 e 300 bar na temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ com CO_2 sem adição de cossolvente, pois o módulo utilizado nas extrações sem cossolvente

não permite a utilização de pressões superiores a 200 bar. A vazão utilizada foi $2,0 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$. As condições experimentais foram escolhidas de forma a garantir uma ampla variação dos valores avaliados, respeitando as limitações operacionais do equipamento utilizado.

Na condição de melhor pressão (200 bar), foram avaliados os efeitos da adição de dois diferentes cossolventes (acetato de etila e etanol) em duas diferentes proporções (5 e 15% m/m). Após o término das extrações, os solventes foram removidos em estufa a 60 °C por 24 horas. Somente então, a massa de extrato foi obtida por pesagem e utilizada nos cálculos de rendimento. Os extratos secos foram armazenados a -15 °C sob ausência de luz para análises posteriores.

Por diferenças no modo de operação do sistema de extração não foram construídas curvas cinéticas para todos os experimentos pois nesse sistema (MV-10) os extratos obtidos com diferentes tempos de extração precisam ser coletados separadamente em frascos individuais o que inviabilizaria a obtenção dos dados cinéticos para todos os experimentos. Entretanto, foram selecionadas algumas condições experimentais nas quais foram obtidos os dados necessários para a construção das curvas cinéticas de extração. Estas condições foram: 200 bar e 60 °C sem adição de cossolvente e nas mesmas temperatura e pressão com a adição de 5% m/m de acetato de etila e 5% m/m de etanol. A escolha destas condições será explicada na seção de resultados. Nestes experimentos, os dados foram adquiridos até que fosse atingido 220 min de extração.

3.5.3 Modelagem matemática empírica das cinéticas de extração com fluido supercrítico

Foram utilizados dois modelos matemáticos empíricos: Naik e Barton, apresentados na Seção 2.2.1.2 para descrever o fenômeno de extração com fluido supercrítico de folhas de Uvaia.

Os modelos foram adaptados para prever a existência de até três estágios que ocorrem em série. Os parâmetros estimados de cada modelo são: y_0 que se refere à quantidade de extrato disponível em cada estágio, utilizado nos dois modelos. O

outro parâmetro (b) refere-se à velocidade de extração, quanto maior o valor desse parâmetro, maior será a taxa de extração.

Os parâmetros foram ajustados empregando o *software* MAPLE e o método de otimização SIMPLEX *downhill* com a seguinte função objetivo:

$$F = \sum_{j=1}^N (m_{ext_j}^{Calc} - m_{ext_j}^{Exp})^2 \quad (3.2)$$

Em que:

$m_{ext_j}^{Calc}$ é a massa de extrato obtida pelo modelo;

$m_{ext_j}^{Exp}$ é a massa de extrato obtida experimentalmente;

N o número de pontos da curva de cinética experimental.

Para que o modelo pudesse prever até três etapas de extração, as equações foram modificadas, sendo incluídas funções degraus (3.3) e (3.4), u_1 e u_2 são adimensionais.

$$u_1(t - t_1) = \begin{cases} 0, & t < t_1 \\ 1, & t \geq t_1 \end{cases} \quad (3.3)$$

$$u_2(t - t_2) = \begin{cases} 0, & t < t_1 \\ 1, & t \geq t_1 \end{cases} \quad (3.4)$$

Sendo assim, as equações modificadas para prever as três etapas assumem as seguintes formas:

$$\begin{aligned} y = & \frac{y_1 \cdot b_1 \cdot t}{1 + b_1 \cdot t} + u_1(t - t_1) \cdot \frac{y_2 \cdot b_2 \cdot t}{1 + b_2 \cdot t} \\ & + u_2(t - t_2) \cdot \frac{y_3 \cdot b_3 \cdot t}{1 + b_3 \cdot t} \end{aligned} \quad (3.5)$$

Naik:

$$\text{Barton: } y = y_1(1 - e^{-b_1 t}) + u_1(t - t_1) \cdot y_2(1 - e^{-b_2 t}) + u_2(t - t_2) \cdot y_3(1 - e^{-b_3 t}) \quad (3.6)$$

Caso sejam consideradas somente duas etapas, as equações assumem a forma das equações 3.7 e 3.8:

$$\text{Naik: } y = \frac{y_1 \cdot b_1 \cdot t}{1 + b_1 \cdot t} + u_1(t - t_1) \cdot \frac{y_2 \cdot b_2 \cdot t}{1 + b_2 \cdot t} \quad (3.7)$$

$$\text{Barton: } y = y_1(1 - e^{-b_1 t}) + u_1(t - t_1) \cdot y_2(1 - e^{-b_2 t}) \quad (3.8)$$

3.5.4 Modelagem matemática fenomenológica das cinéticas de extração com fluido supercrítico

Foram testados os ajustes dos parâmetros de três modelos fenomenológicos encontrados na literatura, para descrever a cinética de extração de α -amirina e β -amirina, a partir das folhas de uvaia, utilizando CO₂ supercrítico. Como a base para a obtenção dos modelos fenomenológicos são os balanços de massa obtidos para o sólido e para o solvente, foram escolhidos modelos que apresentam as mesmas considerações iniciais para a obtenção dos respectivos balanços: processo isotérmico e isobárico; porosidade do leito constante ao longo do processo; densidade da mistura solvente e soluto constante ao longo do processo e igual à densidade do soluto puro; distribuição de partículas uniforme no leito; não há dispersão radial; velocidade intersticial constante.

3.5.4.1 Modelo de segunda ordem

O modelo de segunda ordem, adaptado por De Souza et al. (2008), considera que a taxa de extração é simultaneamente proporcional à capacidade

residual de extração dos solutos pelo solvente e à concentração dos solutos na matriz sólida. As equações que descrevem esse modelo são:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{\rho_{bed}}{\varepsilon} \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (3.9)$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -kq(C_{eq} - C) \quad (3.10)$$

em que: C é a concentração de soluto no solvente (kg/m^3), t é o tempo de extração (min), ρ_{bed} é a densidade do leito (kg/m^3), ε é a porosidade do leito, q é a concentração de soluto na matriz sólida (kg/m^3), u é a velocidade intersticial (m/s), z é a coordenada axial do leito, k é a constante cinética ($\text{m}^3/\text{kg min}$), e C_{eq} é a concentração de equilíbrio de soluto no solvente (kg/m^3).

Para o modelo de segunda ordem, as condições iniciais e de contorno são:

$$C(0, z) = C_{eq} \quad (3.11)$$

$$q(0, z) = q_0 \quad (3.12)$$

$$C(t, 0) = \begin{cases} C_{eq} & t = 0 \\ 0 & t > 0 \end{cases} \quad (3.13)$$

Em que: q_0 é a concentração inicial de soluto na matriz sólida (kg/m^3).

A solução analítica do modelo de segunda ordem é:

$$\frac{C}{C_{eq}} = \begin{cases} 1 & t < t_r \\ 1 - \frac{1}{(e^A + e^{-B} - 1)e^B} & t > t_r \end{cases} \quad (3.14)$$

Em que: $A = (z/u)\beta$, $B = [(-tu + z)\beta]/\alpha u$, $\beta = kC_{eq}\alpha$, $\alpha = (\rho_b q_0)/(\varepsilon C_{eq})$, e t_r é o tempo de residência do solvente no leito.

A massa total extraída é obtida por:

$$m_{\text{ext}} = \int_0^{t_e} C_{z=H} w t \quad (3.15)$$

$$= \begin{cases} C_{\text{eq}} w t & t < t_r \\ C_{\text{eq}} w t - \frac{C_{\text{eq}} w \alpha}{\beta} \ln(e^{(z\beta)/u} + e^{[-(tu+z)\beta]/\alpha u} - 1) & t > t_r \end{cases}$$

Em que $C_{z=H}$ é a concentração de soluto no solvente na saída do extrator (kg/m^3), H é o comprimento do extrator (m), e w é a vazão volumétrica de solvente (m^3/min).

No modelo de segunda ordem existe apenas um parâmetro ajustável, a constante k .

3.5.4.2 Modelo de equilíbrio

O modelo de equilíbrio, desenvolvido por Reverchon (1996), emprega uma relação de equilíbrio para determinar a concentração do soluto na interface líquido-sólido. As equações que descrevem esse modelo são:

$$\varepsilon V \frac{\partial C}{\partial t} + uV \frac{\partial C}{\partial z} + V(1 - \varepsilon) \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad (3.16)$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -\frac{1}{t_i} (q - q^*) \quad (3.17)$$

$$t_i = \frac{(1 - \varepsilon)V}{A_p K} \quad (3.18)$$

$$q^* = \frac{C}{k_p} \quad (3.19)$$

Em que V é o volume do extrator (m^3), q^* é a concentração de soluto na interface sólido-fluido (kg/m^3), t_i é o tempo de difusão interna (min^{-1}), A_p é a área das partículas no leito (m^2), K é o coeficiente de transferência de massa (m^2), k_p é o coeficiente de partição.

Conforme o autor, é possível expressar t_i em função de um coeficiente de difusão interna:

$$t_i = \frac{\vartheta l^2}{D_i} \quad (3.20)$$

Em que ϑ é depende do formato da partícula (3/5 para esferas, 1/2 para cilindros e 1/3 para placas, que é o caso do presente estudo), e D_i é o coeficiente de difusão interna (m²/min).

Para o modelo de equilíbrio, as condições iniciais e de contorno são as mesmas do modelo de segunda ordem. Existem dois parâmetros ajustáveis, o coeficiente de difusão interna, D_i , e o coeficiente de partição, k_p .

3.5.4.3 Modelo de células intactas e rompidas

O modelo de células intactas e rompidas (*Broken and intact cells model – BIC*) desenvolvido por Sovová (1994) e aprimorado por Sovová et al. (1995), estabelece três etapas para o processo de extração. Há um período em que a transferência de massa é controlada pela solubilidade do soluto na fase líquida; outro em que a extração é controlada pela interação matriz-soluto e a concentração na fase líquida; e um período em que ambos os mecanismos estão atuando. A taxa de transferência de massa é definida por duas equações, uma para a primeira etapa, que despreza os efeitos da concentração na fase sólida e a segunda equação, que despreza a solubilidade do extrato no solvente. As concentrações são expressas em termos mássicos. As equações que descrevem esse modelo são:

$$-\rho_{\text{solid}}(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (3.21)$$

$$\rho_{\text{solvent}} \varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + \rho_{\text{solvent}} \varepsilon u \frac{\partial y}{\partial z} = J(x, y) \quad (3.22)$$

$$J(x > x_k, y) = k_{fa} \rho_{\text{solvent}} (y_r - y) \quad (3.23)$$

$$J(x \leq x_k, y) = k_{sa} \rho_{\text{solid}} x \left(1 - \frac{y}{y_r}\right) \quad (3.24)$$

$$r_k = \frac{x_k}{x_0} \quad (3.25)$$

Em que x é a concentração de soluto na fase sólida (kg/kg), J é a taxa de transferência de massa entre as fases (kg/m³ min), y é a concentração de soluto no solvente (kg/kg), ρ_{solvent} é a densidade do solvente (kg/m³), x_k é a concentração do extrato na fase sólida, no instante em que termina a extração do soluto livre (kg/kg), k_{fa} é o coeficiente global de transferência de massa na fase fluída (min⁻¹), k_{sa} é o coeficiente global de transferência de massa na fase sólida (min⁻¹), y_r é a solubilidade do soluto no solvente (kg/kg), r_k é a fração de extrato de difícil acesso, e x_0 é a concentração inicial de soluto na fase sólida (kg/kg).

Para o modelo BIC, as condições iniciais e de contorno do modelo de segunda ordem devem ser manipuladas para fornecerem unidades consistentes. Existem três parâmetros ajustáveis, os coeficientes globais de transferência de massa, k_{fa} e k_{sa} , e a fração de óleo retido, r_k .

3.5.4.4 Modelo matemático desenvolvido a partir das equações de equilíbrio de adsorção de Freundlich

A partir do balanço de massa global no extrato no sólido, tem-se que:

$$\frac{dm_e}{dt} = -\dot{m}_f(Y_{z=L} - Y_{z=0}) \quad (3.26)$$

Em que m_e é a massa do soluto no sólido no tempo t (kg), $\dot{m}_f$ é a vazão mássica do solvente (g/min), $Y_{z=0}$ é a razão massa de soluto por massa de solvente na entrada do reator, e $Y_{z=L}$ é a razão massa de soluto por massa de solvente na saída do reator.

Como na entrada do extrator o solvente é livre de soluto, isto é, $Y_{z=0} = 0$. A partir da definição da variável X que é a razão mássica de soluto no sólido por massa de amostra livre de soluto m_{FO} , isto é: $X = \frac{m_e}{m_{FO}}$.

Assim a Equação (3.27) pode ser escrita como:

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{\dot{m}_f}{m_{F0}} (Y_{Z=L}) \quad (3.27)$$

Considerando que o sistema (extrator) está em equilíbrio, considerando que a relação de equilíbrio possa ser representada pela Isoterma de Freundlich, tem-se que:

$$X = k_F Y^{1/n} \quad (3.28)$$

Isolando a variável Y da Equação (3.28) e aplicando na Equação (3.27) tem-se que:

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{\dot{m}_f}{m_{F0}} \left(\frac{X}{k_F} \right)^n \quad (3.29)$$

Integrando a Equação (3.29), tem-se que:

$$X(t) = \frac{(m_{F0})^{\frac{1}{n-1}}}{(tnk_F^{-n}\dot{m}_f - tk_F^{-n}\dot{m}_f + X_0^{1-n}m_{F0})^{\frac{1}{n-1}}} \quad (3.30)$$

Em que: m_{ext} é a massa de soluto extraída (kg), t é o tempo (min), x_0 é a concentração inicial de soluto na fase sólida (kg/kg), F é a massa total de sólido no extrator (kg), x é a concentração de soluto na fase sólida (kg/kg), k_F é o coeficiente global de transferência de massa no filme externo (min^{-1}), n é parâmetro do modelo de Freundlich, e y_r é a solubilidade do soluto no solvente (kg/kg).

Para calcular a massa de óleo extraída, tem-se que:

$$m_{ext}(t) = m_{F0}(X_0 - X(t)) \quad (3.31)$$

Neste modelo tem-se dois parâmetros ajustáveis da Isoterma de Freundlich, k_F e n .

3.5.4.5 Modelo matemático desenvolvido a partir das equações de equilíbrio de adsorção de Langmuir

Similarmente à adsorção de equilíbrio de Freundlich, considerando que o sistema está em equilíbrio e a relação de equilíbrio pode ser representada pela isoterma de Langmuir, pode-se obter o seguinte:

$$X = \frac{q_{max}bY}{1 + bY} \quad (3.32)$$

Em que q_{max} é a capacidade máxima de adsorção (g/g) e b é uma constante (mL/g).

Isolando a variável Y da equação (3.32) e aplicando na equação (3.27) tem-se que:

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{\dot{m}_f}{m_{F0}} \frac{X}{b(X - q_{max})} \quad (3.33)$$

Integrando a Eq. (3.33):

$$X(t) = \exp \left\{ -\frac{1}{C_1} \left[\frac{-\exp \left(\dot{m}_f C_2 - \frac{\dot{m}_f t}{C_1} \right)}{q_{max}} \right] C_1 + [-C_2 \dot{m}_f - t \dot{m}_f] \right\} \quad (3.34)$$

$$\text{Em que } C_1 = b m_{F0} q_{max}, \text{ e } C_2 = - \left[\frac{-\exp \left(\frac{\dot{m}_f}{C_1} \right) C_1 + \dot{m}_f}{C_1} + X_0 \right],$$

3.5.4.6 Parâmetros dos modelos e resolução matemática

A concentração inicial de soluto na fase sólida, para todos os experimentos, foi calculada pela máxima razão entre a massa extraída ao final da extração, extrapolada para um tempo infinito:

$$x_0 = \frac{m^\infty}{F} \quad (3.35)$$

Em que m^∞ é a massa extraída extrapolada para $t \rightarrow \infty$ (kg), e F é a massa total de sólido no extrator (kg).

A solubilidade do extrato no solvente foi calculada a partir das curvas de extração para cada experimento. A inclinação da reta ajustada fornece a taxa de extração, que ao ser dividida pela vazão do solvente, resulta na concentração:

$$y_r = \frac{T_x}{Q} \quad (3.36)$$

Em que T_x é a taxa de extração (kg/min), e Q é vazão mássica de solvente (m^3/min).

A resolução de todos os modelos foi realizada com o auxílio do *software* Maple versão 13, utilizando a rotina *dsolve* para resolver as equações diferenciais e a rotina *Search* na investigação dos parâmetros. Na solução das equações diferenciais parciais foi empregado o método das linhas que aproxima as derivadas espaciais por diferenças finitas, obtendo assim um sistema de equações diferenciais ordinárias. Foram usados dez elementos de discretização. A função objetivo utilizada para a estimativa dos parâmetros foi:

$$F_o = \sum_{j=1}^{n_{exp}} \left(m_{extj}^{calc} - m_{extj}^{exp} \right)^2 \quad (3.37)$$

Em que F_o é a função objetivo, n_{exp} é o número de dados experimentais, m_{extj}^{calc} é a massa calculada de soluto extraída (g), m_{extj}^{exp} é a massa de soluto extraída obtida experimentalmente (g).

Os cálculos da massa extraída, acumulada ao longo do tempo de operação, para o modelo de equilíbrio e BIC, foram, respectivamente:

$$\frac{dm_{\text{ext}}(z = H, t)}{dt} = \frac{QC(z = H, t)}{\rho_{\text{solvent}}} \quad (3.38)$$

$$\frac{dm_{\text{ext}}(z = H, t)}{dt} = Qy(z = H, t) \quad (3.39)$$

A qualidade do ajuste dos parâmetros dos três modelos testados foi avaliada em termos de coeficiente de correlação, R^2 , erro médio relativo, ME, e critério de seleção de Akaike, AIC.

3.5.5 Experimentos de aumento de escala e avaliação econômica do processo de extração supercrítica

3.5.5.1 Extrações supercríticas com aumento de escala

As extrações de aumento de escala foram realizadas em uma unidade comercial SFE (Spe-ed 7071, Applied Separations, Allentown, EUA) descrita por NÁTHIA-NEVES et al. (2020). A unidade Spe-ed 7071 foi usada com coluna de extração de 25 mL. Para esses ensaios, foram usados 11 g de massa de matéria-prima. As condições operacionais de pressão (20 MPa), temperatura (60 °C) e adição de cossolvente (5% de acetato de etila e 5% de etanol) foram selecionadas com base na melhor condição relatada em estudo anterior (KLEIN et al., 2019). Após o sistema ser aquecido e pressurizado nas condições desejadas, o sistema foi mantido em um período estático de 15 min. Em seguida, a extração foi conduzida sob vazão mássica de 2 g / min e os extratos foram coletados nos tempos de 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 170 e 220 min (S/F de 40). Após a extração, os solventes foram removidos dos extratos em estufa de secagem a 60 °C por 24 h. Os rendimentos de extração foram calculados como a razão entre a massa extraída e a quantidade de matéria-prima utilizada em base seca. Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

3.5.5.2 Critérios do aumento de escala

Os experimentos de aumento de escala foram realizados a fim de demonstrar a validade do critério de aumento de escala utilizado na avaliação econômica do processo. O critério de aumento de escala adotado consistiu em manter uma relação entre massa de solvente e massa de alimentação constante (S/F). Duas escalas diferentes foram avaliadas: 5 vezes e 10 vezes, usando aproximadamente 55,0 e 110,0 g de massa de matéria-prima, respectivamente. A taxa de fluxo do solvente foi calculada usando o critério da constante S/F para atingir um S/F de 40 em 220 min de extração.

3.5.5.3 Modelagem da curva cinética de extração

Conforme descrito por MEIRELES (2008), uma curva geral de extração (OEC) pode ser descrita por uma família de linhas retas (método spline), geralmente duas ou três. Essas linhas podem ser praticamente correlacionadas com as etapas de extração. Uma OEC típica pode ser descrito por três etapas: um período de taxa de extração constante (CER), um período de taxa de extração decrescente (FER), que representa a etapa para a qual a convecção e difusão no substrato sólido controla o processo, e uma período de taxa controlada (DC). O modelo escolhido para a descrição das curvas cinéticas foi o *spline*, pois com este modelo é possível identificar corretamente onde estão os três estágios típicos descritos acima.

O método *spline* foi aplicado para ajustar os dados OECs usando os procedimentos PROC REG e PROC NLIN do SAS 9.2 (FREUND; LITTELL, 1995). O procedimento REG é um procedimento de propósito geral para regressão e o procedimento NLIN estima os parâmetros por mínimos quadrados não lineares ou mínimos quadrados não lineares ponderados. Os seguintes parâmetros OEC foram obtidos para o período CER conforme descrito por RODRIGUES et al. (2002): taxa de transferência de massa (MCER), representada pela inclinação da primeira linha; duração do período CER (t_{CER}), correspondente à interceptação da primeira e segunda linhas; razão em massa do soluto na fase supercrítica na saída da coluna (YCER),

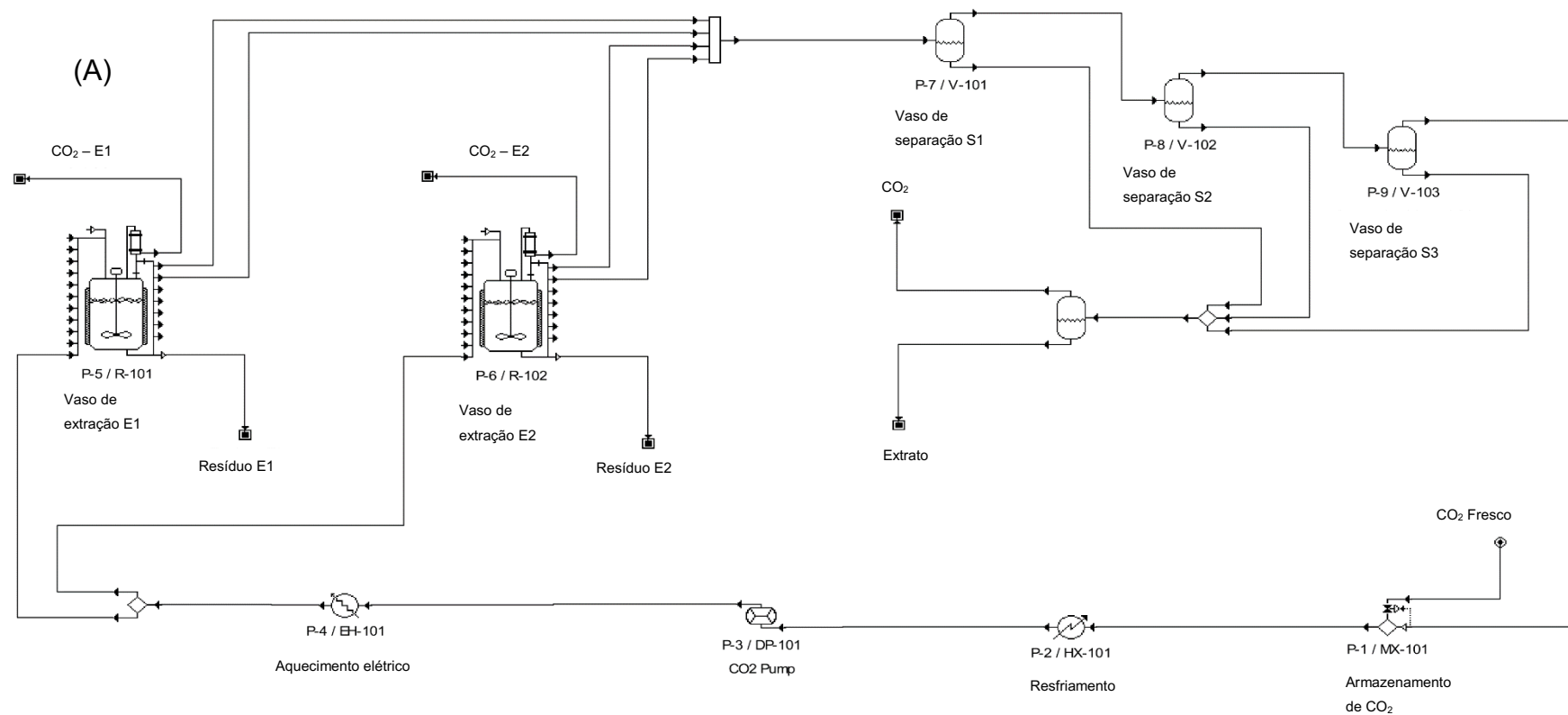
obtida pela divisão do M_{CER} pela vazão média do solvente para o período CER; e rendimento relativo ao período de CER (R_{CER}). A razão de massa de solvente (S) para alimentação seca (F), em relação ao período CER (S/F_{CER}), também foi calculada.

3.5.5.4 Modelos de simulação de processo

Na otimização de um processo de extração é desejável que a avaliação de questões técnicas como rendimento e pureza de extrato seja também acompanhada de uma avaliação econômica dos custos envolvidos. Essa abordagem se torna ainda mais importante quando modificações de processos são propostas visando melhoria de desempenho, mas exigindo, no entanto, maior despesa de capital (*Capital Expenditures* – CAPEX), por exemplo.

Foram avaliados os efeitos da adição de cossolvente (etanol e acetato de etila) na performance e no custo de produção (*manufacturing cost* – COM) do processo EFS para uvaia. A adição de cossolvente com característica polar tende a melhorar a eficiência do processo EFS na extração de compostos polares, como é o caso da α -amirina e β -amirina. No entanto um sistema adicional de evaporação e de recuperação do cossolvente líquido é requerido. Essas questões foram avaliadas a partir de modelos construídos no simulador SuperPro Designer® version 8.5 (Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ, USA) para os processos de extração com CO_2 supercrítico e com CO_2 adicionado de cossolvente (etanol ou acetato de etila) e são apresentados na Figura 3.2A. No modelo foi considerado um sistema com dois vasos de extração, operando de forma intercalada, permitindo assim a simulação de um processo industrial de produção de extrato com a tecnologia EFS. Para o processo de extração com cossolvente um sistema adicional de evaporação de líquido com evaporador de filme descendente foi considerado, além da recirculação do solvente no processo (Figura 3.2B). Gráficos de Gantt são também disponibilizados para ilustrar o cronograma das principais operações envolvidas nos processos (Figura 3.3).

Figura 3.2 - Fluxograma de simulação para extratos obtidos por extração de CO₂ supercrítico (A) e extração de CO₂ supercrítico + cossolvente (B)



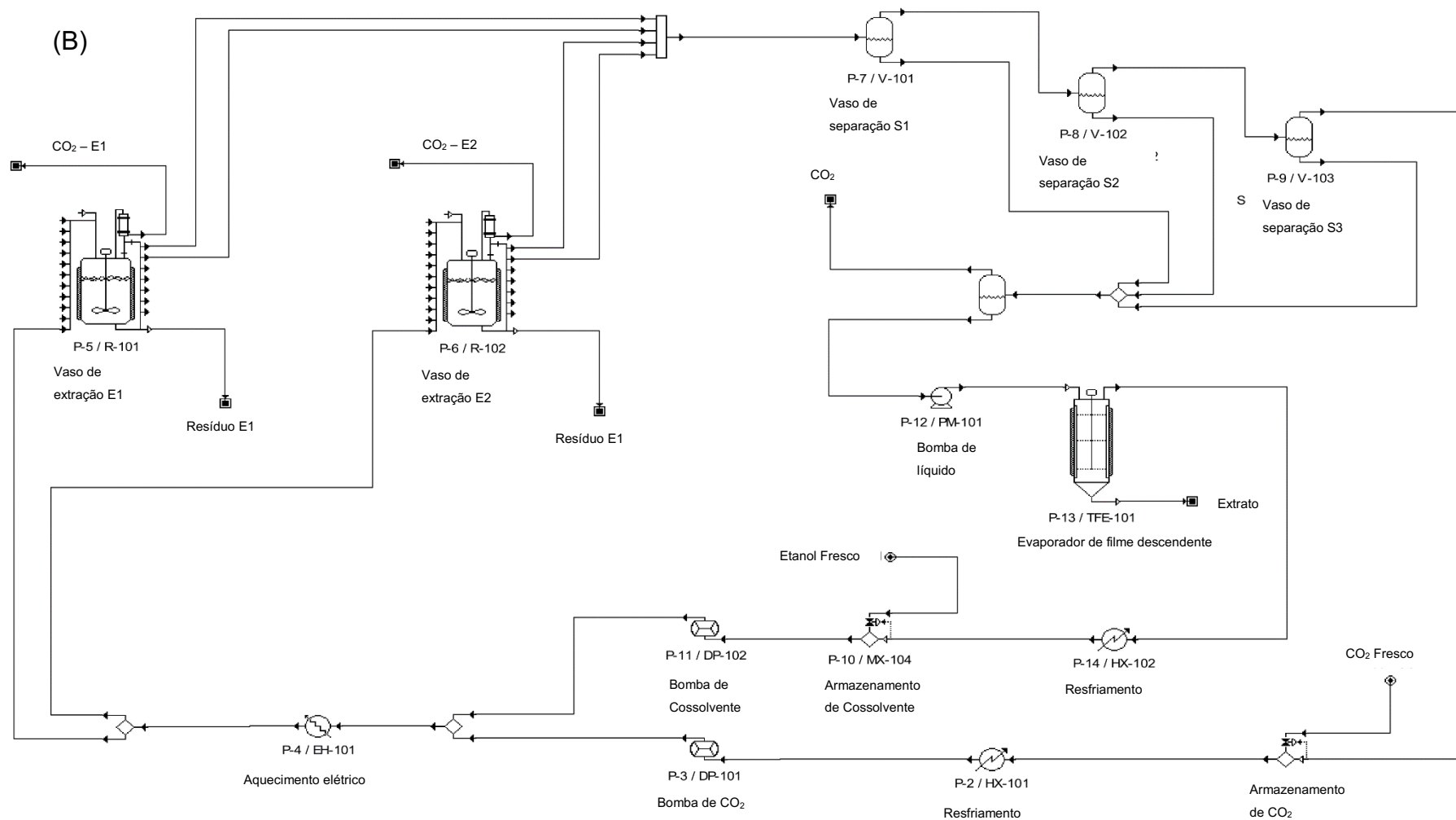
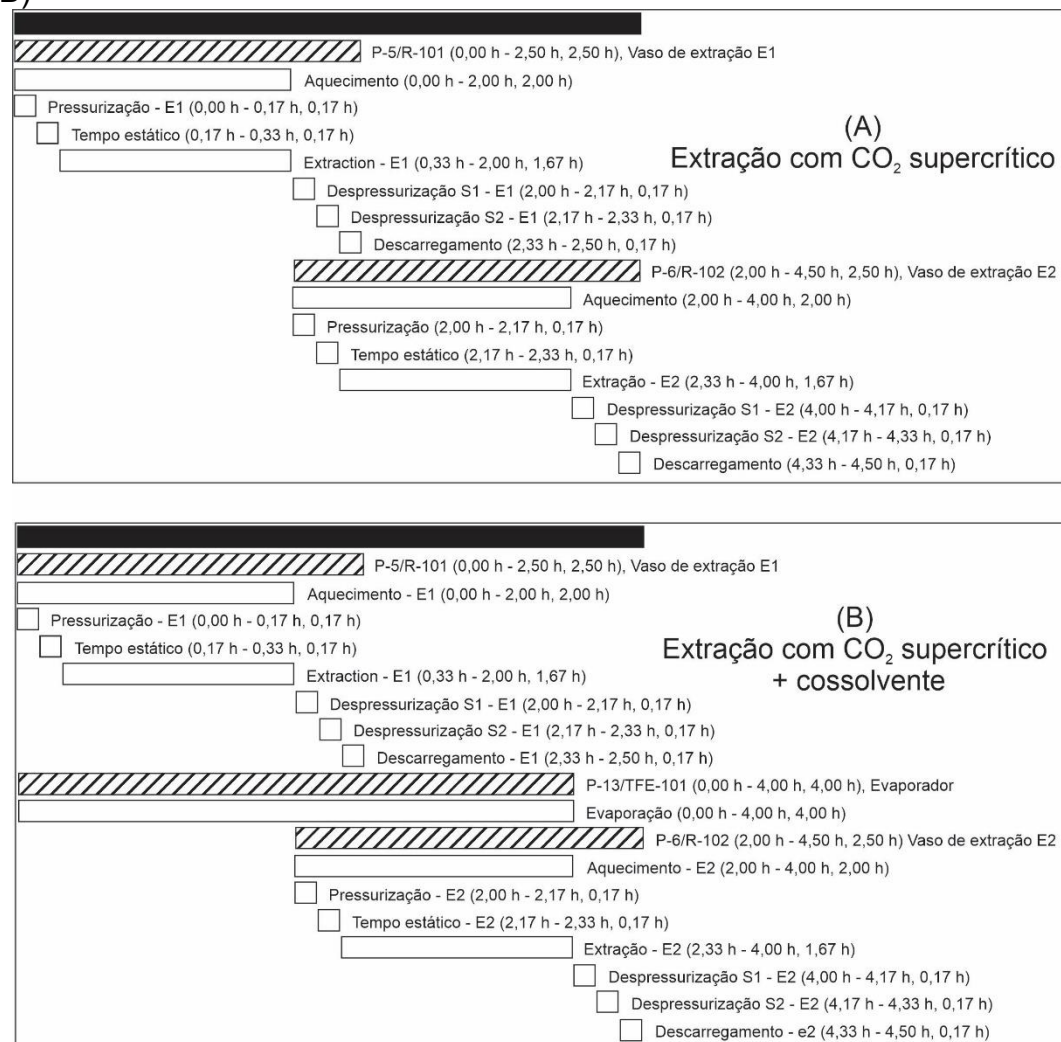


Figura 3.3 - Gráfico de Gantt de operações para o processo de extração de CO₂ supercrítico (A) e processo de extração de CO₂ supercrítico + cossolvente (B)



Para o estudo de otimização do processo foi considerado uma escala de equipamento com vasos de extração de 10 L, um tamanho mínimo de equipamento para que cenários de produção pudessem ser avaliados e comparados. O comportamento das curvas de extração, ou o rendimento acumulado de extrato no tempo, em escalas maiores foram considerados semelhantes às curvas obtidas em escalas laboratoriais desde que as condições de processo, especificamente, razão Q (massa de solvente)/F (matéria-prima empacotado), pressão, temperatura, densidade aparente de leite e porosidade, se mantivessem constantes.

Essas condições, obtidas nos ensaios descritos na seção 3.5.5.1, foram utilizadas como dados de entrada nos modelos. O principal critério de otimização adotado neste estudo é o COM dos extratos, tendo ainda um olhar voltado para a pureza de amirinas.

3.5.5.5 Aumento de escala e análise de sensibilidade

Com base na condição otimizada para a extração de uvaia uma análise do efeito da escala de produção no COM foi avaliada, sendo estudados 4 diferentes cenários. Nesse estudo foram considerados sistemas com vasos de extração de 50 e 100 L. Além disso, um estudo de sensibilidade também foi realizado para avaliar o efeito do custo de investimento em equipamentos, tendo em mente diferentes requisitos de máquinas de acordo com o nicho de atuação (alimentício, cosmético e farmacêutico).

3.5.5.6 Parâmetros para a avaliação econômica

O custo de produção (COM) é composto por uma série de custos que podem ser agrupados nos seguintes termos:

$$\text{COM} = \text{FMC} + \text{DMC} + \text{GE} \quad (3.40)$$

Em que: FMC são os custos fixos de produção, DMC são os custos diretos de produção e GE são as despesas gerais. Os custos fixos são independentes das variações na taxa de produção. Incluem depreciação e manutenção de equipamentos, que são assumidas mesmo quando a planta não está em operação. Os custos diretos de produção representam despesas operacionais que variam com a taxa de produção, como matérias-primas (CRM), insumos (CUT), mão de obra (COL) e outros custos operacionais.

Despesas gerais representam despesas necessárias para o funcionamento do negócio. Custos de gestão, vendas, finanças e pesquisa e desenvolvimento estão incluídos nesta categoria (TURTON et al., 1998). Em termos mais comuns para a indústria, o COM pode ser dividido em despesas de capital (CAPEX) e despesas operacionais (OPEX). O primeiro é o custo de FMC e o segundo pode a soma dos custos de DMC e GE descritos acima.

Os parâmetros econômicos utilizados nos modelos dos processos são apresentados na Tabela 3.2. Os sistemas 1 e 2 foram utilizados na otimização do processo com base nos dados cinéticos obtidos em escala de laboratório. Os sistemas 2, 3 e 4 foram utilizados na avaliação do efeito do aumento de escala. Para todos os sistemas foi considerado o CAPEX de equipamentos seguindo padrão farmacêutico para as boas práticas de fabricação (*Good manufacturing practices – GMP*), visto que os principais mercados para os extratos bioativos de uvaia são os mercados de produtos cosméticos e farmacêuticos.

Tabela 3.2 - Principais parâmetros econômicos usados para estimativa de COM.

Parâmetro econômico	Custo (US\$)
<i>Sistema de extração – padrão farmacêutico</i>	
Sistema 1: 2x10 L ^a	US\$ 300,000.00
Sistema 2: 2x10 L + Evaporador de filme descendente ^a	US\$ 420,000.00
Sistema 3: 2x50 L + Evaporador de filme descendente ^a	US\$ 940,000.00
Sistema 4: 2x100 L + Evaporador de filme descendente ^a	US\$ 1.330,000.00
<i>Custo Dependente da Instalação</i>	
Taxa de depreciação	10%
Taxa de manutenção	6%
Taxas diversas (seguro, impostos locais, despesas de fábrica)	8%
<i>Custo de mão de obra</i>	
Mão de obra (taxa básica) ^b	US\$ 2,83/h-trabalhador
Fator de benefícios	0,8
Fator Operacional de Fornecedores	0,1
Fator de Supervisão	0,2
Fator de Administração	0,6
<i>Número de trabalhadores</i>	
Sistema 1: 2x10 L	1 trabalhador
Sistema 2: 2x10 L	1 trabalhador
Sistema 3: 2x50 L	2 trabalhadores
Sistema 4: 2x100 L	2 trabalhadores
<i>Matérias-primas</i>	
Folhas de Uvaia ^c	US\$ 4.04/kg
Pré-processamento	US\$ 40.00/ton
Dióxido de carbono ^c	US\$ 3.90/kg
Acetato de etila ^c	US\$ 5.01/kg
Álcool etílico (Etanol) ^c	US\$ 1.94/kg
<i>Insumos</i>	
Electricidade ^c	US\$ 0.1087/kWh
CaCl ₂ (líquido refrigerante) ^d	US\$ 0.25/ton
Água refrigerada ^d	US\$ 0.40/ton
Vapor ^d	US\$ 12.00/ton

^aFabricante brasileira^bTrading Economics (<https://tradingeconomics.com/brazil/wages-in-manufacturing>)^cCotação direta com fornecedores locais^dBanco de dados do software SuperPro

O tempo de funcionamento foi considerado de 16 h por dia e 250 dias úteis por ano, o que corresponde a 4.000 horas de funcionamento por ano. As outras 8 horas do dia foram reservadas para os procedimentos de limpeza de forma a se adequar aos requisitos farmacêuticos GMP.

Taxas de 10% para depreciação, 6% para manutenção e 8% para diversos (seguros, impostos locais, despesas de fábrica) do CAPEX de equipamentos foram consideradas pelo modelo. Além disso, foi incluído o capital de giro referente ao custo de 30 dias de operadores, matérias-primas e insumos.

O número de operadores necessários para operar a unidade de extração varia de acordo com o tamanho da planta. O salário base para os operadores foi definido em US \$ 2,83/h-trabalhador. Além disso, foram considerados os custos trabalhistas de benefícios, supervisão e administração.

O custo da matéria-prima incluiu os custos de aquisição das folhas de uvaia, CO₂ e cossolvente (etanol e acetato de etila). O gasto de CO₂ foi calculado pela soma do CO₂ perdido durante a etapa de descompressão do vaso de extração (estimado pelo simulador) e do CO₂ que permanece dissolvido no extrato após a etapa de separação (foi assumido como 2% do CO₂ presente na mistura de CO₂ e extrato; com base no trabalho de TAKEUCHI et al. (2008)). Além disso, o custo de pré-processamento das folhas também deve ser considerado ao ser adicionado ao custo unitário da matriz vegetal.

O custo com insumos se deve ao consumo de energia envolvido nos trocadores de calor (resfriamento e aquecimento) e à eletricidade consumida durante o processo. O consumo dos insumos em todo o processo foi estimado pelo balanço energético do simulador. O custo do tratamento de resíduos foi desprezado, pois o material sólido conhecido como coproduto poderia ser utilizado como matéria-prima para outros processos. O coproduto também pode ser usado para geração de energia por meio de várias abordagens de conversão de biomassa ou como fonte de nutrientes para várias agriculturas, melhorando a estrutura do solo e a capacidade de retenção de água.

3.5.5.7 Parâmetros de lucratividade

Também foram estimados os seguintes parâmetros de lucratividade: o retorno sobre o investimento (ROI), a margem bruta e o tempo de retorno do investimento. A margem bruta (Eq. (3.41)) é uma medida de lucro que nos diz diretamente que porcentagem da receita anual é o lucro bruto. O índice de retorno sobre o investimento (ROI) (Eq. (3.42)) mede a quantidade de retorno de um investimento em relação ao custo do investimento. O tempo de retorno (Eq. (3.43)) representa o tempo necessário para que o investimento de capital total seja recuperado pelos lucros líquidos acumulados. Quanto menor o tempo de retorno do investimento, mais atraente o projeto parece ser, uma vez que o investimento inicial é recuperado mais rapidamente. Projetos com tempo de retorno entre 2 e 5 anos são considerados viáveis (VARDANEGA et al., 2017).

$$\text{Margem bruta} = \text{lucro bruto/receita anual} \quad (3.41)$$

$$\text{Retorno sobre o investimento (ROI)} = \frac{\text{lucro líquido anual}}{\text{investimento de capital total}} \quad (3.42)$$

$$\text{Tempo de retorno} = \frac{\text{investimento de capital total}}{\text{lucro líquido anual}} \quad (3.43)$$

3.6 Extração assistida por ultrassom

Utilizou-se o sonicador ultrassônico VCX 750 (SONICS), operando com frequência de 20 kHz e potência máxima de 750 Watts e ponteira de titânio com 13 mm de diâmetro.

A potência ultrassônica efetiva transferida para o meio foi calculada a partir de um procedimento calorimétrico (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2014). Para a análise calorimétrica, 50 mL de solvente (mesmo volume utilizado nas extrações) foi

submetido à sonicação sem controle externo de temperatura. A temperatura do solvente foi medida a cada segundo durante os primeiros 5 minutos, sendo que para os cálculos foram consideradas somente as temperaturas do período inicial em que o aumento da temperatura apresentava comportamento linear.

A potência ultrassônica real aplicada (P (W)) foi calculada utilizando o aumento da temperatura do solvente causada pela dissipação das ondas acústicas, como pode ser observado na Equação (3.44).

$$P = m \cdot C_p \cdot \frac{dT}{dt} \quad (3.44)$$

Em que: m (kg) representa a massa de solvente, C_p (J/kg °C) o calor específico do solvente e dT/dt a inclinação da curva de temperatura pelo tempo.

Para avaliar os efeitos dos solventes (metanol, etanol, acetato de etila e hexano) sobre os rendimentos globais da extração assistida por ultrassom, foram realizados testes na condição de 60 °C, 300 W/L de potência, razão massa de folha/volume de solvente de 1:15 com 3 minutos de extração. Essas condições foram escolhidas tendo como base um estudo anterior (KLEIN et al., 2018) e nos testes feitos anteriormente neste estudo. A temperatura durante o processo de extração foi controlada a partir da circulação de água, aquecida e bombeada por um banho termostático modelo MA-184 (MARCONI) no reator encamisado.

O extrato líquido é separado do resíduo sólido por filtração a vácuo e em seguida concentrados em evaporador rotativo e transferidos para estufa (60 °C) para evaporação. A evaporação transcorre até massa residual constante, a qual é utilizada para determinar a massa de extrato e o rendimento global. Os extratos secos foram armazenados a -15 °C sob ausência de luz para análises posteriores.

Para cada extrato foi determinada a composição química qualitativa (por cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas – CG/EM) e foi quantificada a α e β -amirina (por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE). A partir destes resultados foi selecionado o hexano como melhor solvente para realizar novos testes com o intuito de otimizar as condições de extração das folhas de uvaia assistida por ultrassom. Nesta nova etapa foram avaliados os efeitos da potência do ultrassom, da

temperatura e da razão massa de folhas por volume de solvente sobre o rendimento global e a composição química dos extratos. Esses fatores foram avaliados a partir de um planejamento experimental completo 2^3 com triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios.

Na condição de melhores resultados do planejamento experimental foram avaliados ainda os efeitos do tamanho das partículas da matéria-prima e do tempo de extração.

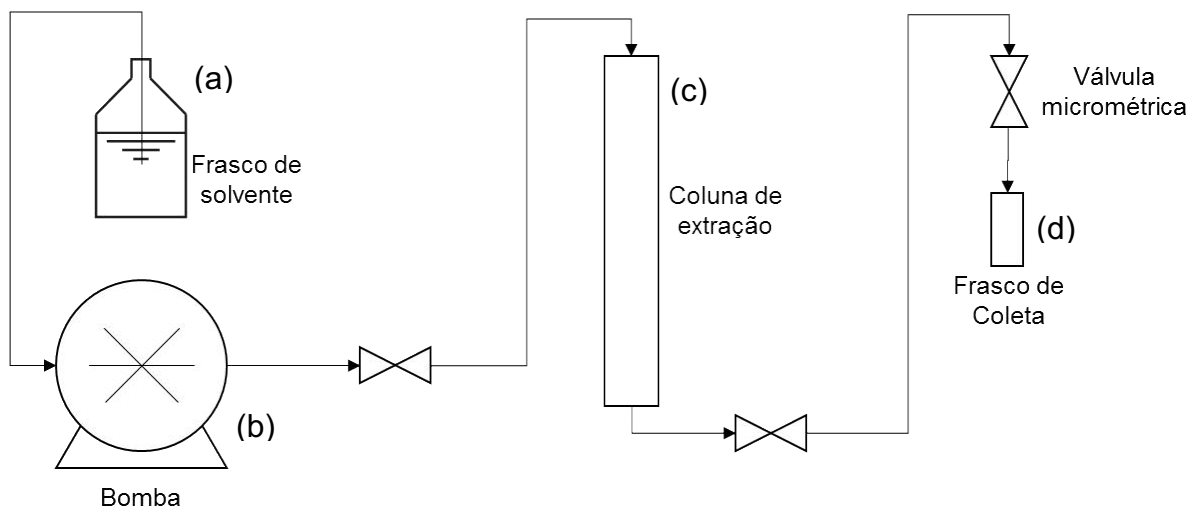
3.7 Extração com líquido pressurizado

As extrações com líquido pressurizado foram realizadas com diversos solventes a fim de encontrar o que apresente as melhores propriedades, para obter extratos com maiores proporções de amirinas. Foram utilizados metanol, etanol, acetato de etila e hexano. O hexano foi o solvente que apresentou melhores resultados (como pode ser observado na seção de resultados) e foi então utilizado nos procedimentos descritos a seguir.

Para avaliar o efeito dos fatores temperatura e pressão, na extração com líquido pressurizado, foram avaliadas as extrações a 40, 70 e 100 °C e 50, 100 e 150 bar. Na condição de pressão e temperatura em que o extrato apresentou as características mais adequadas para a pesquisa, foram realizados novos testes para avaliar o efeito da vazão e do tamanho de partícula da matéria prima. Foram avaliadas as vazões 3, 5 e 7 mL min⁻¹ e os tamanhos de partícula de 0,275, 0,362 e 0,512 mm. Para cada experimento foi utilizado em média 3,5 g de matéria-prima.

Nestes experimentos foi utilizado um módulo de extração com líquido pressurizado apresentado na Figura 3.4, composto por: (a) frasco de armazenamento de solvente, (b) Bomba (Waters 515 HPLC); (c) coluna de extração de aço inox aquecida por um sistema de aquecimento elétrico e (d) frasco de coleta do extrato + solvente.

Figura 3.4 - Esquematização do módulo de ELP.



As dimensões da coluna de extração, onde o leito empacotado é formado, são 0,62 cm de diâmetro interno e 32 cm de altura. A célula é abastecida completamente com as amostras em todos os experimentos. O solvente é bombeado e pressurizado de forma contínua, sendo que a bomba controla automaticamente a vazão no nível desejado e indica ainda em seu visor o valor da pressão, sendo a pressão controlada pela abertura/fechamento da válvula micrométrica. Na saída do extrator a mistura extrato + solvente é coletada em um recipiente de vidro âmbar, previamente pesado em balança analítica modelo AUX220 (Shimadzu). O solvente foi removido do extrato utilizando-se estufa a 60 °C e os extratos secos foram armazenados a -15 °C sob ausência de luz para análises seguintes.

3.8 Composição química por CG-EM

As análises foram realizadas em um cromatógrafo de fase gasosa (Shimadzu GC17A) acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu GC-MS QP5050A). Foi utilizada uma coluna capilar DB-5MS (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano) com dimensões (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm). A fase móvel utilizada foi gás hélio com 99,9999% de pureza, com vazão de 1,0 mL min⁻¹. As amostras foram diluídas em diclorometano para injeção no cromatógrafo.

O volume injetado foi de 2 μL . A injeção é realizada em modo Split 1:5, sendo a temperatura do injetor e do detector 280°C. A temperatura inicial do forno é 40°C, mantendo durante 2 minutos, aquecendo até 70 °C com 3 °C min⁻¹, até 150 °C com 5 °C min⁻¹ e por fim até 280 °C com 20 °C min⁻¹, mantendo-se nessa temperatura por 34 minutos, totalizando 60 minutos de análise.

Para a identificação de cada composto detectado, utiliza-se o banco de dados de espectros de massas NIST.

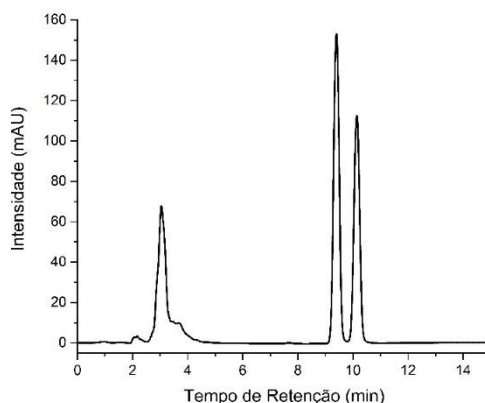
3.9 Quantificação de α -Amirina e β -Amirina por CLAE

Os extratos foram solubilizados e diluídos em álcool isopropílico a fim de se obter uma solução com 0,2 mg mL⁻¹. Utiliza-se um cromatógrafo LC-20AT, acoplado ao detector SPD-20A UV-VIS (Shimadzu), equipado com uma coluna Phenomenex Kinetex C18 (4,6 mm x 250 mm) com partículas de 5 μm . A análise é realizada de acordo com HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ *et al.* (2010): bombeamento isocrático, tendo como fase móvel o Metanol, com fluxo de 0,9 mL min⁻¹. O forno é configurado para 25 °C e cada corrida cromatográfica tem duração de 15 minutos.

As informações obtidas por CLAE possibilitam apresentar os resultados na forma de teor dos compostos presentes nos extratos e também relacionar a massa dos compostos obtida em função da massa de folhas utilizada na extração.

A quantificação foi realizada tendo como base a curva padrão para cada composto. Utilizaram-se soluções com concentrações de 10, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos padrões analíticos de α -amirina e de β -amirina também solubilizados em Álcool Isopropílico. As curvas de calibração apresentaram elevados valores de R^2 , 0,98206 para a α -amirina e 0,99201 para a β -amirina, permitindo que sejam utilizadas para a quantificação dos compostos de interesse. As curvas de calibração estão disponíveis na forma de material complementar no Apêndice A. A Figura 3.5 apresenta um cromatograma dos padrões α -amirina e β -amirina, sendo o pico em 9,4 min relativo à β -amirina e o de 10,1 min relativo à α -amirina.

Figura 3.5 - Cromatograma dos padrões α e β -amirina.



O teor de α -amirina e de β -amirina é calculado utilizando-se da Equação (3.45).

$$\text{Teor do composto (\%)} = \frac{m_{\text{composto}}}{m_{\text{extrato}}} \times 100 \quad (3.45)$$

Em que: m_{composto} representa a massa de composto presente na solução analisada calculada pela curva padrão e m_{extrato} representa a massa de extrato utilizada no preparo da solução analisada. Com isso é possível estabelecer a proporção de cada composto quantificado.

3.10 Análise térmica do extrato

As análises termogravimétricas e diferenciais térmicas foram realizadas em equipamento DTG-60, da marca Shimadzu. A amostra foi depositada em porta amostra de alumina, para garantir estabilidade durante o aquecimento a altas temperaturas. As condições de análise foram aquecimento a 10 °C por minuto, desde 30 °C até 900 °C, com fluxo de N₂ gasoso de 50 mL/min.

Para a análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC – *differential scanning calorimetry*) foi utilizado o equipamento DSC-60 (Shimadzu), a amostra é

acondicionada em um cadinho de alumínio que é inserido no equipamento juntamente com um cadinho vazio de referência. As condições de análise foram aquecimento de 30 °C até 500 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de N₂ gasoso de 50 mL/min.

3.11 Difração de Raio X (DRX)

Para obtenção do espectro de DRX do extrato das folhas e uvaia, foi empregado o método de varredura, com a incidência de raios X sobre amostra disposta sobre lâmina de vidro. O equipamento usado foi da marca Philips, modelo X'Pert-MPD, com radiação K α do cobre e $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. Os parâmetros de análise foram voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA, 2θ na faixa de 5 a 90° com passo de 0,02° e velocidade de 0,02°/s. Foi realizada a busca de similaridade com difratogramas no banco de dados PDF-2 versão 2.1002.

3.12 Isolamento e purificação das amirinas

Para o isolamento e purificação dos extratos foram utilizadas técnicas de separação por cromatografia, com objetivo de obter frações com elevadas concentrações de α -amirina e β -amirina.

Aproximadamente 2 g de extrato obtido com CO₂ supercrítico + 5% de acetato de etila (200 bar e 60 °C) foi submetido à cromatografia em coluna preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh, Mecherey-Nagel) e eluída com 1,5 L de hexano, 200 mL de hexano:acetato de etila (9:1) e 400 mL de hexano:acetato de etila (8:2), obtendo-se 175 frações de aproximadamente 12 mL.

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada – CCD (Silicagel 60 F254, Merck), empregando-se como fase móvel hexano:acetato de etila (8:2 v/v). Para a revelação, borrifou-se a solução de sulfato de cério IV (0,5% m/v em solução aquosa de ácido sulfúrico 5% v/v), seguido do aquecimento das placas a 105 °C por 15 min. As frações que apresentaram similaridade foram agrupadas em 3 grupos (F1-F3).

Além da purificação por cromatografia em coluna, foi desenvolvido um novo método de isolamento/purificação baseado na solubilidade dos compostos de interesse (α -/ β -amirina) em hexano. Em tubos tipo Falcon foi adicionado aproximadamente 0,5 g de extrato e o tubo teve o volume completado com hexano até aproximadamente 14 mL. Após solubilização, os tubos foram levados ao congelador (-15,0 °C) por 30 min para cristalização. A solução com os cristais foi centrifugada a 4000 RPM por 3 min e após centrifugação, o sobrenadante foi completamente removido e então o volume foi completado novamente até 10 mL com hexano. O processo descrito acima, de cristalização e centrifugação foi repetido 5 vezes no total com renovação de hexano puro a cada ciclo. Após os 5 ciclos, o precipitado foi levado a estufa a 60 °C para completa evaporação do solvente.

As frações purificadas pelos dois métodos foram submetidas a quantificação de α -amirina e β -amirina por CLAE conforme descrito anteriormente. A fração purificada obtida pelo método desenvolvido de cristalização/centrifugação foi submetido à análise de composição por CG-EM a fim de identificar os compostos presentes.

3.13 Determinação da capacidade antioxidante dos extratos obtidos

Uma triagem inicial do potencial antioxidante (TEPE et al., 2005) foi realizada visando a economia de tempo e de reagentes, pois haviam aproximadamente 90 amostras de extratos para serem analisadas. Foram preparadas soluções de 2 mg mL⁻¹ de cada extrato e 5 μ L de cada solução foram aplicados em placas de cromatografia de camada delgada (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck). Como eluente foi utilizada uma mistura hexano - acetato de etila (8:2). Após o desenvolvimento da cromatografia, as placas foram retiradas das cubas de desenvolvimento, secadas em estufa e borrifadas com uma solução de DPPH 0,2% em etanol (m/v). Após a aplicação do revelador (DPPH) as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e após esse tempo, elas foram observadas quanto ao aparecimento de pontos amarelos formados pela descoloração do DPPH o que indica a presença de capacidade antioxidante.

Os extratos que apresentaram capacidade antioxidante na triagem foram submetidos a uma análise mais convencional da capacidade antioxidante pelo método de inibição do DPPH (ENUJIUGHA et al., 2012). Foram misturados 0,2 mL de cada solução de extrato (2 mg mL^{-1}) com 3,8 mL de uma solução etanólica de DPPH ($0,1 \text{ mM}$). A mistura foi deixada em temperatura ambiente e protegida da luz por 30 minutos e então a absorbância foi medida a 517 nm em espectrofotômetro (LAMBDA 35 UV/Vis Spectrophotometer, PerkinElmer). Etanol foi utilizado como branco e o controle negativo foi preparado misturando-se 0,2 mL de etanol com 3,8 mL da solução de DPPH. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em μmol equivalente de Trolox por grama de extrato.

3.14 Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos

Os extratos foram avaliados ainda utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu para compostos fenólicos totais (SANTOS et al., 2019). Os extratos foram solubilizados em etanol (2 mg mL^{-1}), 0,3 mL da solução de extrato foi misturada com 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v). Após 2 horas em temperatura ambiente, foi medida a absorbância em um espectrofotômetro (LAMBDA 35 UV/Vis Spectrophotometer, PerkinElmer) a 760 nm. A curva padrão foi preparada com ácido gálico em concentrações entre 10 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato.

3.15 Perfil de bioatividade dos extratos brutos obtidos com as diferentes técnicas de extração

Como extensão do projeto original de doutorado, foi realizado um período de 8 meses de estágio de pesquisa na Universidade de Copenhague (*Københavns Universitet* – Dinamarca) sob supervisão do Professor Dan Staerk. O título do projeto BEPE/ FAPESP (Proc. 2019/07596-2) de estágio no exterior foi: “Perfil de bioatividade de extratos brutos de *Eugenia pyriformis* usando metabolômica de ^1H RMN e perfil

quádruplo de alta resolução de alfa-amilase/alfa-glicosidase/PTP1B/antioxidante combinados com HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR”. Neste estágio, foi analisado um total de 19 extratos obtidos com todas as técnicas de extração utilizadas no doutorado.

3.15.1 Extratos utilizados

As codificações, bem como o método de extração, solvente utilizado e condições experimentais são apresentados na Tabela 3.3. Os extratos obtidos por extração com fluido supercrítico foram obtidos no Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Vegetais (LASEFI – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP). Os demais extratos foram obtidos no Laboratório de Processos de Separação (LPS – UNIOESTE).

Tabela 3.3 - Extratos utilizados nos experimentos desenvolvidos no estágio de pesquisa no exterior

Extrato	Método de extração	Solvente utilizado na extração	Condições experimentais
SFE_CO2	EFS	scCO ₂	200 bar / 60 °C
SFE_CO2_EAC	EFS	scCO ₂ + acetato de etila (5%)	200 bar / 60 °C
SFE_CO2_ETH	EFS	scCO ₂ + etanol (5%)	200 bar / 60 °C
PLE_MET	ELP	Metanol	150 bar / 40 °C
PLE_ETH	ELP	Etanol	150 bar / 40 °C
PLE_EAC	ELP	Acetato de etila	150 bar / 40 °C
PLE_HEX	ELP	Hexano	150 bar / 40 °C
UAE_MET	EAU	Metanol	300 W/L / 60 °C / 1:15 M:S
UAE_ETH	EAU	Etanol	300 W/L / 60 °C / 1:15 M:S
UAE_EAC	EAU	Acetato de etila	300 W/L / 60 °C / 1:15 M:S
UAE_HEX	EAU	Hexano	300 W/L / 60 °C / 1:15 M:S
MAC_MET	Maceração	Metanol	100 rpm / 60 °C / 1:15 M:S
MAC_ETH	Maceração	Etanol	100 rpm / 60 °C / 1:15 M:S
MAC_EAC	Maceração	Acetato de etila	100 rpm / 60 °C / 1:15 M:S
MAC_HEX	Maceração	Hexano	100 rpm / 60 °C / 1:15 M:S
SOX_MET	Soxhlet	Metanol	T _{eb} / 6 h / 1:15 M:S
SOX_ETH	Soxhlet	Etanol	T _{eb} / 6 h / 1:15 M:S
SOX_EAC	Soxhlet	Acetato de etila	T _{eb} / 6 h / 1:15 M:S
SOX_HEX	Soxhlet	Hexano	T _{eb} / 6 h / 1:15 M:S

3.15.2 Bioensaios de avaliação de atividade antidiabética

Nos ensaios de inibição de α -glicosidase, α -amilase e PTP1B foram utilizadas microplacas de 96 poços de acordo com procedimentos anteriormente reportados na literatura (ZHAO et al., 2018). O ensaio de inibição de α -glicosidase foi realizado a 28 °C com um volume final de 200 μ L. Em cada poço foram adicionados 10 μ L de solução de extrato dissolvido em DMSO e 90 μ L de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5, 0,02% NaN₃), e em sequência a microplaca foi agitada por 10 min. Então, foram adicionados 80 μ L de solução de α -glucosidase em tampão fosfato (2,0 U/mL) e a microplaca foi incubada por 10 min. Então, foram adicionados 20 μ L de solução de p-NPG (10mM em tampão fosfato) a fim de iniciar a reação enzimática. A absorbância foi medida a cada 30 s durante 35 min com um fotômetro para microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) conectado ao *software* SkanIt versão 2.5.1 a fim de obter-se a taxa de clivagem (Δ AU/s) a partir da curva cinética. A inibição da enzima foi calculada conforme Equação (3.46):

$$\% \text{inibição} = (\text{taxa}_{\text{branco}} - \text{taxa}_{\text{amostra}}) / \text{taxa}_{\text{branco}} \times 100 \quad (3.46)$$

O procedimento para o ensaio de inibição de α -amilase foi similar ao utilizado com a α -glicosidase. 10 μ L de extrato dissolvido em DMSO foi adicionado em cada poço juntamente com 90 μ L de tampão fosfato (0,1 M, pH 6, 0,02% NaN₃). Subsequentemente, 80 μ L de solução de α -amilase (2,0 U/mL em tampão fosfato) foi adicionado em cada poço e a microplaca foi incubada a 37 °C por 10 min. A reação foi iniciada pela adição de 20 μ L de solução de substrato (CNP-G3, 10 mM em tampão fosfato). A absorbância foi medida a 405 nm a cada 3 min por 30 min e a porcentagem de inibição da enzima foi calculada utilizando a mesma fórmula utilizada no ensaio de inibição da α -glicosidase.

O ensaio PTP1B foi realizado a 25 °C em um volume final de 180 μ L, usando um tampão contendo Tris 50 mM, Bis-Tris 50 mM e NaCl 0,1 M (o pH foi ajustado para 7,0 com ácido cítrico). As amostras foram dissolvidas em 18 μ L de DMSO seguido pela adição de 52 μ L de solução de EDTA (3,46 mM no tampão acima), 60 μ L de solução de substrato (1,5 mM de p-NPP e 6 mM de DTT) e incubadas por 10 min a 25 °C. 50 μ L 0,001 μ g/ μ L de solução estoque de PTP1B foram

adicionados a cada poço para iniciar a reação. A absorbância foi medida a 405 nm a cada 30 s por 10 min e a porcentagem de inibição da enzima foi calculada com a mesma Equação descrita para o ensaio de inibição da α -glicosidase.

3.15.3 Separação por CLAE em escala analítica e perfil de inibição de alta resolução de α -glicosidase

A solução de extrato foi separada por CLAE e fracionada em microplacas de 96 poços usando um instrumento da série Agilent 1200 (Santa Clara, CA, EUA) que consiste em um amostrador automático de alto desempenho G1367C, uma bomba quaternária G1311A, um desgaseificador G1322A, um compartimento de coluna termostaticado G1316A, um detector de arranjo de fotodíodos G1315C e um coletor de frações G1364C, todos controlados pelo software Agilent ChemStation ver. B.03.02. A separação foi realizada a 40 °C em uma coluna de fase reversa Phenomenex Luna C₁₈(2) (150 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 3 μ m, tamanho de poro 100 Å; Phenomenex, Torrance, CA, EUA), usando uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min com uma combinação de solvente A (H₂O-Acetonitrila 95:5 contendo 0,1% de ácido fórmico) e solvente B (H₂O-Acetonitrila 5:95 contendo 0,1% de ácido fórmico).

O volume injetado, a concentração da amostra e o perfil do gradiente de eluição da fase móvel de cada análise serão mostrados na seção de resultados, visto que diversos métodos foram utilizados com o objetivo de obter melhores resultados. Um total de 176 frações foram coletadas nas microplacas, e todas as frações foram testadas quanto à atividade inibitória da enzima α -glicosidase conforme descrito anteriormente. A inibição da α -glicosidase foi plotada contra o tempo de retenção cromatográfico, resultando em um biocromatograma de alta resolução.

3.15.4 Experimentos de CLAE-EMAR e RMN

As análises de cromatografia líquida de alta resolução acoplada com espectrômetro de massas de alta resolução (CLAE-EMAR) foram realizados em um sistema Agilent 1260 que consiste em um desgaseificador, uma bomba quaternária,

um amostrador automático e um arranjo de diodos, acoplado a um espectrômetro de massa Bruker micrOTOF-Q II (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). As separações foram realizadas com a mesma coluna, temperatura e gradiente de solvente descritos anteriormente. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo e negativo e uma solução de cluster de formiato de sódio foi automaticamente injetada para permitir a calibração de massa interna.

Os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizados em um instrumento Bruker Avance III de 600 MHz (frequência operacional de 600,13 MHz) equipado com um trocador de amostra Bruker SampleJet (Bruker Biospin, Karlsruhe, Alemanha) e uma cabeça de sonda TCI de 1,7 mm resfriada criogenicamente. Todos os experimentos de RMN foram realizados em automação (equilíbrio de temperatura para 300 K, otimização de parâmetros de bloqueio, gradiente de shimming e configuração de ganho do receptor). IconNMR ver. 4.2 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) foi usado para controlar a mudança automática da amostra e aquisição de dados de RMN. Topspin ver. 3.5 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Alemanha) foi usado para aquisição e processamento de dados de RMN.

Os dados de ^1H NMR foram transformados por Fourier com pontos de dados de 64 k e um fator de alargamento de linha de 0,3 Hz. Distorções de fase e linha de base foram corrigidas manualmente e o eixo de deslocamento químico foi calibrado para TSP interno (d 0,0).

3.15.5 Análise por componentes principais dos cromatogramas de CLAE e dos espectros de RMN

As análises por componentes principais (PCA – abreviação do inglês *Principal Component Analysis*) foram realizadas nos cromatogramas de CLAE nos espectros de RMN de ^1H de 19 diferentes extratos de folhas de *Eugenia pyriformis*. Para a análise CLAE-EMAR, os 19 extratos diferentes foram dissolvidos em metanol e, além disso, cinco dos extratos (1, 4, 9, 15 e 17) também foram dissolvidos em isopropanol antes da injeção, resultando em um total de 24 amostras. Os valores de IC_{50} (concentração mínima para inibir 50% da enzima utilizada) para a atividade de inibição da α -glicosidase e α -amilase foram incluídos nas análises.

Os cromatogramas de CLAE-EMAR foram processados em MatLab R2017a (MathWorks). Por meio do algoritmo icoshift, os dados foram referenciados ao calibrante formiato de sódio em cerca de 0,4 minutos (SAVORANI 2010). Os PCAs foram realizados por meio do *software* SIMCA 14.1 (Umetrics, Umeå, Suécia). Os cromatogramas eram centrados na média ou centrados na média e dimensionados em escala de Pareto antes da realização dos PCAs. A validação cruzada foi realizada por iteração sete vezes com a sétima amostra removida da análise.

Como realizado com os dados de CLAE-EMAR, os espectros de RMN de ^1H foram processados em MatLab R2017a (MathWorks). O algoritmo icoshift foi aplicado para calibrar os espectros para DMSO residual em cerca de 2,5 ppm, e para o alinhamento dos espectros de RMN de ^1H por co-deslocamento de intervalos selecionados (SAVORANI 2010). Os espectros de ^1H NMR foram analisados na região 0,4-12,8 ppm, excluindo o pico de água residual em 3,1-3,7 ppm e DMSO residual em 2,46-2,53 ppm. Antes do processamento no SIMCA, os espectros de RMN de ^1H foram normalizados para o peso de cada amostra para reduzir o efeito das diferenças de concentração entre as amostras. Os PCAs foram realizados em espectros de RMN de ^1H centrados na média e em espectros centrados na média e em escala de UV ou de Pareto. A validação cruzada foi realizada por iteração sete vezes com cada sétima amostra removida da análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados os resultados da caracterização inicial das amostras, dos rendimentos globais dos cinco métodos de extração, bem como as quantificações de α -amirina e β -amirina. Também são apresentados os resultados das análises estatísticas para verificação das variáveis que influenciam no rendimento global das extrações.

4.1 Caracterização do material vegetal

Os resultados da análise de granulometria das folhas de uvaia depois de trituradas são apresentados na Tabela 4.1. A partir do peneiramento, formou-se uma nova classificação do tamanho de partícula da amostra juntando-se partes iguais das frações retidas nas peneiras 28, 35 e 48 mesh. Essa nova mistura de partículas foi caracterizada quanto ao tamanho de partícula utilizando um analisador de tamanho de partículas por difração a laser que resultou em um diâmetro médio de $0,602 \pm 0,019$ mm.

Tabela 4.1 - Distribuição Granulométrica das folhas de Uvaia após secagem e moagem

Mesh	Abertura das peneiras passagem/retenção (mm)	Diâmetro médio (mm)	Amostra retida (% m/m)
9/16	2,000 / 1,000	1,500	4,01
16/20	1,000 / 0,850	0,925	11,46
20/28	0,850 / 0,600	0,725	15,88
28/35	0,600 / 0,425	0,512	17,61
35/48	0,425 / 0,300	0,362	10,50
Fundo	-	<0,300	40,54

As amostras analisadas resultaram com umidade média de $7,04 \pm 0,27$ (% m/m). Verifica-se que a umidade das folhas é relativamente baixa. A umidade do material é um parâmetro importante, visto que os resultados que levam em conta a massa de material vegetal são expressos em relação à massa seca de folhas. Além disso, a secagem faz cessar o metabolismo vegetal e o crescimento microbiano.

Outro fator importante determinado na caracterização do material vegetal é a densidade das partículas utilizadas. Para as partículas utilizadas nas extrações, a densidade determinada por picnometria a gás Hélio foi de $1,40 \pm 0,004$ g.cm⁻³. Este valor é necessário na etapa de modelagem matemática fenomenológica.

4.2 Extração com fluido supercrítico

Neste tópico são apresentados os resultados experimentais das extrações de folhas de uvaia utilizando dióxido de carbono supercrítico. São demonstrados os efeitos dos fatores envolvidos na extração sobre as variáveis resposta: rendimento global da extração, concentração de amirinas (massa de amirinas por massa de extrato) e rendimento de amirinas (massa de amirinas por massa de matéria-prima), bem como a influência da vazão de CO₂ supercrítico e do tamanho de partícula do material vegetal.

Da mesma forma como em estudo anterior (KLEIN, 2016), o extrato obtido pela extração com fluido supercrítico apresentou-se na forma de pó com grânulos finos resinosos, diferente da maioria dos extratos obtidos com essa técnica, que geralmente se encontram na forma líquida (óleos ou óleos resinosos) (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014). Na Figura 4.1 é apresentada a aparência do extrato de folhas de uvaia obtido por extração com fluido supercrítico.

Figura 4.1 - Aspecto visual dos extratos de Uvaia obtidos na EFS.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Acredita-se que o aspecto físico do extrato em forma de pó deve-se ao fato dele possuir altas proporções de compostos químicos que são sólidos a temperatura ambiente, sendo que a faixa de temperatura de fusão para α -amirina está entre 184 e 186 °C e para a β -amirina está entre 189 e 191 °C (VÁZQUEZ; PALAZON; NAVARRO-OCANÃ, 2012). Todos os extratos obtidos com fluido supercrítico apresentaram tonalidade próxima ao amarelo.

4.2.1 Rendimento global de extrato obtido por EFS

As condições experimentais de temperatura e pressão selecionadas garantem uma ampla variação dos parâmetros dentro dos limites operacionais do equipamento utilizado. A vazão de CO₂ foi mantida constante ($2,0 \times 10^{-3}$ kg min⁻¹), o tempo de extração foi o mesmo para todos os experimentos (180 minutos). Para evitar resultados tendenciosos, os experimentos foram realizados em ordem aleatória. Na

Tabela 4.2 são apresentados os resultados, em termos de rendimento global, das extrações nas condições determinadas pelo planejamento experimental.

Tabela 4.2 - Condições do operacionais das EFS e seus respectivos rendimentos globais

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade CO ₂ (kg m ⁻³)	Rendimento global (%)*	m extrato / m CO ₂ (g kg ⁻¹)
1	150	60	604,61	0,94	0,34
2	150	80	427,52	0,33	0,12
3	200	60	724,11	1,65	0,61
4	200	80	594,31	1,46	0,53
5	175	70	598,56	0,94	0,35
6	175	70	598,56	0,92	0,34
7	175	70	598,56	0,96	0,35

*Os rendimentos globais são expressos em base seca

A partir dos dados apresentados na Tabela 4.2 observa-se que na pressão de 150 bar, o rendimento global diminui de 0,94 para 0,33% com o aumento da temperatura de 60 para 80 °C. Nas extrações realizadas na pressão de 200 bar, o rendimento global reduziu de 1,65 para 1,46% com o aumento da temperatura de 60 para 80 °C.

Em relação ao consumo de CO₂ por massa de extrato obtido, a condição de 200 bar e 60 °C mostrou-se superior às demais condições por ser possível obter 0,61 grama de extrato por quilo de CO₂ consumido.

As diferenças nos rendimentos globais obtidos ao utilizar diferentes condições experimentais estão condizentes com os fundamentos da extração com fluido supercrítico, pois a variação de temperatura e pressão resulta em diferentes

valores de poder de solvatação, difusividade e viscosidade e o efeito desses parâmetros sobre o processo é bastante complexo (CAVALCANTI; MEIRELES, 2012)

Para determinar os efeitos das variáveis (temperatura e pressão) sobre o rendimento global da extração utilizou-se o programa computacional *Statistica 7* (STATSOFT). Para isso, foram considerados modelos lineares com intervalo de confiança de 95%. Na Tabela 4.3 são apresentados os efeitos das variáveis sobre o rendimento global da extração.

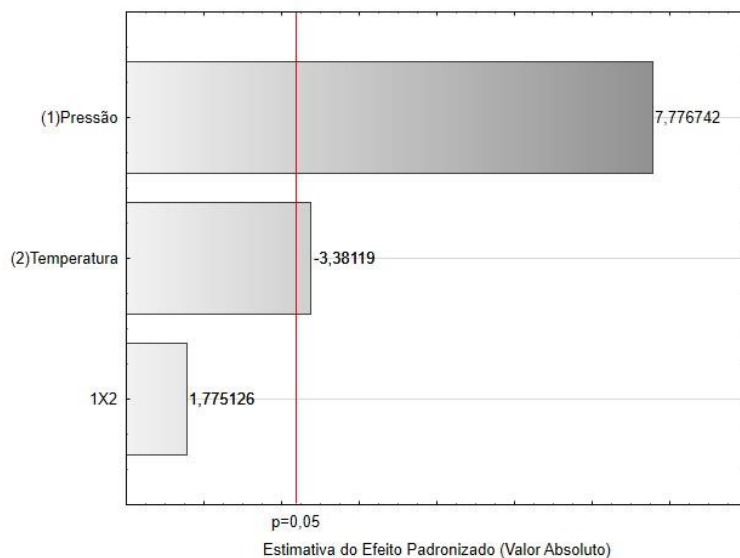
Tabela 4.3 – Tabela de efeitos para as variáveis pressão e temperatura no rendimento global da EFS

	Efeito	p-valor*
Média/Intercepto	1,0286	0,0002
Pressão	0,9200	0,0044
Temperatura	-0,4000	0,0430
PxT	0,2100	0,1740

*significância estatística $p < 0,05$

Observa-se que os efeitos da pressão e da temperatura são significativos. O efeito da pressão é positivo, o que explica o aumento do rendimento global quando são utilizadas pressões maiores, de forma antagônica o efeito da temperatura é negativo, sendo assim, ocorre a diminuição do rendimento global em condições com temperaturas maiores. Já o efeito da interação dos dois fatores não se mostrou significativo no intervalo de valores investigado. Na Figura 4.2 é apresentado o gráfico de Pareto que permite visualizar com clareza os efeitos das variáveis do planejamento sobre o rendimento global da extração supercrítica.

Figura 4.2 - Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis pressão e temperatura no rendimento da EFS.



O gráfico de Pareto permite a confirmação da significância dos efeitos principais e suas interações. É possível confirmar os efeitos estatisticamente significativos das variáveis isoladas e de suas interações localizados à direita da linha tracejada, que indica ponto de significância dos resultados ($p \leq 0,05$).

Observa-se que o efeito da pressão foi o mais importante para o rendimento global das extrações com fluido supercrítico. A influência desse parâmetro foi positiva, significando que, o aumento quantitativo dessa variável implica no aumento do rendimento global da extração, ou seja, quanto maior a pressão utilizada durante a extração, maior deve ser o rendimento global.

A validação do modelo foi realizada pelo teste “F”, obtido a partir da análise de variância (ANOVA). Na Tabela 4.4 são apresentados os valores obtidos a partir da ANOVA, observando-se que o F_{calc} é maior do que o F_{tab} , o modelo é válido no nível de significância de 5% e representa bem os resultados experimentais obtidos, dentro da faixa estabelecida nos níveis para as variáveis em estudo para a resposta rendimento global. O modelo codificado obtido pela regressão linear é apresentado na Equação 4.1, sendo que ele explica 96,16% das variações entre os valores experimentais e os previstos, indicando boa concordância.

Tabela 4.4 – ANOVA do modelo cuja resposta é rendimento global da EFS

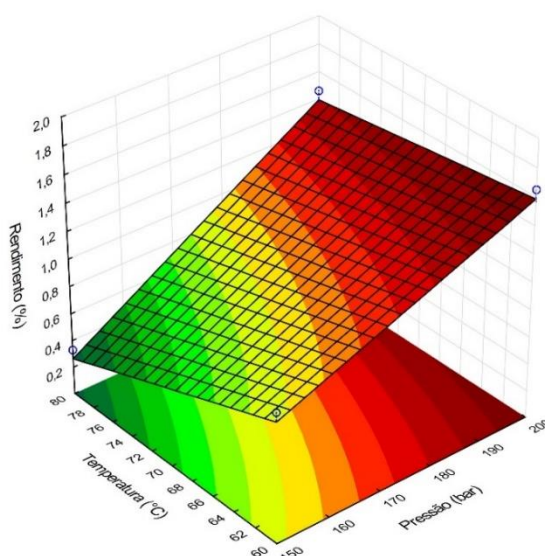
Causas de variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab} *
Modelo	1,0505	3	0,3502	25,0143	9,2766
Resíduos	0,0420	3	0,0140		
Total	1,0925	6			

R^2 : 0,9616 R^2_{adj} : 0,9231 *F_{tab}(3;3;0,05)
 SQ: Soma Quadrática; GL: Graus de Liberdade; MQ: Média Quadrática

$$Rendimento (\%) = 1,0286 + 0,46P - 0,20T + 0,1050PT \quad (4.1)$$

A Figura 4.3 apresenta a superfície de resposta para o rendimento global da extração com fluido supercrítico, a partir da variação da pressão e temperatura. Pode-se observar na superfície de resposta que para os níveis das variáveis estudados, os maiores rendimentos globais são obtidos na região de alta pressão e baixa temperatura, sendo que o experimento realizado na condição de maior pressão e menor temperatura (200 bar e 60 °C) apresentou o maior rendimento global (1,65 % m/m).

Figura 4.3 - Superfície de resposta para o rendimento global da EFS.



4.2.2 Curvas cinéticas obtidas nos experimentos do planejamento experimental

A partir da pesagem periódica do extrato acumulado no frasco de coleta foram construídas as curvas cinéticas do processo de extração com fluido supercrítico. Na Figura 4.4 são apresentadas as curvas cinéticas obtidas nas condições utilizadas no planejamento experimental, sendo que a condição referente ao ponto central (175 bar e 70 °C) é apresentada na forma de média das três repetições realizadas acrescentada da barra de erro referente ao desvio padrão calculado. Entretanto, para melhor compreensão do comportamento de cada extração a Figura 4.5 apresenta as cinéticas individuais de cada condição de extração. Em todas as condições, observa-se que a variação da massa acumulada é muito pequena quando a extração se aproxima do tempo final de extração, o que pode indicar o esgotamento dos compostos extraíveis para extração naquela condição.

Figura 4.4 - Curvas cinéticas das EFS das condições utilizadas no planejamento experimental.

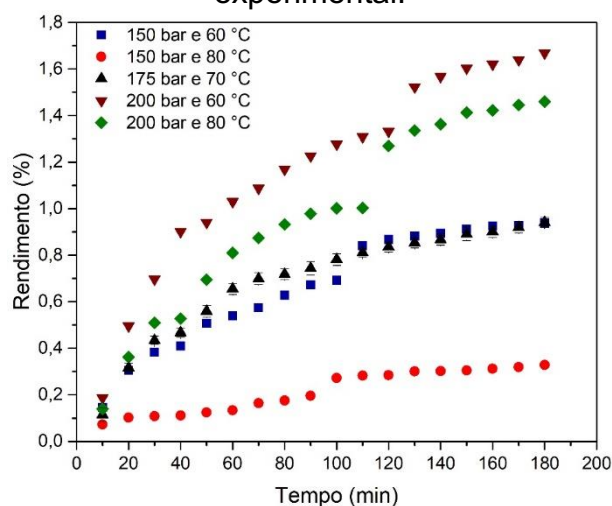
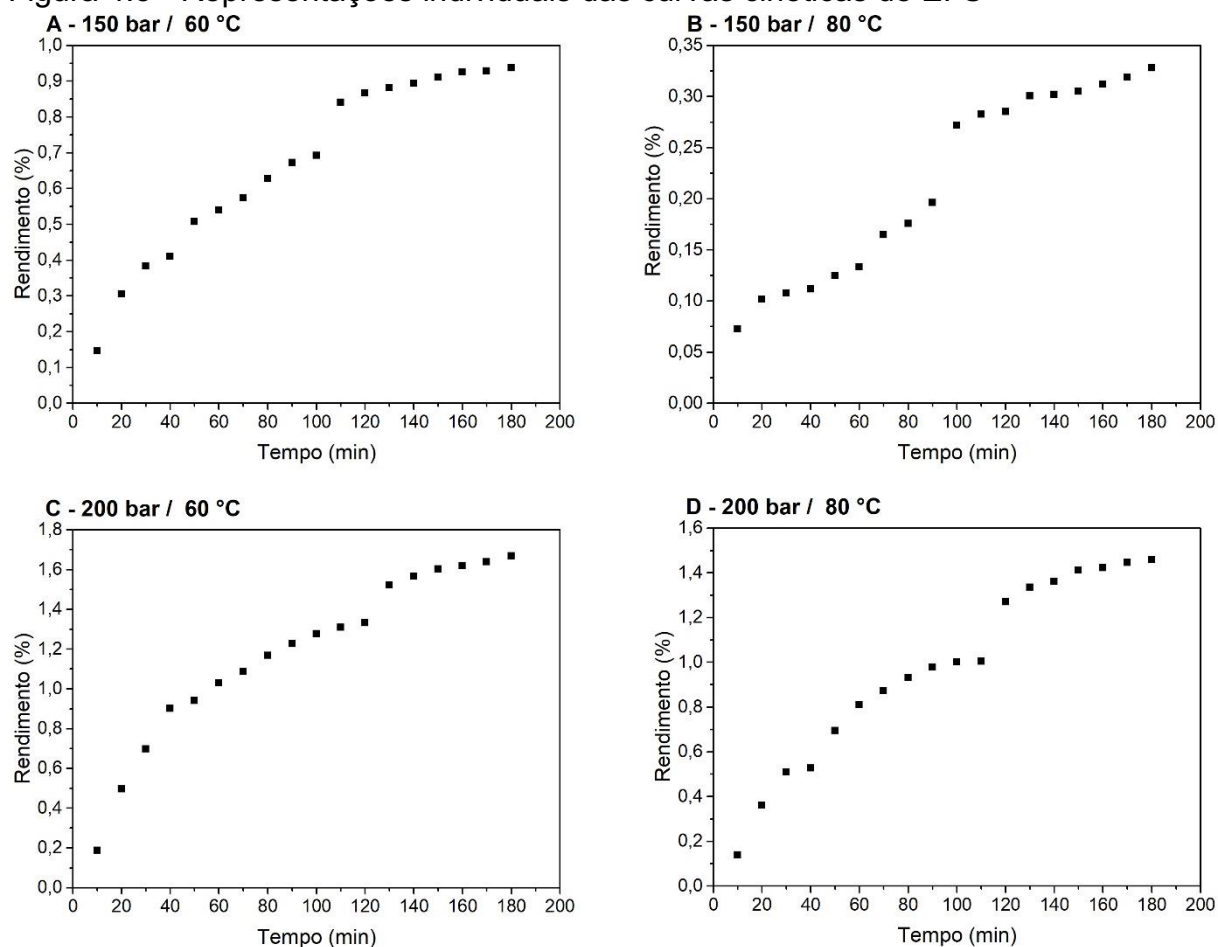
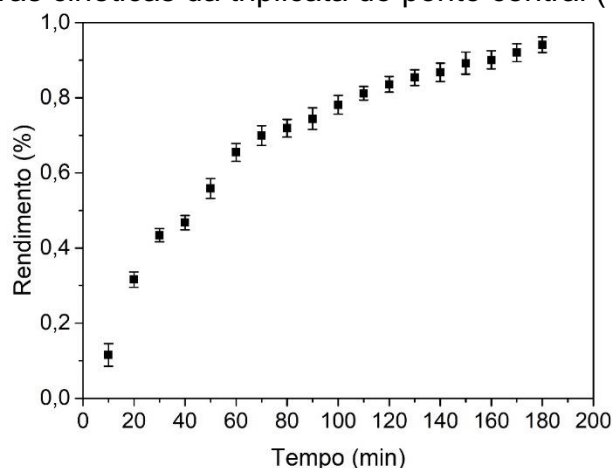


Figura 4.5 - Representações individuais das curvas cinéticas de EFS



Na Figura 4.6 é apresentada a curva cinética com a média das três replicatas realizadas nas condições do ponto central do planejamento experimental, juntamente com as barras de desvio padrão. Observa-se que os pontos apresentam desvios padrões pequenos, indicando que as curvas cinéticas foram similares e com boa reprodutibilidade do processo de extração no módulo experimental utilizado. O desvio médio calculado foi de 4,66%.

Figura 4.6 - Curvas cinéticas da triplicata do ponto central (175 bar e 70 °C).



As curvas de extração com CO₂ apresentam geralmente um comportamento com três regiões distintas: a primeira com taxa de extração constante, referente ao extrato de fácil acesso, sendo que nessa região o processo é controlado pela difusão no filme externo. Na segunda região, a taxa de extração decai progressivamente até a exaustão do extrato acessível. Já no terceiro período, ocorre a extração de difícil acesso, processo controlado pela difusão interna (SOVOVÁ, 1994). Entretanto, esse comportamento não foi observado nas cinéticas de extração deste estudo, as cinéticas de extração apresentam dois a três estágios diferentes de extração, contudo, foi observado de forma muito semelhante em um estudo realizado anteriormente para obtenção de extratos de *E. pyrifomis* com CO₂ supercrítico em outras condições de temperatura e pressão (KLEIN, 2016).

4.2.3 Modelagem matemática das cinéticas de extração utilizando modelos empíricos

Em função do comportamento atípico das curvas de extração foram testados os modelos empíricos descritos na Seção 2.2.1.2 para descrever as cinéticas de extração e o conjunto de parâmetros destes modelos são mostrados na Tabela 4.5. Para cada condição experimental são gerados três valores para cada parâmetro, referentes aos três estágios em que as curvas cinéticas de extração estão divididas, visto que os modelos foram alterados para levar em consideração essas três etapas.

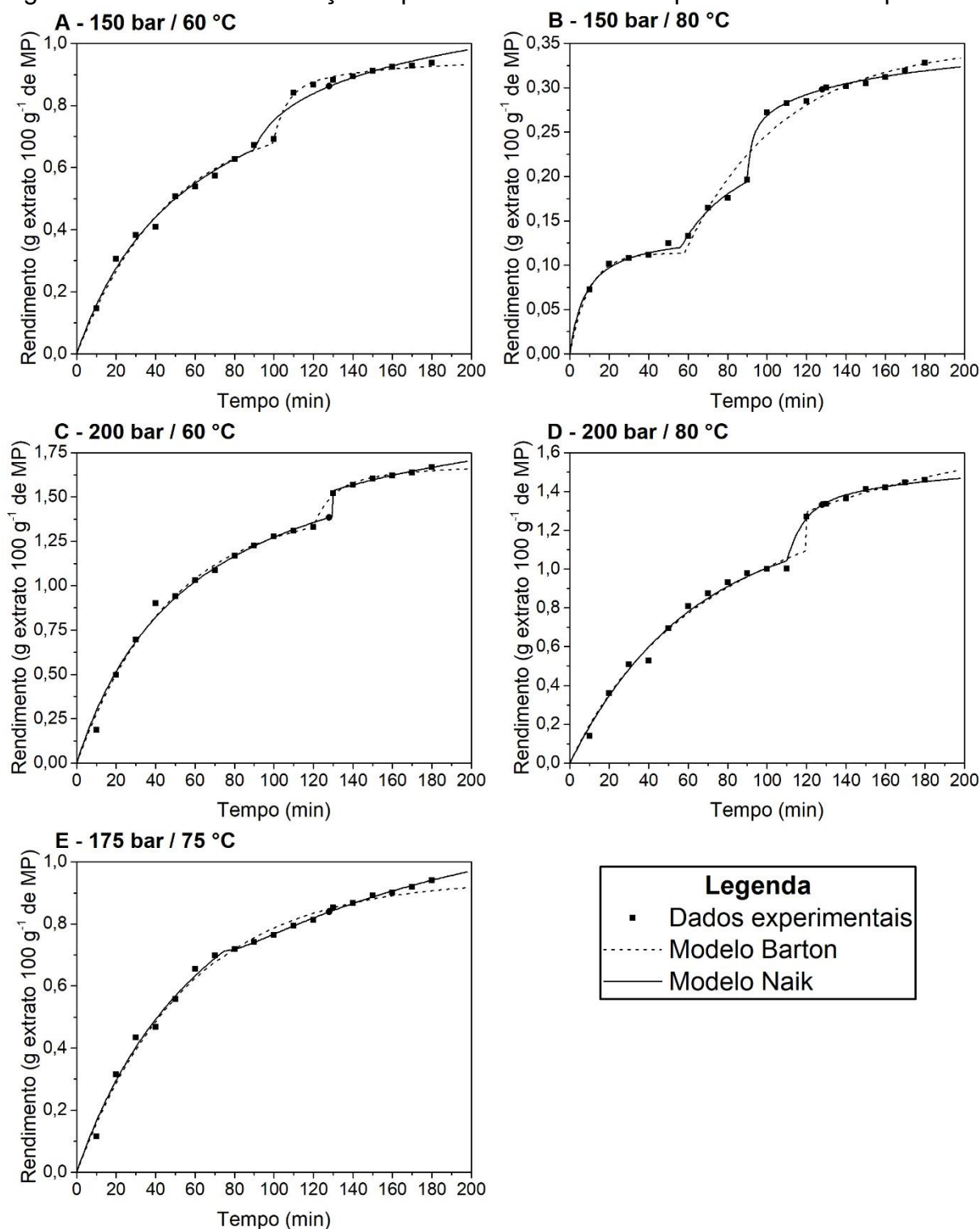
Caso a cinética experimental não tenha apresentado os três estágios, a modelagem foi realizada considerando a quantidade de estágios naquela condição. Sendo assim, cinéticas com dois estágios terão somente dois valores para cada parâmetro ajustado e cinéticas com somente um estágio terão somente um valor para cada parâmetro. Na Figura 4.7 são apresentadas as curvas cinéticas com os valores experimentais, juntamente com as curvas estimadas pelos modelos.

Tabela 4.5 - Parâmetros ajustáveis obtidos nos modelos fenomenológicos para a extração com fluido supercrítico

Condição experimental	Modelo			
	Naik		Barton	
	y_0	b	y_0	b
150 bar	1,0889	0,01698	0,76890	0,02137
60 °C	0,15797	0,07133	0,17383	0,15236
150 bar	0,13785	0,11919	0,11375	0,10395
80 °C	0,14731	0,00255	0,023355	0,02022
	0,07739	0,46944		
200 bar	2,00871	0,01730	1,44167	0,02130
60 °C	0,14614	425,89794	0,23775	0,10878
200 bar	1,87834	0,01163	1,25033	0,01629
80 °C	0,20146	13332.23484	0,26683	0,12056
175 bar	1,46724	0,01263	0,94893	0,01797
70 °C	0,09364	0,04979		

y_0 : quantidade de extrato disponível em cada etapa de extração; b : velocidade de extração.

Figura 4.7 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos empíricos



Na Tabela 4.6 são apresentados os parâmetros de comparação entre os modelos utilizados no que diz respeito à qualidade do ajuste.

Tabela 4.6 - Parâmetros de comparação dos modelos utilizados nas cinéticas de extração

Condição experimental	Modelo	Erro médio	Soma Quadrática dos erros	Critério de Informação de Akaike (AIC)
150 bar 60 °C	Naik	3,32	$9,48 \times 10^{-3}$	-73,84
	Barton	2,41	$4,42 \times 10^{-3}$	-87,58
150 bar 80 °C	Naik	1,74	$2,90 \times 10^{-4}$	-130,61
	Barton	4,14	$2,60 \times 10^{-3}$	-97,12
200 bar 60 °C	Naik	4,44	$1,98 \times 10^{-2}$	-60,62
	Barton	3,87	$1,58 \times 10^{-2}$	-64,61
200 bar 80 °C	Naik	4,56	$1,51 \times 10^{-2}$	-65,47
	Barton	4,23	$1,26 \times 10^{-2}$	-68,70
175 bar 70 °C	Naik	4,03	$5,32 \times 10^{-3}$	-84,25
	Barton	4,77	$9,23 \times 10^{-3}$	-80,33

O critério de informação de Akaike (AIC) é uma medida da qualidade do ajuste baseada na máxima verossimilhança. Na comparação de modelos, o modelo com menor valor de AIC é definido como o que apresenta melhor ajuste aos dados (COSTA; SOUSA LOBO, 2001). Portanto, observa-se que o modelo de Naik ajustou-se melhor às curvas cinéticas de extração nas condições de 150 bar/80 °C e 175 bar/70 °C. Já o modelo de Barton, ajustou-se melhor aos dados experimentais das condições 150 bar/60 °C, 200 bar/60 °C e 200 bar/80 °C.

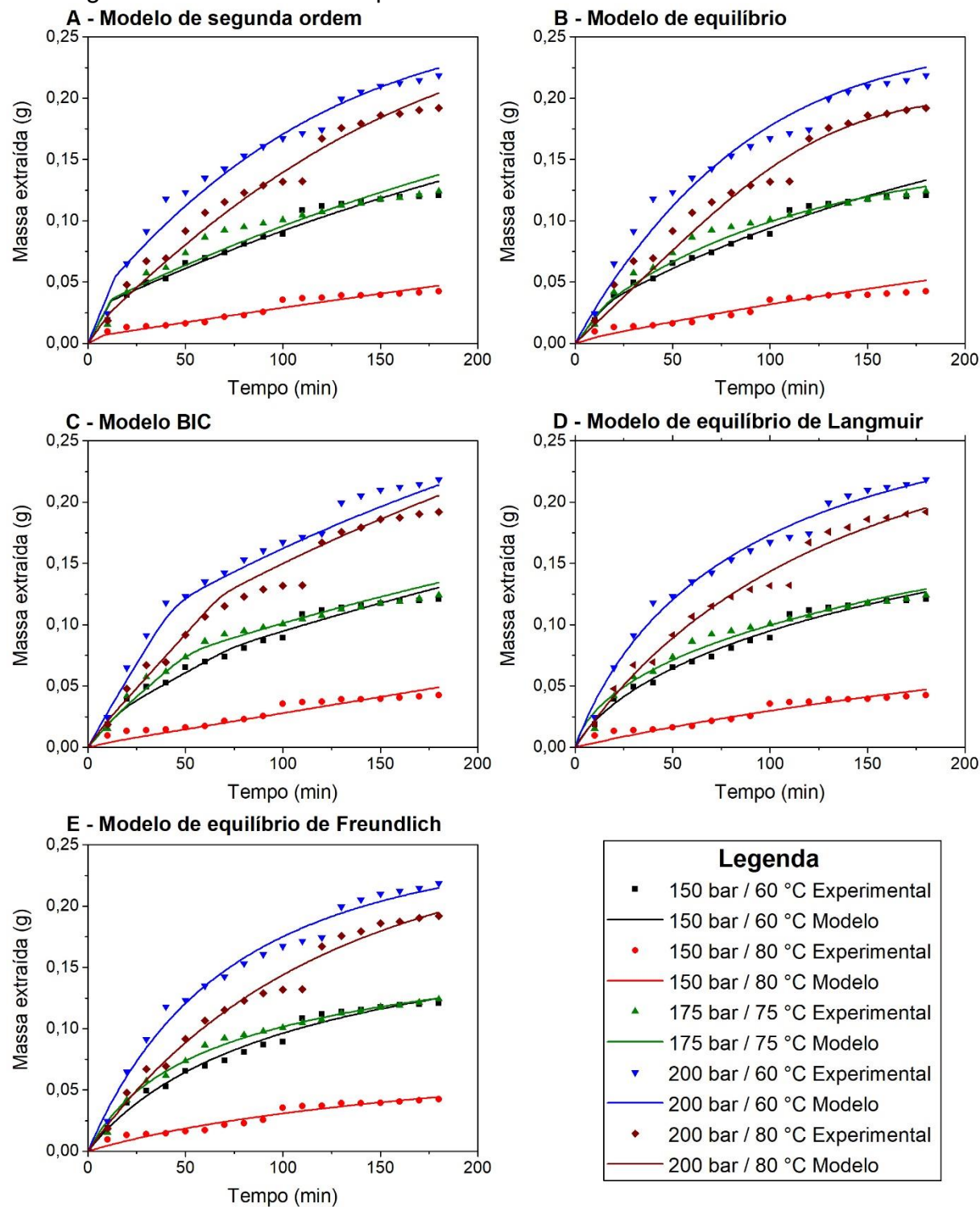
4.2.4 Modelagem matemática das cinéticas de extração utilizando modelos fenomenológicos

Foram avaliados 3 modelos fenomenológicos disponíveis na literatura (2ª ordem, equilíbrio, BIC) e foi desenvolvido um novo modelo baseado nas equações de equilíbrio de Freundlich. A Tabela 4.7 apresenta os valores dos parâmetros ajustados e a avaliação estatística dos modelos testados para descrever a cinética de extração. Por sua vez, na Figura 4.8 são ilustradas as cinéticas de extração experimental e a calculada para os modelos utilizados.

Tabela 4.7 - Parâmetros ajustados e avaliação estatística dos modelos testados

Modelo	Parâmetros	150 bar 60 °C	150 bar 80 °C	170 bar 75 °C	200 bar 60 °C	200 bar 80 °C
Segunda ordem	k (m ³ /kg min)	0.0041	0.0067	0.0043	0.008	0.0165
	R ²	0.976	0.955	0.942	0.983	0.982
	ME (%)	6.79	9.7	12.82	7.39	8.07
	AIC	-510.8	-535.6	-492.3	-522.6	-493.5
		$\overline{R^2} = 0.968, \overline{ME} = 8.95\%, \text{ and } \overline{AIC} = -510.96$				
Equilíbrio	D _i (m ² /s × 10 ¹⁴)	6.39	3.08	13.04	40	528.3
	k _p (-)	0.2	0.01	0.2	0.016	0.035
	R ²	0.983	0.954	0.98	0.98	0.978
	ME (%)	4.62	14.73	7.38	7.21	9.96
	AIC	-512.8	-520.3	-508.7	-511	-484.4
		$\overline{R^2} = 0.975, \overline{ME} = 8.78\%, \text{ and } \overline{AIC} = -507.43$				
BIC	k _{fa} (s ⁻¹ × 10 ³)	0.479	1.05	1.062	2	2.049
	k _{sa} (s ⁻¹ × 10 ⁴)	0.097	0.097	0.098	0.167	0.174
	R ²	0.982	0.943	0.986	0.993	0.981
	ME (%)	5.5	15.54	5.76	5.81	7.67
	AIC	-510.5	-518.9	-509.2	-516.7	-485.6
		$\overline{R^2} = 0.977, \overline{ME} = 8.06\%, \text{ and } \overline{AIC} = -508.18$				
Modelo baseado nas equações de equilíbrio de Freundlich	k _F (min ⁻¹)	0.176	0.0659	0.0903	1.4436	5.6727
	n	3.0806	6.6892	4.0651	1.4522	1.1922
	R ²	0.986	0.953	0.993	0.988	0.985
	ME (%)	5.08	12.98	5.23	5.95	6.04
	AIC	-518.6	-534	-531.6	-528.3	-499.7
		$\overline{R^2} = 0.981, \overline{ME} = 7.06\%, \text{ and } \overline{AIC} = -522.43$				
Modelo baseado nas equações de equilíbrio de Langmuir	q _{max} (g/g)	0.0215	0.0248	0.0199	0.0316	0.0574
	b (mL/g)	35.813	49.996	70.241	9.4684	3.274
	R ²	0.981	0.954	0.981	0.99	0.985
	ME (%)	4.95	13.54	8.29	5.89	6.07
	AIC	-519.6	-107.1	-513.7	-531.4	-103.8
		$\overline{R^2} = 0.978, \overline{ME} = 7.75\%, \text{ and } \overline{AIC} = -355.10$				

Figura 4.8 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos: A – modelo de segunda ordem, B – modelo de equilíbrio, C – modelo BIC, D – Modelo de equilíbrio de Langmuir e E – modelo de equilíbrio de Freundlich



A análise da Tabela 4.7 e da Figura 4.8 permite concluir que os cinco modelos matemáticos testados representaram adequadamente a cinética experimental de extração das folhas de uvaia, utilizando CO₂ supercrítico, todos com R² superior a 0,967 e ME inferior a 8,96%. Dentre os cinco, foi o modelo baseado nas equações de equilíbrio de Freundlich que conduziu aos melhores resultados estatísticos médios, R² de 0,981 e ME, de 7,06%.

Por sua vez, os modelos de segunda ordem, de equilíbrio e de BIC apresentaram ME de 8,95, 8,78 e 8,06%. Esses resultados são condizentes com o critério de seleção de Akaike, AIC, que resultou em valor médio mais negativo para o modelo baseado nas equações de equilíbrio de Freundlich, -518,88.

O modelo de segunda ordem subestimou a massa extraída nos estágios iniciais e intermediários da operação de extração. Já nos estágios finais, a massa foi superestimada. Fato semelhante foi observado para os estágios iniciais e intermediários para o modelo de equilíbrio. Porém, este modelo se ajustou melhor aos estágios finais da extração.

De modo geral, a extração conduzida a 200 bar foi a melhor representada pelos modelos testados. Essa também foi a condição que produziu maior quantidade extrato em 180 min de experimentos, 0,2186 e 0,1921 g, para 60 e 80 °C, respectivamente.

Para o modelo de segunda ordem, o coeficiente ajustado, k , variou entre 0,0067 e 0,0165 m³/kg min, respectivamente para 150 bar e 200 bar, ambos para 80 °C, mesma ordem de grandeza daqueles obtidos para a extração a partir de *Piper regnelli* (LEMOS et al., 2012), e de *Calophyllum brasiliense* Cambess (GONÇALVES et al., 2013). O valor do parâmetro k está associado à taxa de extração, e foi condizente com os resultados experimentais da cinética de extração.

Por sua vez, para o modelo de equilíbrio, os valores ajustados para o coeficiente de difusão interna, D_i , variaram entre 3,08 e 528,30 × 10⁻¹⁴ m²/s, respectivamente para 150 bar e 200 bar, ambos a 80 °C. Esses valores são comparáveis àqueles obtidos para a extração a partir de *Baccharis trimera* (VARGAS et al., 2006), e de *Humulus lupulus* L. (KUPSKI et al., 2017). Considerando os casos estudados, os valores estimados do coeficiente de partição, k_p , variaram entre de 0,01 e 0,200. Apesar de ter sido feito o ajuste matemático de k_p , o modelo de equilíbrio não

se ajustou adequadamente a todas as condições experimentais. Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de k_p não ser constante ao longo da extração (KUPSKI et al., 2017).

Da Figura 4.8 C, pode ser verificado que o ajuste dos valores estimados pelo modelo BIC representou adequadamente a cinética de extração. O coeficiente de correlação, R^2 , confirma esse comportamento. O valor estimado para a fração de extrato de difícil acesso, r_k , foi mantido constante em 0,760 por se tratar de um parâmetro físico e deve apresentar o mesmo valor para todas as extrações com a mesma matéria-prima. As estimativas dos coeficientes globais de transferência de massa, k_{fa} e k_{sa} , variaram entre $0,011$ e $0,149 \text{ s}^{-1} \times 10^{-3}$, e $0,010$ e $0,327 \text{ s}^{-1} \times 10^{-4}$, todos condizentes com a faixa reportada na literatura (GROSSO et al., 2010). Considerando que valor de k_{sa} foi acrescido com o aumento da pressão, e, como o aumento desta provoca redução da densidade do solvente, e consequentemente a vazão volumétrica aumenta, pode-se dizer que a massa extraída é dependente da convecção na fase fluida (GROSSO et al., 2010)(GROSSO et al., 2010)(GROSSO et al., 2010)(GROSSO et al., 2010)(GROSSO et al., 2010).

Para o modelo baseado na equação de equilíbrio de Langmuir (Figura 4.8 D), a capacidade máxima de adsorção, q_{max} , variou de 0,0199 a 0,0575 g/g, no ponto central e no extremo, 200 bar a 80 °C. Em contrapartida, para o parâmetro ajustável b , os valores variaram de 3,2740 a 70,241 mL/g, nos valores máximos de temperatura e pressão e no ponto central, respectivamente.

Por fim, para o modelo baseado nas equações de equilíbrio de Freundlich, o valor do parâmetro k_F da Isoterma de Freundlich, variou entre 0,0659 e 5,6727, respectivamente para 150 bar e 80 °C e 200 bar e 80 °C. De modo que o incremento na pressão, sob temperatura constante, resultou em incremento no valor do parâmetro. Já para o parâmetro ajustável n da Isoterma Freundlich, a redução da pressão do CO_2 resultou em redução do valor do parâmetro, que variou entre 1,1922 e 6,6892.

4.2.5 Avaliação de efeitos secundários sobre o rendimento global da EFS

Para melhor compreender o processo de extração com fluido supercrítico, foram avaliados outros fatores que interferem no rendimento e na taxa de extração. Foram avaliadas as influências do tamanho das partículas de folhas (0,362 mm e 0,725 mm) e da vazão de CO₂ supercrítico ($1,5 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$ e $2,5 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$).

A condição experimental utilizada neste conjunto de experimentos foi determinada a partir dos resultados do planejamento experimental e que forneceu o maior rendimento global, neste caso: 200 bar e 60 °C. Assim como nas extrações do planejamento experimental, os testes adicionais foram realizados com 180 minutos de extração, os resultados podem ser observados na Tabela 4.8.

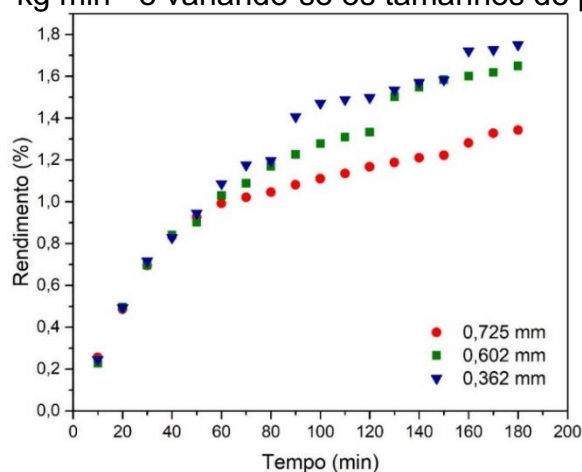
Tabela 4.8 – Efeitos do tamanho de partícula sobre o rendimento global da extração com fluido supercrítico

Diâmetro médio (mm)	Rendimento global (% m/m)*
0,725	1,34
0,602	1,65
0,362	1,75

*Os rendimentos globais são expressos em base seca

Nota-se que a diminuição do tamanho médio das partículas favorece a extração, possibilitando a obtenção de maiores rendimentos globais. Tal fenômeno pode ser atribuído ao aumento da área de contato do material vegetal com o solvente, principalmente pelo fato dos compostos majoritários estarem presentes nas bordas das partículas como se verifica na Seção 4.9. Para melhor compreensão dos resultados, na Figura 4.9 são apresentadas as cinéticas de extração para os 3 diâmetros médios testados, sendo que as demais condições experimentais foram mantidas constantes.

Figura 4.9 - Curvas cinéticas de EFS na condição de 60 °C, 200 bar e vazão de $2,0 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$ e variando-se os tamanhos de partículas



Observa-se que no período inicial de extração, que representa a remoção dos compostos de fácil acesso, o diâmetro das partículas não exerceu influência sobre o resultado. Entretanto, após 60 minutos, as curvas apresentam diferentes taxas de extração e resultam em diferentes rendimentos globais. Como já comentado anteriormente, isso pode estar relacionado com o aumento da área de contato entre as partículas e o solvente causado pela diminuição do diâmetro médio das partículas o que facilita a liberação dos compostos de interesse (CAVALCANTI; MEIRELES, 2012; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007). Na extração com fluido supercrítico de sementes de aipo (*Apium graveolens*) a redução do tamanho de partículas utilizadas de 0,495 mm para 0,293 mm resultou no aumento do rendimento global da extração (PAPAMICHAIL; LOULI; MAGOULAS, 2000). Os resultados dos testes realizados a fim de verificar o efeito da vazão de CO_2 são apresentados na Tabela 4.9.

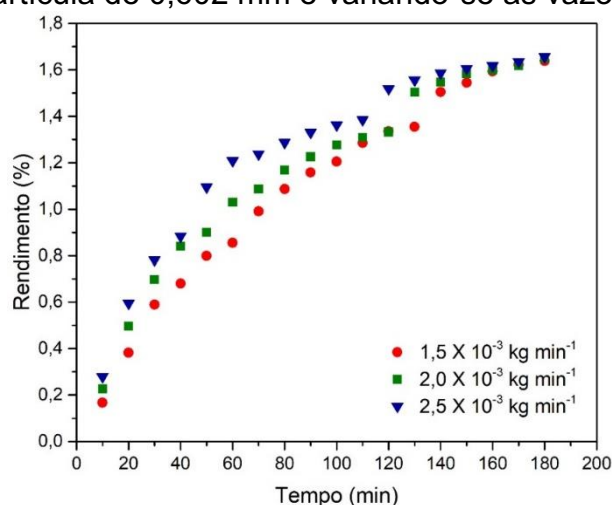
Tabela 4.9 – Avaliação do efeito da vazão de CO_2 sobre o rendimento global das extrações com fluido supercrítico

Vazão de CO_2 (kg min^{-1})	Rendimento global (% m/m)*
$1,5 \times 10^{-3}$	1,64
$2,0 \times 10^{-3}$	1,65
$2,5 \times 10^{-3}$	1,66

*Os rendimentos globais são expressos em base seca

É possível verificar que o aumento da vazão causou um leve aumento no rendimento global, contudo a diferença é muito pequena. Para melhor entender como a vazão afeta o rendimento global, na Figura 4.10 são apresentadas as curvas cinéticas para as 3 extrações com diferentes vazões, mantendo-se constante as demais condições experimentais.

Figura 4.10 - Curvas cinéticas de EFS na condição de 60 °C, 200 bar e diâmetro de partícula de 0,602 mm e variando-se as vazões



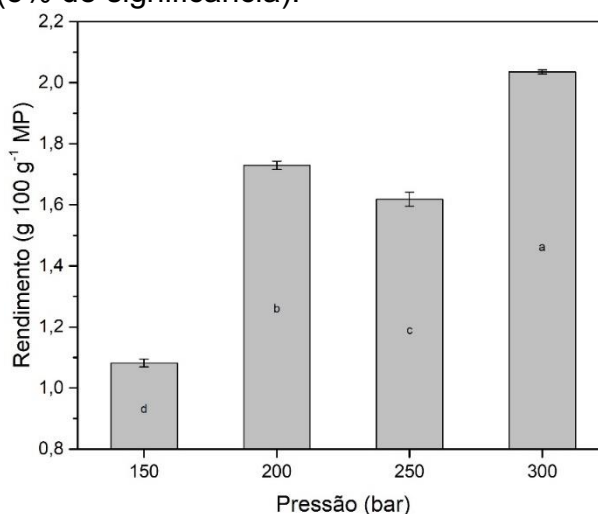
Pode-se observar que apesar do rendimento global final ser semelhante, as extrações se diferenciam nas curvas cinéticas, sendo que o aumento da vazão de CO₂ causa o aumento da taxa inicial de extração, ou seja, nas condições testadas quanto maior a vazão, maior é a inclinação da reta inicial que representa a extração de compostos de fácil acesso. Ao aproximar-se do fim da extração a diferença nas taxas de extração é menor e no fim da extração os valores de rendimento global são muito semelhantes devido ao esgotamento dos compostos extraíveis nestas condições. Comportamento semelhante foi observado anteriormente na extração de funcho (*Foeniculum vulgare*) ao avaliar diferentes vazões de CO₂ supercrítico em que quanto maior a vazão, maior foi a taxa inicial de extração (COELHO et al., 2003). Considerando-se que no tempo total de extração o rendimento global foi muito semelhante, é possível admitir que seria viável o uso de uma vazão menor, tendo em vista o menor consumo de solvente ao final da extração.

4.2.6 Adição de cossolvente na extração com fluido supercrítico

4.2.6.1 Avaliação do efeito da pressão na EFS

Os experimentos realizados a fim de determinar os efeitos da adição de cossolventes foram realizados utilizando um módulo de extração diferente do utilizado anteriormente e que permitia a utilização de pressões superiores. Para estes ensaios a matéria-prima foi proveniente de uma segunda coleta realizada em data diferente. Sendo assim, foi avaliado novamente o efeito da pressão operacional mantendo-se a temperatura fixada em 60 °C. Foram avaliadas as pressões de 150, 200, 250 e 300 bar, que resultaram em rendimentos globais entre $1,08 \pm 0,01$ a $2,04 \pm 0,01$ % m/m (Figura 4.11), estes resultados corroboram resultados disponíveis na literatura científica (KLEIN et al., 2018), em que foi obtido o rendimento global de 1,69 % m/m na extração de folhas de uvaia a 60 °C e 200 bar. É possível observar que o aumento na pressão tem um efeito positivo sobre o rendimento global da extração, sendo que foi praticamente duplicado ao aumentar a pressão de 150 bar para 300 bar.

Figura 4.11 – Rendimentos globais obtidos nas extrações das folhas de uvaia com CO₂ supercrítico a 60 °C usando diferentes pressões. Letras diferentes indicam diferença estatística (5% de significância).



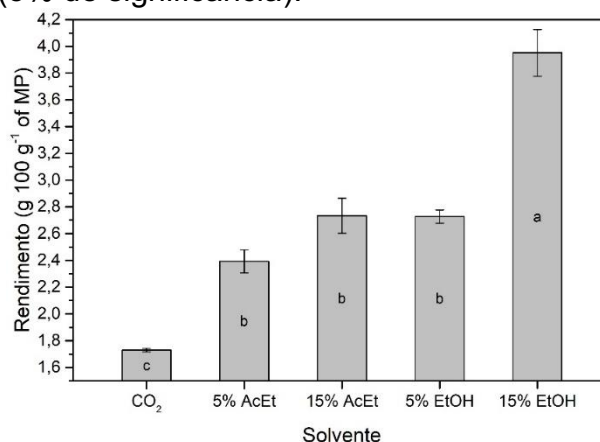
Para o melhor entendimento dos resultados obtidos é necessário também que sejam avaliados os efeitos das diferentes pressões sobre o teor de α -/ β -amirinas cujos resultados são apresentados na Seção 4.7.1.

4.2.6.2 Efeitos da adição de cossolvente na extração com CO₂ supercrítico

Baseando-se nos resultados obtidos nos testes com diferentes pressões, foi selecionada a condição com 200 bar para dar seguimento na avaliação dos efeitos da adição de cossolventes no rendimento da extração, concentração de α -/ β -amirinas e rendimento de α -/ β -amirinas.

A adição de cossolventes em diferentes proporções resultou em rendimentos globais entre $2,4 \pm 0,1$ a $3,95 \pm 0,01$ g 100 g⁻¹ MP, valores significativamente maiores do que o obtido utilizando CO₂ supercrítico puro como solvente ($1,73 \pm 0,01$ g 100 g⁻¹ MP). A adição de etanol (EtOH) como cossolvente resultou em rendimentos globais maiores do que os obtidos utilizando-se acetato de etila (AcEt) (Figura 4.12). Esse comportamento pode ser explicado pelo aumento da solubilidade de compostos polares na mistura de CO₂ + etanol e CO₂ + acetato de etila, comparado com CO₂ puro (MAZZUTTI et al., 2012).

Figura 4.12 – Rendimentos globais dos extratos obtidos a partir das folhas de uvaia por extração supercrítica realizada a 60 °C e 200 bar. Letras diferentes indicam diferença estatística (5% de significância).

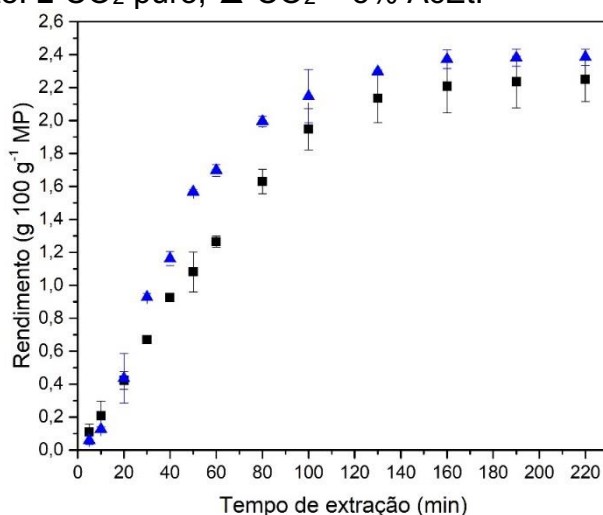


O maior rendimento global ($3,95 \pm 0,01 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MP}$) foi obtido utilizando-se 15% m/m de etanol como cossolvente. Entretanto, tratando-se de produtos naturais, o rendimento global não é o único critério que deve ser considerado. A composição química dos extratos é de grande importância na determinação da qualidade dos produtos. Estas questões são melhor discutidas na Seção 4.7.1.

4.2.6.3 Cinéticas de extração obtidas com a adição de cossolvente

Baseado nos resultados obtidos anteriormente, o comportamento cinético foi avaliado usando CO_2 supercrítico puro e com a adição de 5% m/m de acetato de etila. Na Figura 4.13 são apresentadas as curvas cinéticas de extração para os experimentos realizados a 60°C e 200 bar. A partir das curvas cinéticas é possível observar que a taxa inicial de extração foi aumentada ao ser utilizado a mistura com 5% m/m de acetato de etila em comparação com a extração com CO_2 supercrítico puro.

Figura 4.13 – Curvas cinéticas de extração realizadas a 60°C e 200 bar com e sem a adição de cossolvente. ■ CO_2 puro; ▲ $\text{CO}_2 + 5\% \text{ AcEt}$.



Os rendimentos globais obtidos foram respectivamente $2,25 \pm 0,13$ e $2,38 \pm 0,05 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MP}$ para as extrações com CO_2 supercrítico puro e com adição de 5% m/m de acetato de etila com 220 min de extração. Na extração de candeia

(*Eremanthus erythroppapus*), o rendimento global também foi superior ao ser utilizado 5% m/m de acetato de etila em comparação com CO₂ supercrítico puro (SANTOS et al., 2017).

4.2.7 Aumento de escala e avaliação econômica do processo de extração supercrítica

4.2.7.1 Modelos de simulação

Na otimização do processo de extração de uvaia usando a tecnologia supercrítica e tendo como base resultados técnicos e econômicos do processo foram construídos modelos de simulação no *software* SuperPro Designer®. Os modelos em questão apresentam um diferencial na parte de despressurização dos vasos de extração em relação a trabalhos recentes que utilizam modelos semelhantes (CARVALHO et al., 2015; DE AGUIAR et al., 2020). Neste estudo, e em acordo com a forma que é praticada industrialmente, a despressurização dos vasos após extração foi dividida em duas etapas. Em uma primeira etapa (Procedimento de despressurização S1, na Figura 3.3) a despressurização ocorre até a pressão de 80 bar e a corrente é direcionada para o sistema de separadores. A despressurização foi limitada a 80 bar, pois esta é a pressão no primeiro separador. Em uma segunda etapa (Procedimento de despressurização S2), a despressurização é finalizada e o CO₂ é ventilado para o ambiente externo. Com essa estratégia, mais de 60% do CO₂ necessário para a pressurização do vaso de extração é recirculado no sistema. Além disso, o esquema do procedimento Despressurização S1, no vaso de extração E1, por exemplo, ocorre durante o período de pressurização do vaso de extração E2 (Pressurização-E2, na Figura 3.3), não acarretando assim interrupção ao processo.

Como mencionado anteriormente, para todos os sistemas foi considerado o CAPEX de equipamentos seguindo o padrão farmacêutico para as boas práticas de fabricação (*Good manufacturing practices* – GMP) visto que os principais mercados para os extratos bioativos de uvaia são os mercados de produtos cosméticos e farmacêuticos. Vale ressaltar que o equipamento GMP, além de atender a requisitos

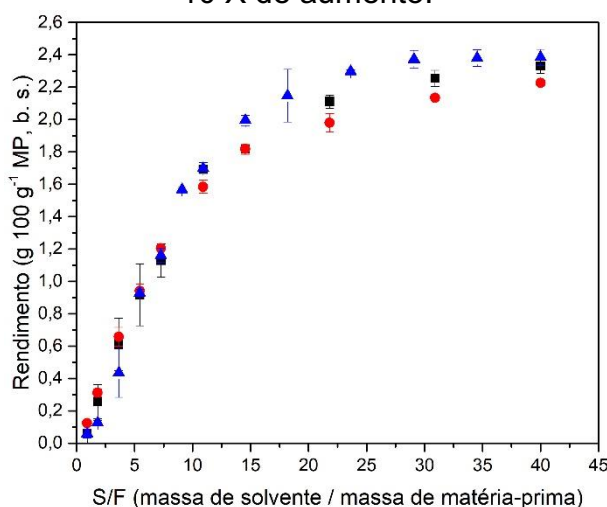
mais elevados em termos de sanitariedade dos componentes metálicos e não-metálicos que compõem o equipamento, deve também atender aos requisitos de validação de sistemas computadorizados de forma a garantir o acesso seguro ao sistema de controle e a rastreabilidade dos dados (ISPE, 2008). Esses requisitos são necessários para a obtenção de certificação dos órgãos governamentais e liberação para produção de Ingredientes ativos farmacêuticos (*Active Pharmaceutical Ingredients* - APIs). Pode ser observado em muitos estudos de análise econômica na área de SFE a utilização de custos de capital de equipamentos fora da realidade industrial, principalmente para processos que envolvam extratos voltados ao mercado farmacêutico.

4.2.7.2 Critério de aumento de escala

No aumento de escala é importante definir o critério adotado para esta finalidade, desta forma é possível obter resultados em escalas maiores semelhantes aos obtidos em escalas de laboratório. Um dos os critérios mais simples e que apresenta bons resultados para o processo EFS é o critério onde se mantém constante a razão entre a vazão mássica (Q) do processo e a massa de matéria-prima (F) empacotada (ROSA; MEIRELES, 2005; ZABOT et al., 2014). Além da razão Q/F , pressão, temperatura, densidade aparente de leite e porosidade, também devem ser mantidas constantes.

Para demonstrar a validade do critério de aumento de escala adotado no presente estudo extrações em escalas de 25, 125 (aumento de 5x) e 250 mL (aumento de 10x) foram realizadas e estão apresentadas na Figura 4.14. É possível observar que independentemente da escala avaliada, as curvas cinéticas apresentam valores estatisticamente iguais no período inicial da extração e ao final. Os rendimentos globais das extrações são estatisticamente iguais no S/F de 40. Estes resultados demonstram que o critério de aumento de escala utilizado é eficaz e pode ser utilizado para prever o comportamento da extração em diferentes escalas.

Figura 4.14 – Curvas cinéticas de extração de aumento de escala determinadas a 60 °C e 200 bar utilizando CO₂ + 5% AcEt: ▲ escala original; ■ 5 X de aumento; ● 10 X de aumento.



4.2.7.3 Otimização técnico-econômica

Na Figura 4.15 são apresentados os dados experimentais das curvas de extração obtidas nos processos de extração com CO₂, CO₂ + 5% de acetato de etila (abreviado para CO₂+5%EtAc) e CO₂ + 5% de etanol (abreviado para CO₂+5%EtOH). A modelagem das curvas cinéticas foi realizada através do método *spline* com duas retas e utilizando uma rotina elaborada no *software* SAS 9.2. Com a modelagem foram obtidos os parâmetros cinéticos que traduzem o comportamento da extração em cada processo. Os parâmetros são apresentados na Tabela 4.10. Basicamente, a primeira reta do método *spline* representa o período de extração a taxa constante (período CER), caracterizado pela extração dos compostos localizados na superfície das partículas e pela predominância do efeito da convecção mássica e dos limites de solubilidade dos compostos (RODRIGUES et al., 2002). Ao final do período CER, o processo começa a ser governado pelo processo difusional, onde o CO₂ deve penetrar no interior das partículas e solubilizar os compostos solúveis.

Tabela 4.10 - Parâmetros OEC estimados pelo modelo *spline*

Parâmetros do modelo spline	Processo de extração			p-valor
	ScCO ₂	ScCO ₂ +5%AcEt	ScCO ₂ +5%EtOH	
S/F _{CER}	17,99 ± 2,03 ^A	12,33 ± 0,31 ^B	12,00 ± 0,26 ^B	0,001
R _{CER} (% , b.s.)	1,96 ± 0,08 ^A	2,08 ± 0,06 ^B	2,34 ± 0,05 ^B	0,001
t _{CER} (min)	98,90 ± 11,16 ^A	67,81 ± 1,69 ^B	66,0 ± 1,41 ^B	0,001
M _{CER} × 10 ² (g/min)	6,54 ± 0,11 ^A	10,20 ± 0,30 ^B	10,72 ± 0,16 ^B	0,000
Y _{CER} × 10 ³ (g extrato/g CO ₂)	1,05 ± 0,08 ^A	1,61 ± 0,00 ^B	1,85 ± 0,00 ^C	0,000

S/F_{CER} – razão de massa de solvente pela alimentação de matéria-prima em relação ao período CER;

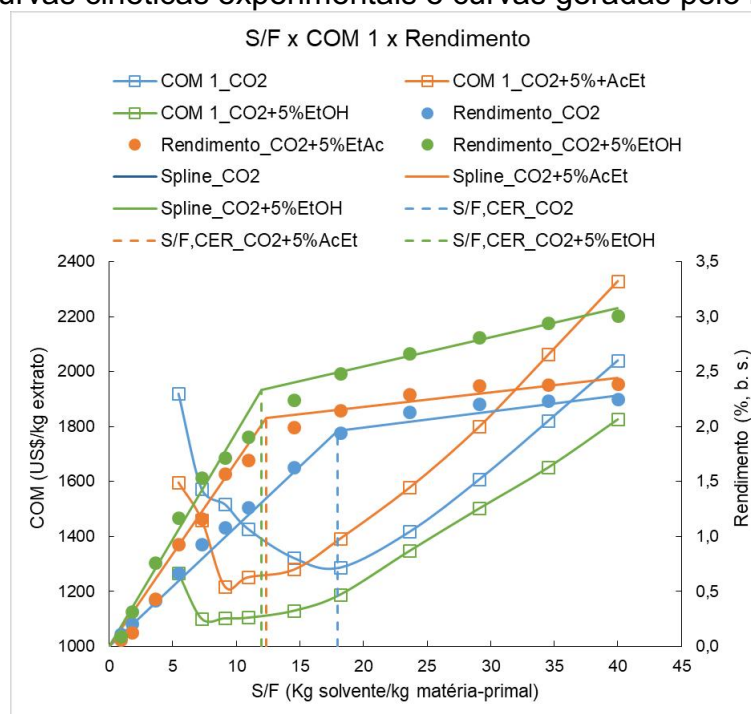
R_{CER} – rendimento relativo ao período CER;

t_{CER} – tempo de duração do período CER;

M_{CER} – taxa de transferência de massa;

Y_{CER} – razão em massa do soluto na fase supercrítica na saída da coluna;

CER – período de taxa de extração constante

Figura 4.15 - Curvas cinéticas experimentais e curvas geradas pelo modelo *spline*

Como pode ser observado na Figura 4.15 e nos dados da Tabela 4.10, as extrações com adição de solvente apresentaram maiores taxas de extração durante o período CER em comparação a extração com CO₂. Como reportado em trabalho anterior (KLEIN et al., 2019), a adição de cossolvente com característica polar tende a facilitar a extração dos compostos polares da uvaia. A maior taxa de extração (M_{CER}) estimada pelo método *spline* foi de $10,72 \times 10^{-2}$ g/min para o processo CO₂+5%EtOH durante o período CER. Contudo, não foi observada diferença significativa entre os valores de M_{CER} obtidos nos processos de extração CO₂+5%EtOH e CO₂+5%EtAc. Consequentemente, esses dois processos apresentaram um menor S/F_{CER} e t_{CER} em comparação ao processo tendo CO₂ puro como solvente. As linhas verticais tracejadas na Figura 4.15 representam os respectivos S/F_{CER} para os processos estudados. O menor S/F_{CER} foi estimado também para o processo de extração CO₂+5%EtOH. Para esse processo 12,00 g de CO₂ por g de matéria-prima seriam necessários para atingir rendimento de 2,34% (R_{CER}), extraíndo mais de 70% dos compostos solúveis.

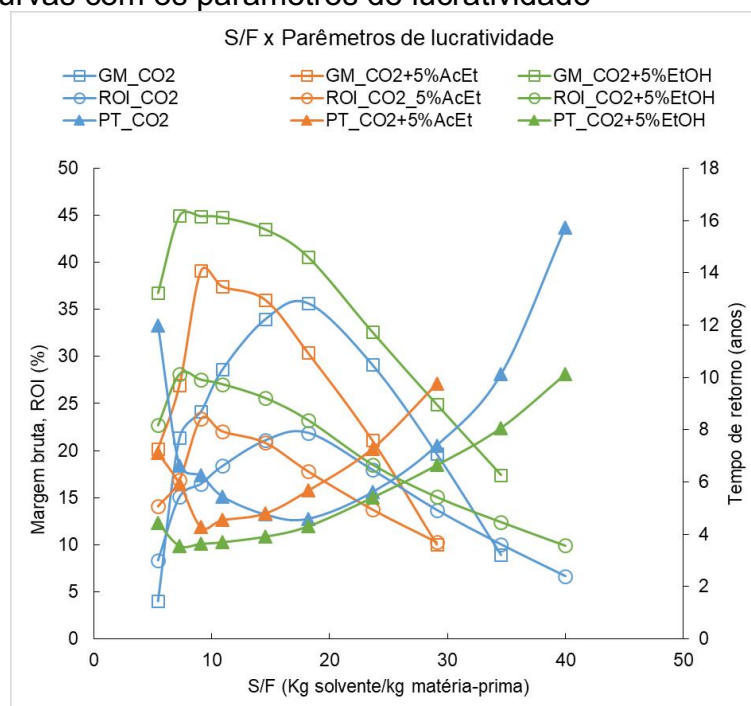
Entretanto, apenas informações técnicas do comportamento da extração não são suficientes para a otimização de um processo pensando principalmente no seu escalonamento e em sua viabilidade econômica. Com base nos modelos construídos no SuperPro e nos dados das curvas de extração foram obtidas as curvas de COM, também apresentadas na Figura 4.15. Os dados de COM são apresentados a partir do ponto de S/F igual a 5.45, pois em pontos anteriores o problema não converge devido aos pequenos valores das correntes de processo envolvidas. Todavia, é possível observar o comportamento típico do COM baseado em uma curva de extração do processo SFE. Em geral, o ponto com menor custo de produção por quilo de extrato tende a coincidir com o final do período CER de extração, pois nesse ponto é obtida a maior quantidade acumulada de extrato na taxa de extração mássica. Para tempos de extração ou razões S/F além do período CER, o COM tende a aumentar, pois a quantidade de extrato obtida proporcional ao acréscimo de tempo de extração reduz, diminuindo a produtividade do equipamento em um tempo determinado.

Pode-se observar que embora os processos de extração com cossolvente apresentem um custo de capital maior, devido ao sistema adicional de evaporação e de recuperação do solvente, os menores COM foram estimados para esses

processos. Ou seja, as maiores taxas de extração nesses processos levaram a maiores produtividades do equipamento no horizonte de tempo fixado (4000 horas ao ano). Produtividades significativamente maiores ao ponto de compensar o aumento de investimento em capital. Os menores valores de COM foram obtidos no processo $\text{CO}_2+5\%\text{EtOH}$ e S/F na faixa de 7,27 a 10,91. Em S/F igual a 7,27 o COM foi de US\$ 1100,87/kg de extrato. O menor COM no processo tendo etanol como cossolvente em relação ao processo $\text{CO}_2+5\%\text{EtAc}$ se deve, além da eficiência da extração com etanol ligeiramente maior, ao menor custo do etanol como insumo (Tabela 3.2).

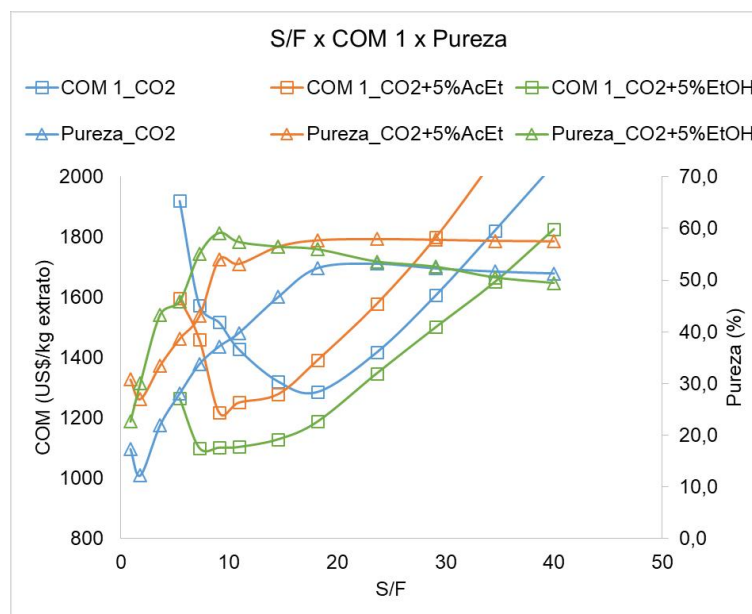
O custo de produção (COM) por si só já se apresenta como um bom parâmetro de custo em otimização de processos. Ainda assim, outros parâmetros econômicos podem ser utilizados, como os parâmetros de lucratividade, o retorno sobre o investimento (ROI), a margem bruta (GM) e o tempo de retorno (PT). Na Figura 4.16 são apresentadas curvas com os parâmetros de lucratividade. Para a obtenção desses parâmetros, o preço de venda do quilo de extrato de uvaia foi fixado em US\$ 2.000. Como era de se esperar, tais parâmetros acompanham o efeito do tempo de processo no custo específico de produção dos extratos. Os maiores valores de GM e ROI foram obtidos no processo $\text{CO}_2+5\%\text{EtOH}$, assim como o menor de tempo de retorno (PT) sobre o investimento.

Figura 4.16 - Curvas com os parâmetros de lucratividade



Um importante fator ainda não abordado é referente a pureza dos extratos nos compostos de interesse. Em muitos casos, o preço de comercialização de uma matéria-prima ou de um extrato é atrelado ao teor dos compostos-alvos presentes. Isso se deve ao rendimento e aos custos envolvidos com os processos de purificação. Dessa forma, embora nos dados apresentados na Figura 4.16 o preço de venda tenha sido fixado, a sua variação deveria ser considerada. Com isso, na Figura 4.17 são apresentadas as curvas de pureza do extrato ao longo do tempo ou razão S/F em função dos compostos α/β -amirina. Geralmente, a pureza dos extratos aumenta durante o período C_{ER} de extração. Neste período cerca de 95% das amirinas são extraídas. Este comportamento mostra que as amirinas devem estar depositadas na superfície das partículas de folhas de uvaia, isto é, numa região de fácil acesso. Valores de pureza de quase 60% foram alcançadas com os processos $CO_2+5\%EtOH$ e $CO_2+5\%EtAc$.

Figura 4.17 - Curvas de pureza de amirinas em comparação com os custos de produção



Para o processo $CO_2+5\%EtOH$ o ponto de maior pureza é alcançado na região onde os menores custos de produção foram observados. Em S/F igual 9,09, um extrato com pureza de 59,15% poderia ser obtido a um custo de US\$ 1102,11/kg

extrato. Portanto, parece evidente que a combinação entre as condições de processos de CO₂ com 5% de etanol como solvente, pressão de 20 MPa, temperatura de 60 °C e S/F de 9,09 é a combinação ideal para a obtenção de um extrato de uvaia rico em α/β -amirina ao menor custo de produção. Essa combinação foi então utilizada nos estudos de aumento de escala e sensibilidade.

4.2.7.4 Aumento de escala e análise de sensibilidade

Na Figura 4.18 é apresentada a variação do COM (US\$/kg extrato) e dos custos específicos com a escala de produção. Já na Figura 4.19 é apresentada a variação percentual dos custos específicos (CRM_Uvaia, CRM_Solvente, FMC, COL, CUT) com a escala. Como pode ser observado na Figura 4.18 os custos específicos com as matérias-primas (folhas de uvaia e solventes) são praticamente independentes da escala, em torno de US\$ 248,9/kg extrato para as folhas de uvaia e US\$ 171,4/kg extrato para os solventes (soma dos custos com CO₂ e etanol). Por outro lado, o custo fixo com equipamentos (FMC) e o custo operacional com operadores (COL) variam entre as escalas.

O custo com equipamentos não aumenta de forma proporcional com o aumento da escala. Cada componente do equipamento, devido a sua forma construtiva e sua função, possui um fator exponencial de aumento de custo (GREEN; PERRY, 2008; SMITH, 2005). No caso dos operadores, devido às questões específicas de operação em cada equipamento e processo, em termos de trabalho manual e automação envolvida, o requerimento de operadores também não aumenta de forma proporcional ao aumento de escala. Em geral, com o aumento de escala o nível de automação tende a aumentar, requerendo menos trabalho manual em proporção à escala produtiva.

Como pode ser observado na Tabela 4.11 o custo específico com operadores caiu de 137,3 para US\$ 27,5/kg extrato entre as escalas com vasos de 10 e 100 L. No caso do FMC a redução foi de 540,5 para US\$ 171,1/kg extrato para a mesma variação de escala. A redução dos custos específicos com operadores e com capital em equipamentos permitiu a redução no custo de manufatura do extrato. O aumento de escala de 5 vezes entre os equipamentos 2x10 L e 2x50 L levou a uma

redução no valor de COM em 34,6% (Tabela 4.11). Além disso, o menor impacto dos valores de COL e FMC com o aumento de escala levou a uma maior relevância dos custos com matérias-primas (CRM) e insumos (CUT) na composição de custo do processo. A parcela do custo referente às folhas de uvaia passou de 22,6 para 34,5% entre as escalas de 10 e 50 L (Figura 4.19), embora o custo específico tenha se mantido constante (Figura 4.18).

Figura 4.18 - Variação do custo de produção e dos custos específicos em função da escala de produção

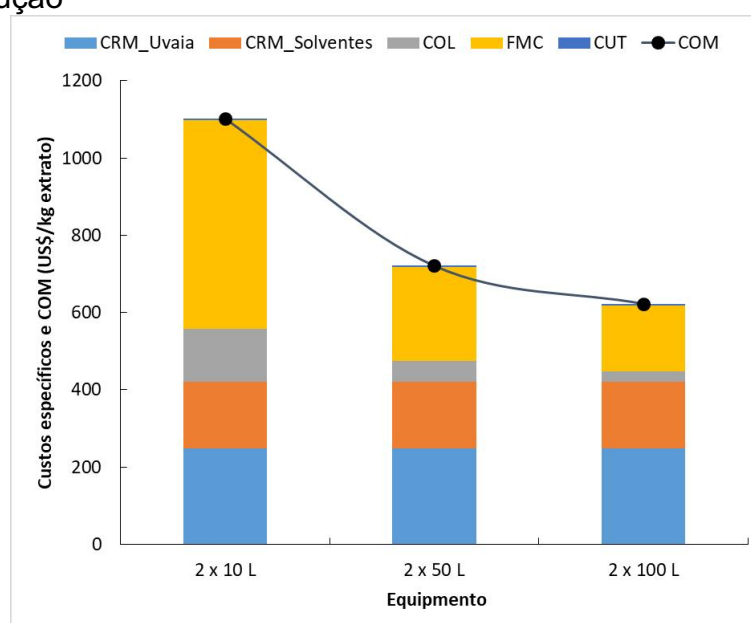


Figura 4.19 - Distribuição dos custos específicos em função da escala adotada

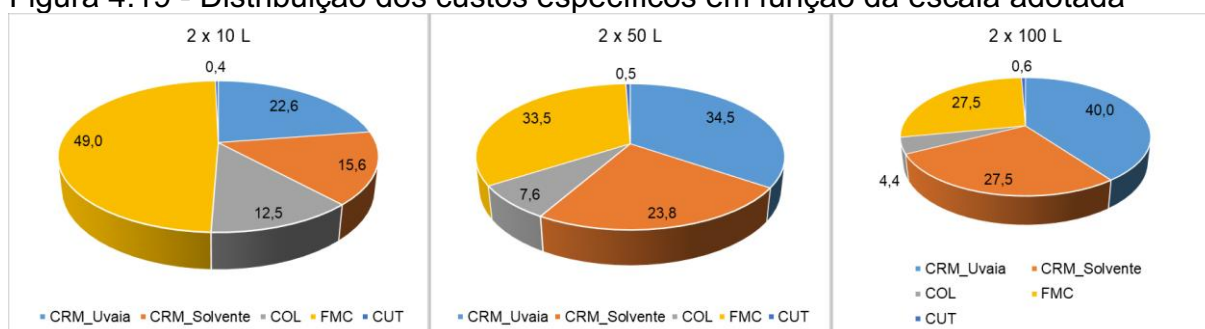


Tabela 4.11 - Custos específicos e COM

Custos específicos e COM	Escala de produção		
	2x10 L	2x50 L	2x100 L
CRM_Uvaia (US\$/kg extrato)	248,9	248,9	248,9
CRM_Solvente (US\$/kg extrato)	171,4	171,4	171,4
COL (US\$/kg extrato)	137,3	54,9	27,5
FMC (US\$/kg extrato)	540,5	241,9	171,1
CUT (US\$/kg extrato)	3,9	3,9	3,9
COM (US\$/kg extrato)	1102,6	721,1	622,9
Variação no COM(%) ^A	-	- 34,6	- 43,5

^AVariação no COM em relação ao equipamento 2x10 L

CRM – custos com matéria-prima;

COL – custos operacionais com operadores (mão de obra);

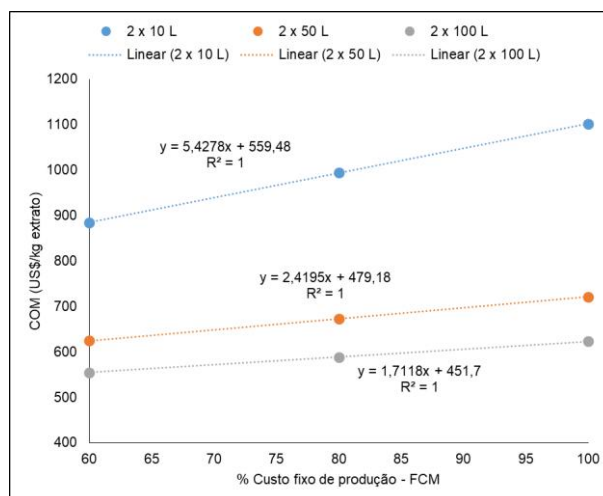
FMC – Custos fixos de produção

CUT – custos com insumos

COM – custo de produção

Por fim, faz-se interessante analisar a sensibilidade do COM frente aos parâmetros de custo. Na Figura 4.20 são apresentadas curvas de COM em função do FMC nas 3 escalas estudadas. O FMC de 100% representa o custo com equipamentos considerado no estudo até o momento, tendo como parâmetro um equipamento para o mercado farmacêutico. O FMC de 80% poderia ser interpretado como um equipamento com custo mais acessível que atenderia os mercados alimentícios e de cosméticos. Já o FMC de 60% seria um equipamento com custo relativamente baixo que poderia ser interpretado, por exemplo, como um equipamento *home-made* construído pela própria empresa a explorar a tecnologia. Ainda de acordo com o que foi apresentado sobre a variação do FMC com a escala, sendo seu impacto menor em escalas maiores de produção, pode-se notar pela inclinação das curvas na Figura 4.20 o maior impacto da variação do FCM no COM do equipamento 2x10L. As equações das linhas de tendência podem ser utilizadas para encontrar o COM do extrato de uvaia considerando diferentes custos de equipamento, tendo como referência o custo do equipamento farmacêutico do presente estudo.

Figura 4.20 - Custo total em função do custo fixo de equipamento em diferentes escalas



4.3 Extração com solvente assistida por ultrassom

4.3.1 Avaliação de solventes

Utilizou-se o sonicador ultrassônico VCX 750 (SONICS), operando com frequência de 20 kHz e potência máxima de 750 Watts e ponteira de titânio com 13 mm de diâmetro. Antes de utilizar este equipamento para os processos de extração, foi determinada por calorimetria a potência ultrassônica efetiva transferida para o meio (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2014).

Para avaliar os efeitos dos solventes sobre os rendimentos globais da extração assistida por ultrassom, foram realizados testes na condição de 60 °C, 300 W/L de potência, razão massa de folha/volume de solvente de 1:15 com 3 minutos de extração. Na Tabela 4.12, são apresentados os rendimentos globais obtidos para cada solvente utilizado nos testes.

Tabela 4.12 – Rendimentos globais obtidos com o uso de diferentes solventes na extração assistida por ultrassom

Solvente	Rendimento global (% m/m)*
Metanol	13,97
Etanol	5,63
Acetato de Etila	2,62
Hexano	1,57

*Rendimentos globais são apresentados em base seca

Como pode ser observado na Tabela 4.12 o uso de solventes mais polares resultou em rendimentos globais maiores, metanol foi o solvente mais polar utilizado e resultou em 13,97% m/m de rendimento global, enquanto que ao utilizar um solvente apolar (hexano) o rendimento global foi muito menor (1,57% m/m). A utilização de diferentes solventes resulta na modificação de parâmetros físicos como pressão de vapor, tensão superficial e viscosidade. Além disso, a polaridade do solvente é de grande importância na seletividade do processo (CHEMAT et al., 2017). Sendo assim, é importante avaliar a composição do extrato obtido a fim de verificar qual solvente possibilita a obtenção de extratos com teores elevados de α -amirina e β -amirina. A avaliação da composição química em função do solvente utilizado é apresentada na Seção 4.7.2.

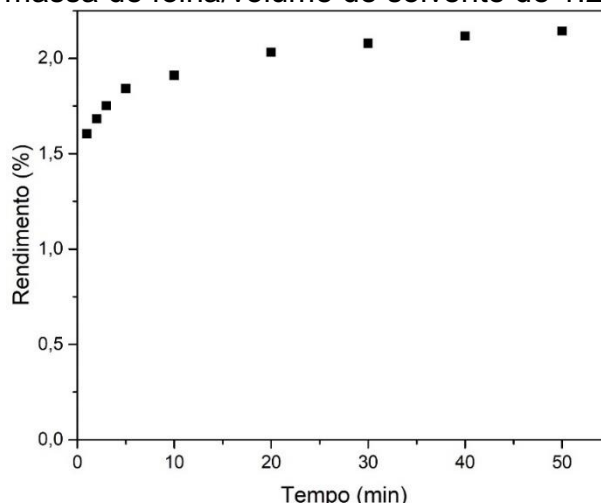
4.3.2 Cinética de extração assistida por ultrassom

A curva cinética para a extração assistida por ultrassom foi construída a partir dos resultados de extrações com diferentes tempos de duração. Foi utilizado hexano como solvente devido ao desempenho apresentado na obtenção de extratos com maior concentração dos compostos α -amirina e β -amirina, conforme pode ser observado na Seção 4.7.2.

As condições experimentais utilizadas foram 55 °C, 250 W/L de potência, razão massa de folha/volume de solvente de 1:20 g/mL. Foram realizados experimentos com tempos de extração de 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min e 50 min.

Na Figura 4.21 é apresentada a curva cinética obtidas nas condições citadas anteriormente. Observa-se que a variação da massa acumulada é muito pequena quando a extração se aproxima do tempo final de extração, o que pode indicar o esgotamento do extrato disponível para extração na condição analisada.

Figura 4.21 - Curva cinética da EAU na condição de 55 °C, 250 W/L de potência, razão massa de folha/volume de solvente de 1:20 g/mL



4.3.3 Rendimento global

As condições experimentais utilizadas foram selecionadas de forma a garantir uma ampla variação dos parâmetros dentro dos limites operacionais do equipamento utilizado. O tempo de extração foi fixado em 1 minuto levando em consideração os resultados apresentados na Seção 4.7.3, visto que a massa de amirinas por massa de folhas não aumentou consideravelmente após 1 minuto e a concentração de α -/ β -amirina foi maior neste ponto do que nos demais. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória para evitar resultados tendenciosos. Na Tabela 4.13 são apresentados os resultados, em termos de rendimento global, das extrações nas condições determinadas pelo planejamento experimental.

Tabela 4.13 - Condições do operacionais das EAU e seus respectivos rendimentos globais

Ensaio	Potência (W/L)	Temperatura (°C)	Razão Massa/Solvente (g:mL)	Rendimento global (% m/m)*
1	200	50	1:15	1,46
2	300	50	1:15	1,43
3	200	60	1:15	1,56
4	300	60	1:15	1,54
5	200	50	1:25	1,56
6	300	50	1:25	1,55
7	200	60	1:25	1,61
8	300	60	1:25	1,58
9	250	55	1:20	1,60
10	250	55	1:20	1,60
11	250	55	1:20	1,60

*Os rendimentos globais são expressos em base seca

A partir dos dados apresentados na Tabela 4.13 observa-se que a variação de rendimento foi entre 1,43 e 1,61%, sendo que o melhor rendimento global foi obtido no ensaio 7 e o valor foi muito próximo do observado nos ensaios 9, 10 e 11 (1,60 % m/m) referentes ao ponto central.

O uso de temperaturas mais elevadas favoreceu a obtenção de melhores rendimentos globais, isso pode ser justificado pelo fato de que o aumento da temperatura leva a formação de um número maior de bolhas de cavitação o que contribui para a eficiência do processo de extração (BENDICHO; LAVILLA, 2013; CHEMAT et al., 2017).

4.3.4 Avaliação de efeitos secundários sobre o rendimento global

Para melhor compreender o processo de extração assistida por ultrassom, foram avaliados outros fatores que podem estar envolvidos na eficiência do processo. Foi avaliada a influência do tamanho das partículas de folhas bem como o uso de sonicação intermitente no modo pulsar do sonicador.

A condição experimental utilizada para estes testes foi a de melhor rendimento global do planejamento experimental. Sendo ela: 200 W/L, 60 °C e razão amostra/solvente 1:25 g:mL. As extrações foram realizadas com 1 minuto de extração e foram utilizadas frações com diferentes tamanhos de partícula, sendo os diâmetros médios de 0,725 mm, 0,512 mm e 0,362 mm, os resultados podem ser observados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Avaliação dos efeitos de tamanho de partícula da matéria-prima sobre o rendimento global da extração assistida por ultrassom.

Diâmetro médio (mm)	Rendimento global (% m/m)*
0,725	1,41
0,602	1,61
0,362	1,74

*Os rendimentos globais são expressos em base seca

Nota-se que a diminuição do tamanho médio das partículas favorece a extração, possibilitando a obtenção de maiores rendimentos globais. Tal fenômeno deve-se possivelmente ao aumento da área de contato do material vegetal com o solvente, principalmente pelo fato dos compostos majoritários estarem presentes nas bordas das partículas como se verifica na Seção 4.9.

Para os testes com pulsos, foram testados diferentes ajustes de ciclos de pulsos, mas de forma a completar 1 min de extração (contato das folhas com o solvente), os resultados podem ser observados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 – Resultados de rendimento global da extração assistida por ultrassom obtidos utilizando-se ciclos de pulsos de sonicação.

Tempo de sonicação (s)	Intervalo entre pulsos (s)	Tempo total de sonicação	Rendimento global (% m/m)*
1	5	10 s	1,51
1	1	30 s	1,54
5	5	30 s	1,55
5	1	50 s	1,58
60 (controle)	-	60 s	1,61

*Os rendimentos globais são expressos em base seca

É possível verificar que todas as condições testadas com o uso de pulso resultaram em rendimentos globais inferiores ao obtido no experimento com sonicação contínua durante o período de contato entre o material vegetal e o solvente. Isso se deve ao fato de que ao realizar períodos de pausa de sonicação durante a extração, reduz o tempo total de sonicação. Pode se observar que a sonicação é importante para o processo, visto que quanto maior o tempo total de sonicação, maior foi o rendimento global obtido, sendo que na configuração de 5 s ligado com intervalos de 1 s desligado (50 s de tempo total de sonicação), o rendimento global obtido foi de 1,58% m/m.

4.4 Extração com líquido pressurizado

4.4.1 Avaliação de Solventes

Para avaliar os efeitos dos solventes sobre os rendimentos globais da extração com líquido pressurizado, foram realizados testes na condição de 100 bar, 100 °C, vazão de solvente de 5 mL min⁻¹ por 10 minutos. Na Tabela 4.16 são apresentados os rendimentos globais obtidos para cada solvente utilizado nos testes.

Tabela 4.16 – Rendimentos globais obtidos com o uso de diferentes solvente na extração com líquido pressurizado

Solvente	Rendimento global (% m/m)*
Metanol	20,30
Etanol	11,85
Acetato de Etila	3,74
Hexano	2,85

*Rendimentos globais são apresentados em base seca

Para a extração com líquido pressurizado, o efeito do tipo de solvente foi semelhante ao apresentado pela extração assistida por ultrassom, sendo que o metanol como sendo o solvente mais polar foi o que resultou em maior rendimento global de extrato (20,30% m/m), enquanto que o solvente menos polar (hexano) apresentou o menor rendimento global (2,85% m/m).

Ao escolher o solvente mais adequado é importante levar em conta as características químicas dos extratos obtidos, pois o melhor solvente é aquele que é capaz de solubilizar os analitos de interesse e minimizar a coextração de outros compostos da matriz vegetal (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005). Sendo assim, uma avaliação da composição química dos extratos pode ser encontrada na Seção 4.7.4. Considerando esta avaliação, os demais experimentos foram realizados utilizando-se hexano como solvente.

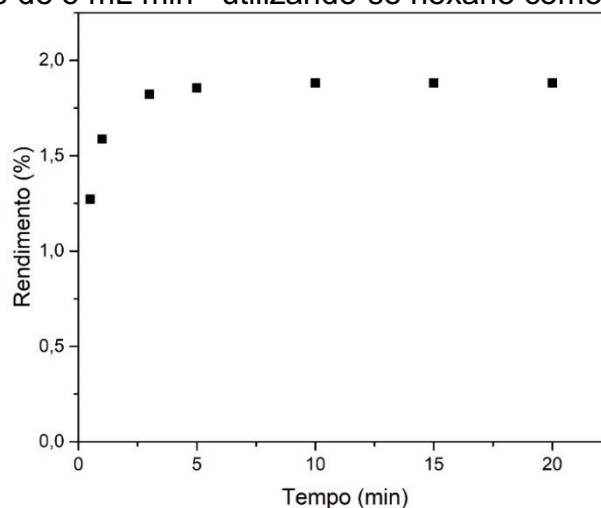
4.4.2 Determinação do tempo total de extração

A fim de avaliar o tempo necessário para a duração das extrações, foi construída uma curva cinética para a extração com líquido pressurizado a partir dos resultados de extrações com diferentes tempos de duração. Foi utilizado hexano como solvente devido ao desempenho apresentado na obtenção de extratos com maior concentração dos compostos α -amirina e β -amirina, que foi realizada e está apresentada na Seção 4.7.2.

As condições experimentais utilizadas foram 60 °C, 100 bar de pressão e vazão de solvente de 5 mL min⁻¹. Foram realizados experimentos com tempos de extração de 30 s, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 40 min e 50 min.

Na Figura 4.22 é apresentada a curva cinética obtidas nas condições citadas anteriormente. Observa-se que a variação da massa acumulada é muito pequena quando a extração se aproxima do tempo final de extração, o que pode indicar o esgotamento do extrato disponível para extração na condição analisada.

Figura 4.22 - Curva cinética da ELP na condição de 60 °C, 100 bar e vazão de solvente de 5 mL min⁻¹ utilizando-se hexano como solvente



Considerando que a variação de massa extraída após 5 min de extração, este tempo foi selecionado para a realização de todas as extrações subsequentes.

4.4.3 Determinação das melhores condições de Pressão e Temperatura

A fim de escolher a faixa mais adequada de temperatura e pressão, foram testadas inicialmente as temperaturas de 40, 70 e 100 °C e as pressões de 50, 100 e 150 bar utilizando-se hexano como solvente. Os resultados são apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 – Avaliação inicial do efeito da temperatura e pressão sobre o rendimento global da extração com líquido pressurizado.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rendimento global (% m/m)*
40	50	2,11
40	100	2,00
40	150	1,90
70	50	2,79
70	100	2,82
70	150	2,87
100	50	3,41
100	100	3,48
100	150	3,56

*Os rendimentos globais são expressos em base seca.

Observa-se que o melhor rendimento global (3,56% m/m) foi obtido na condição de maior temperatura e pressão (100 °C e 150 bar). Maiores rendimentos globais são geralmente obtidos em condições de maior temperatura e pressão, pois essas condições aumentam o poder de solvatação do solvente ao aumentar as taxas de transferência de massa e de difusão (MUSTAFA; TURNER, 2011; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012). Entretanto, é importante levar em consideração a concentração dos extratos obtidos como será discutido na Seção 4.7.4. De forma geral, maiores rendimentos globais são obtidos ao serem utilizadas maiores pressões, visto que o aumento da pressão pode facilitar a extração de analitos de dentro da matriz, pois a pressão força a entrada do solvente nos poros da matriz, o que aumenta a superfície de contato em comparação com extrações realizadas a pressão ambiente (TURNER; WALDEBÄCK, 2013).

Observa-se que na condição de 40 °C, o aumento da pressão resultou na diminuição do rendimento global das extrações. Este fato pode ser justificado, pois o aumento da pressão pode aumentar a compactação da amostra, ao mesmo tempo que na menor temperatura, a viscosidade e tensão superficial do solvente eram

menores do que em temperaturas maiores (OSORIO-TOBÓN et al., 2013). A combinação desses fatores pode explicar o comportamento diferente do observado em maiores temperaturas.

4.4.4 Avaliação de efeitos secundários sobre o rendimento global da extração com líquido pressurizado.

Para melhor compreender o processo de extração com líquido pressurizado, foram avaliados outros fatores que podem estar envolvidos na eficiência do processo. Foi avaliada a influência do tamanho das partículas de folhas bem como a vazão de solvente.

A condição experimental utilizada para estes testes foi a que apresentou melhores resultados na avaliação de temperatura e pressão, sendo ela: 40 °C e 150 bar. As extrações foram realizadas com 10 minutos de extração e foram utilizadas frações com diferentes tamanhos de partícula, sendo os diâmetros médios de 0,512 mm, 0,362 mm e 0,275 mm. Foram avaliadas também as vazões de 3 mL min⁻¹ e 7 mL min⁻¹. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Rendimentos globais obtidos ao avaliar-se o efeito da vazão de solvente e de tamanho de partículas de matéria-prima na ELP

Condição Experimental	Rendimento global (% m/m)
3 mL min ⁻¹ (0,275 mm)	1,90
5 mL min ⁻¹ (0,275 mm)	2,07
7 mL min ⁻¹ (0,275 mm)	2,11
0,512 mm (5 mL min ⁻¹)	1,75
0,362 mm (5 mL min ⁻¹)	1,89
0,275 mm (5 mL min ⁻¹)	2,07

*Os rendimentos globais são expressos em base seca.

Nota-se que a diminuição do tamanho médio das partículas favorece a extração, possibilitando a obtenção de maiores rendimentos globais. Tal fenômeno deve-se ao aumento da área de contato do material vegetal com o solvente o que resulta no aumento da difusão dos analitos da amostra para o solvente (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005). Além de facilitar a difusão, quanto maior a moagem, maior será a quantidade de células rompidas. Nas células rompidas ocorrerá a extração por lavagem (LIST; SCHIMIDT, 1990).

É possível observar-se que o aumento da vazão também resulta em aumento do rendimento global o que pode estar relacionado com o aumento da velocidade de substituição do solvente saturado com extrato por solvente puro, o que facilita a extração dos compostos. Entretanto, é importante salientar que o aumento da vazão resulta num aumento do consumo de solvente. O aumento de vazão avaliado neste estudo não mostrou-se viável pois entre as vazões de 3 e 5 mL min⁻¹ houve um aumento no rendimento de 11,05%, enquanto que o consumo de solvente ao final da extração aumentou 133,33%.

4.5 Extração com solvente por métodos convencionais

4.5.1 Avaliação de solventes na extração por maceração

Na Tabela 4.19 são apresentados os resultados obtidos nas extrações por maceração avaliando-se o efeito do tipo de solvente sobre o rendimento global da extração.

Tabela 4.19 – Rendimentos globais obtidos com o uso de diferentes solvente na extração por maceração

Solvente	Rendimento global (% m/m)*
Metanol	17,49
Etanol	6,60
Acetato de Etila	2,78
Hexano	1,80

*Rendimentos globais são apresentados em base seca

O comportamento observado nas extrações por maceração corrobora os resultados obtidos nos outros dois métodos que avaliaram o tipo do solvente, sendo que o solvente mais polar resultou em maior rendimento global que os solventes menos polares. O melhor rendimento global (17,49 % m/m) foi obtido com metanol.

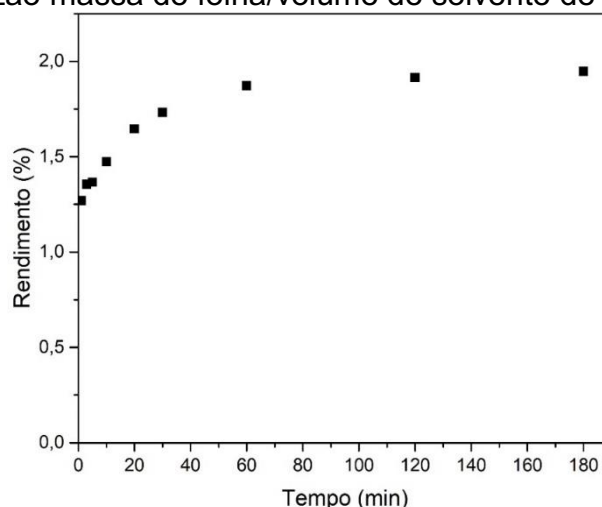
4.5.2 Cinética de extração por maceração

A curva cinética para a extração por maceração foi construída a partir dos resultados de extrações com diferentes tempos de duração. Foi utilizado hexano como solvente devido ao desempenho apresentado na obtenção de extratos com maior concentração dos compostos α -amirina e β -amirina, conforme pode ser observado na Seção 4.7.2.

As condições experimentais utilizadas foram 55 °C, 100 rpm de agitação orbital, razão massa de folha/volume de solvente de 1:20 g/mL. Foram realizados experimentos com tempos de extração de 1 min, 3 min, 5 min, 10min, 20 min, 30 min, 60 min, 120 min e 180 min.

Na Figura 4.23 é apresentada a curva cinética obtidas nas condições citadas anteriormente. Observa-se que a variação da massa acumulada é muito pequena quando a extração se aproxima do tempo final de extração, o que pode indicar o esgotamento do extrato disponível para extração na condição analisada.

Figura 4.23 - Curva cinética da extração por maceração na condição de 55 °C, 100 RPM, razão massa de folha/volume de solvente de 1:20 g/mL



4.5.3 Avaliação do efeito da temperatura de extração sobre o rendimento global da extração por maceração

A fim de verificar-se o efeito da temperatura sobre o rendimento global de extração por maceração, foram testadas duas condições além da analisada anteriormente, uma com temperatura superior e uma inferior (Tabela 4.20). Os testes foram realizados com agitação de 100 rpm por 20 minutos com a mesma massa de amostra e volume de solvente utilizados no controle.

Tabela 4.20 - Rendimentos globais da extração por maceração obtidos com diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Rendimento global (% m/m)*
50	1,61
55 (controle)	1,65
60	1,70

*Os rendimentos globais são expressos em base seca

Os resultados apresentados na Tabela 4.20 mostram que a temperatura teve um efeito positivo sobre o rendimento global da extração por maceração,

possivelmente causado pelo aumento da penetração do solvente na matriz devido à diminuição da viscosidade do mesmo com o aumento da temperatura (MUSTAFA; TURNER, 2011).

4.5.4 Extração convencional com aparato Soxhlet

Como comparativo foi realizada extração pelo método convencional com o uso do aparato de Soxhlet. A extração foi realizada utilizando-se hexano como solvente na temperatura de ebulição do mesmo, durante 6 horas. A extração resultou em um rendimento global de 2,84 % m/m. Apesar de o valor ser superior aos resultados obtidos nas extrações assistidas por ultrassom utilizando o mesmo solvente, é importante ressaltar que o uso dessa técnica apresenta certas características indesejáveis como: alto consumo de solvente, baixa seletividade e possibilidade de degradação térmica de compostos de interesse durante a extração (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

4.6 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

Devido ao alto custo da análise de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas, optou-se por realizar a caracterização química completa de apenas uma amostra de cada método de extração.

O extrato obtido por extração com fluido supercrítico escolhido para a caracterização química foi o referente à condição que apresentou o melhor resultado de rendimento global (200 bar e 60 °C). Para a extração assistida por ultrassom, foi analisado o extrato obtido no ponto central do planejamento (250 W/L, 55 °C e razão massa/solvente 1:20). Da extração com líquido pressurizado foi utilizado o extrato obtido no teste com solventes utilizando o hexano. Já para a maceração, para efeitos de comparação, foi escolhido o extrato obtido no teste de solventes ao utilizar hexano com 60 minutos de extração, sendo as outras condições: 50 °C e 100 RPM de agitação e razão massa/solvente 1:15. Os resultados em termo de área relativa são apresentados na Tabela 4.21.

Tabela 4.21 – Composição química do extrato determinada por CG-EM

Nome do Composto	CAS	% Área			
		EFS	EAU	ELP	Maceração
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadece-1-ol	102608-53-7	0,28	0,81	25,74	0,62
Ácido Hexadecanóico	57-10-3	0,38	0,20	1,36	0,38
Vitamina E	059-02-9	1,06	0,41	-	0,45
β -sitosterol	083-46-5	2,40	-	-	-
β -amirina	559-70-6	68,24	77,98	44,62	71,81
α -amirina	638-95-9	26,65	20,31	13,67	25,36

Observa-se que em todos os extratos analisados por CG-EM há quantidades bastante elevadas dos compostos α -amirina e β -amirina além de compostos em menor proporção como: β -sitosterol, vitamina E, Ácido Hexadecanóico e 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadece-1-ol. Os compostos Vitamina E, β -sitosterol, α -amirina e β -amirina já haviam sido identificados anteriormente em extratos de folhas de uvaia obtidos por extração com fluido supercrítico (KLEIN et al., 2018).

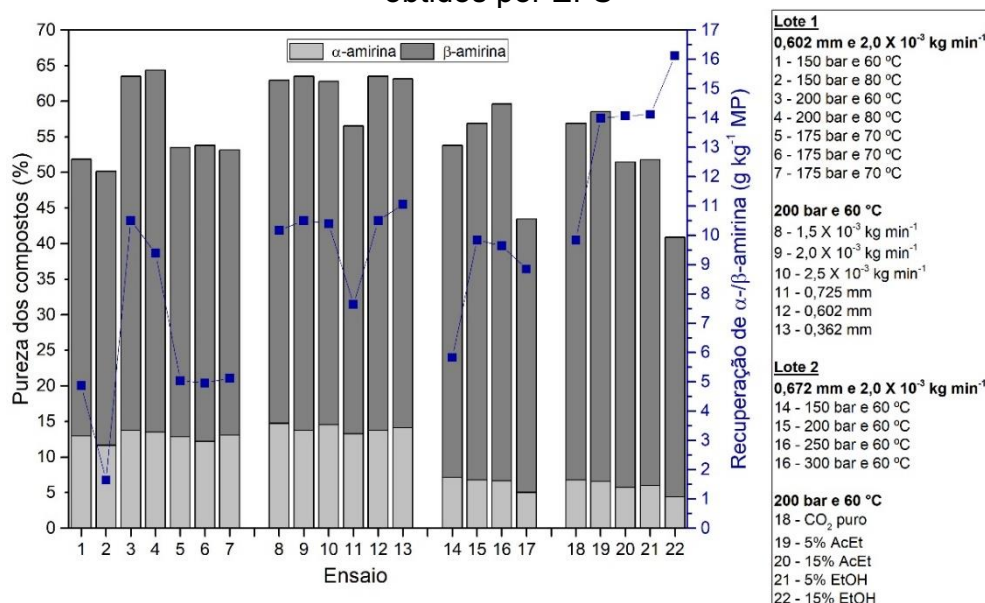
Entretanto, os resultados apresentados por esta técnica instrumental representam valores semi-quantitativos, pois são determinados em relação à área de cada pico em função da soma total das áreas dos picos detectados. Não há garantia que o método utilizado tenha sido capaz de identificar todos os compostos presentes na amostra, nem suas reais proporções, desta forma, torna-se necessária a utilização da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação dos compostos de interesse α -amirina e β -amirina.

4.7 Quantificação de α -amirina e β -amirina por CLAE

4.7.1 Quantificação de α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos extração com fluido supercrítico

Na Figura 4.24 são apresentados os resultados obtidos na quantificação de α -amirina e β -amirina presentes nos extratos de folhas de uvaia obtidos com a extração com fluido supercrítico. Todos os valores obtidos na quantificação de amirinas podem ser encontrados na forma de material complementar no Apêndice B.

Figura 4.24 - Resultados de concentração e rendimento de α -/ β -amirina nos extratos obtidos por EFS



Os resultados demonstram elevados teores de amirinas nos extratos de uvaia obtidos nas condições do planejamento experimental (ensaio de 1 a 7), sendo que variaram entre 50,15 e 64,85 %. Para o composto α -amirina a maior concentração encontrada foi 13,74% obtida com 200 bar e 60 °C (ensaio 3), enquanto que para a β -amirina o maior teor foi 50,85% na condição de 200 bar e 80 °C (ensaio 4).

Para melhor avaliar os resultados obtidos na quantificação, é necessário que o rendimento global seja levado em consideração para que se possa discutir em

quais condições o processo é mais viável para obtenção dos isômeros α -amirina e β -amirina. Observa-se que o melhor resultado ocorreu na condição de 200 bar com 60 °C (ensaio 3), visto que apresentou o melhor rendimento global entre todas as extrações. Nessa condição obteve-se 10,50 g da mistura dos isômeros por kg de folhas secas, sendo que foram 2,27 g de α -amirina e 8,22 g de β -amirina. Este resultado está condizente com os resultados encontrados em estudo anterior (KLEIN et al., 2018), em que foi obtido 11,40 g de amirinas por kg de folhas também na condição de 200 bar com 60 °C.

Os resultados obtidos neste estudo em relação ao rendimento de α -amirina e β -amirina foram elevados e superiores aos teores encontrados em outros trabalhos da literatura já apresentados na Seção 2.3.1.1 (COSSUTA et al., 2008; DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

A Figura 4.24 apresenta também a quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos nos testes adicionais de tamanho de partícula e vazão de solvente. Todas as extrações destes testes foram realizadas com 60 °C e 200 bar, sendo que ao variar a vazão, o tamanho médio de partícula foi mantido constante em 0,602 mm e ao variar o tamanho de partículas a vazão foi mantida constante em $2,0 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$.

Pode-se verificar que a mudança na vazão praticamente não alterou nem a concentração nem os teores de amirinas por massa de folhas, pois os resultados de rendimentos globais entre eles também haviam sido muito parecidos. As concentrações de α -/ β -amirina variaram entre 62,78 e 63,49%, enquanto que a rendimento variou entre 10,17 e 10,50 g kg^{-1} . Já para a alteração de tamanhos médios de partículas é possível verificar que ao se utilizar partículas com diâmetros médios maiores, há uma redução no teor de amirinas presente no extrato e consequentemente redução da quantidade de amirinas obtida por massa de folhas utilizada. Ao aumentar o tamanho de partículas de 0,362 para 0,725 mm, a concentração de amirinas foi de 63,15 para 56,93%, enquanto que a rendimento reduziu de 11,05 para 7,64 g kg^{-1} . Este fato pode ser explicado analisando-se as microscopias eletrônicas de varredura (Seção 4.9), em que é possível visualizar que os compostos α -amirina e β -amirina estão localizados nas bordas das partículas e

partículas maiores apresentam menores áreas de contato das bordas com o solvente o que reduz a quantidade de amirinas de fácil acesso para a extração.

Como não havia matéria-prima suficiente para a realização dos testes envolvendo pressões superiores a 200 bar e os testes com adição de cossolventes, foi necessária a utilização de um lote de folhas coletadas em outra época do ano.

Nos ensaios realizados com a matéria-prima do Lote 2 a concentração de α -/ β -amirina variou entre $43,5 \pm 0,8$ a $60 \pm 1\%$. O maior valor foi obtido com 250 bar. Todavia, não foi estatisticamente diferente do obtido com 200 bar ($57 \pm 3\%$). A maior rendimento dos compostos foi alcançada na extração a 200 bar ($8,7 \pm 0,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ MP}$). É possível observar ainda que na pressão de 300 bar ocorre uma redução drástica da concentração de α -/ β -amirina, o que pode ser justificado pela coextração de outros compostos que acabam atuando como diluentes dos compostos de interesse.

Ao comparar os resultados obtidos no ensaio 15 com os obtidos no ensaio 3, é possível observar que há diferenças, mesmo que tenham sido utilizadas as mesmas condições experimentais (200 bar e 60°C). Estes resultados podem estar relacionados com o fato de terem sido utilizadas matérias-primas de dois lotes diferentes e a composição dos extratos obtidos pode variar de acordo com diversos fatores como época e forma de coleta, bem como variações no preparo e armazenagem do material (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

Na avaliação da adição de cossolventes é possível verificar que a adição de 15% m/m de etanol resultou na diminuição significativa da concentração dos compostos α -/ β -amirina presente nos extratos. A concentração no extrato obtido com 15% m/m de etanol ($41 \pm 4\% \text{ m/m}$) foi 28% menor do que a obtida com CO_2 puro ($57 \pm 3\% \text{ m/m}$). A adição de 15% m/m de etanol possibilita a extração de uma quantidade maior de compostos polares, o que explica a diminuição da proporção de α -/ β -amirina no extrato. Resultados similares foram obtidos ao utilizar 10% m/m de etanol na extração de *Almus glutinosa*, em que a quantidade do terpenóide lupeol foi reduzida em comparação com a extração com CO_2 puro (FELFÖLDI-GÁVA et al., 2012).Rodrigues et al. (RODRIGUES et al., 2019) também estudaram o efeito da adição de etanol como cossolventes na extração de *Artemisia annua* e observaram a redução de artemisina em função do aumento da proporção de etanol adicionado. Isso ocorre devido ao fato do uso de cossolventes aumentar o número de compostos

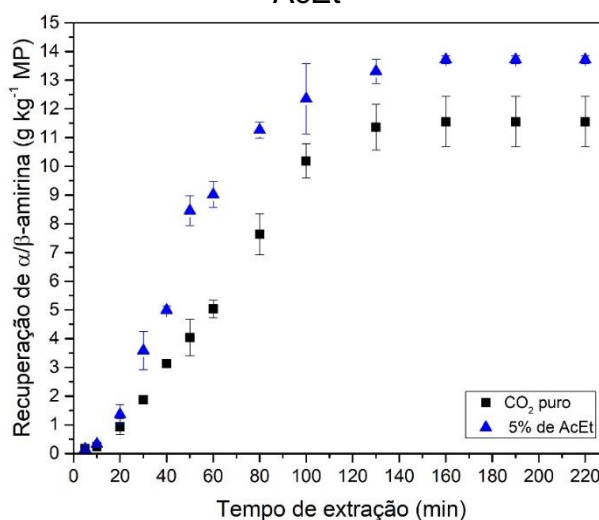
extraídos e reduzir a seletividade da extração (ALMEIDA; MEZZOMO; FERREIRA, 2012).

Por outro lado, é possível observar que a rendimento de α -/ β -amirina aumentou com a adição de cossolventes no CO₂ supercrítico. O extrato obtido com a adição de 15% m/m de etanol resultou no maior valor de rendimento dos compostos entre as condições testadas ($16,1 \pm 0,9$ g kg⁻¹ MP). Este resultado é consistente com a literatura em que a adição de 15% de etanol resultou no aumento da rendimento de naringina de *Citrus Paradise* (GIANNUZZO et al., 2003). Entretanto, o uso de grandes quantidades de cossolventes pode aumentar o custo de manufatura do processo e a baixa concentração obtida nessa condição levaria ao aumento dos custos devido aos processos de isolamento/purificação desses compostos numa possível aplicação industrial.

A adição de 5% de acetato de etila como cossolventes resultou numa concentração similar à obtida com CO₂ puro ($59 \pm 3\%$ m/m e $57 \pm 3\%$ m/m, respectivamente), sendo que entre as médias não há diferença estatística a 5% de confiança. Entretanto, utilizando-se 5% m/m de acetato de etila foi possível obter um rendimento de α -/ β -amirina 24% maior que a obtida com CO₂ puro ($13,0 \pm 0,5$ g kg⁻¹ MP e $9,9 \pm 0,6$ g kg⁻¹ MP, respectivamente). Mesmo que a rendimento de α -/ β -amirina seja menor com 5% m/m de acetato de etila do que com 15% m/m de etanol, a última condição não é viável considerando as razões expressas anteriormente discutidas.

A fim de avaliar o efeito do tempo sobre a rendimento de α -/ β -amirina nas extrações com CO₂ supercrítico puro e com adição de 5% m/m de acetato de etila, foram construídas as curvas cinéticas de extração apresentadas na Figura 4.25.

Figura 4.25 - Curva cinética de extração considerando os resultados de rendimento de α -/ β -amirina nas extrações com CO_2 supercrítico puro e com adição de 5% de AcEt



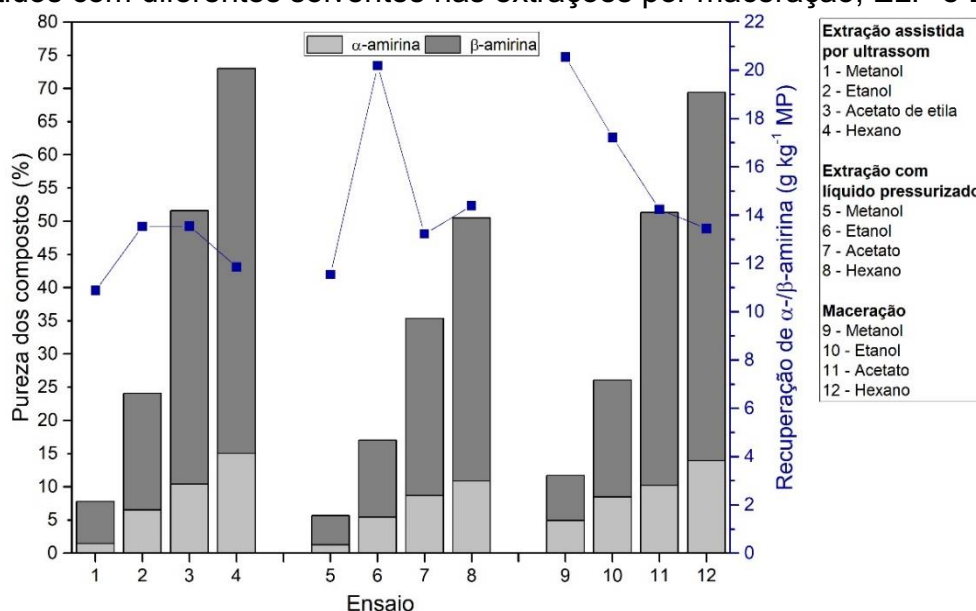
É possível observar que o rendimento de α -/ β -amirina alcançou o período difusional em ambas as extrações. A partir de 130 minutos as extrações alcançaram um resultado constante, sem variações estatisticamente significativas, o que indica que o conteúdo de α -/ β -amirina extraíveis nessas condições foram removidos completamente. O resultado da extração com 5% m/m de AcEt obtido com 130 min ($13,3 \pm 0,4 \text{ g kg}^{-1} \text{ MP}$) é muito próximo do obtido nas extrações de avaliação dos cossolventes ($13,0 \pm 0,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ MP}$) o que indica que o tempo escolhido para a avaliação dos efeitos dos cossolventes é adequado pois encontra-se após ter sido alcançado o período constante da extração.

4.7.2 Avaliação da influência do tipo de solvente sobre a quantidade de α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom, com líquido pressurizado e por maceração

A influência do solvente de extração sobre a composição dos extratos foi avaliada utilizando-se de solventes com diferentes polaridades, sendo eles em ordem de polaridade: Metanol, etanol, acetato de etila e hexano (do mais polar para o mais apolar). Estes resultados podem ser visualizados na Figura 4.26. De forma

complementar, os dados individuais de cada análise estão disponíveis no Apêndice C.

Figura 4.26 - Resultado de concentração e rendimento de α -/ β -amirina nos extratos obtidos com diferentes solventes nas extrações por maceração, ELP e EAU



Pode-se observar que a concentração, em relação às amirinas, dos extratos de folhas de *E. pyriformis* tem uma relação direta com a polaridade dos solventes utilizados, sendo que o uso de solventes menos polares resulta em extratos com maiores teores de α -amirina e β -amirina, visto que tais compostos são preferencialmente extraíveis por solventes apolares (VÁZQUEZ et al., 2011).

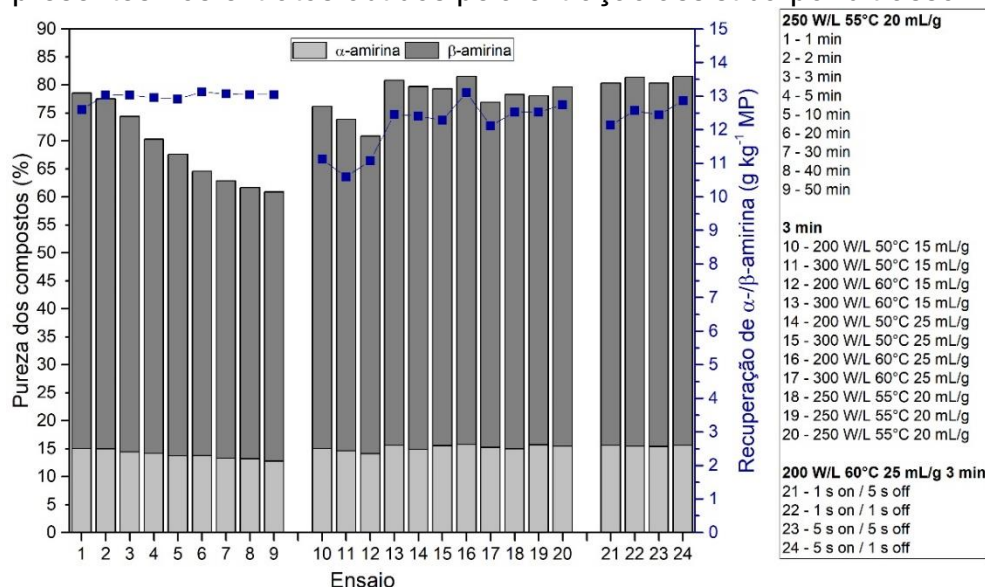
A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que o solvente mais adequado para a obtenção de α -amirina e β -amirina é o Hexano, visto que apresentou os melhores resultados de concentração nas 3 técnicas de extração avaliadas.

4.7.3 Quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos na extração assistida por ultrassom

Na Figura 4.27 são apresentados os resultados de quantificação de α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos sob diferentes condições experimentais na

técnica de extração assistida por ultrassom. Os dados individuais obtidos nas quantificações de amirinas estão disponíveis no Apêndice D.

Figura 4.27 - Resultados obtidos na quantificação dos compostos α -/ β -amirina presentes nos extratos obtidos pela extração assistida por ultrassom



A fim de avaliar o efeito do tempo de extração sobre a composição dos extratos obtidos na extração assistida por ultrassom, foram realizadas extrações com diferentes tempos de duração e foi realizada a quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina. Para estes testes, foram mantidas constantes as demais condições experimentais e foram utilizadas as condições referentes ao ponto central do planejamento experimental que são: 250 W/L, 55 °C e razão em massa de folhas e volume de solvente de 1:20.

Primeiramente, observa-se que menores tempos de extração resultam em extratos com maior concentração dos compostos α -amirina e β -amirina, isso pode ser explicado pela facilidade de remoção destes compostos na condição testada, sendo que com maiores tempos de extração outros compostos presentes na matriz vegetal passam a ser solubilizado e extraídos.

Pode-se observar ainda, que a partir do tempo 2 minutos, praticamente não há variação nos valores de massa de amirina obtida em relação à massa de folhas utilizada para a extração, isso reforça a teoria de que a α -amirina e a β -amirina são

de fácil remoção e todo o conteúdo extraível destes compostos nesta condição, são removidos logo no início da extração. Teoria essa que é reforçada pelas observações das partículas por microscopia eletrônica de varredura apresentadas na Seção 4.9.

Como o valor de massa de amirinas por massa de folhas não aumentou muito entre o tempo de extração de 1 minuto e os demais tempos de extração e como neste tempo a concentração dos compostos foi superior aos obtidos com maiores tempos de extração, este tempo foi fixado para a realização dos demais experimentos.

Para verificar os efeitos das condições experimentais sobre a composição dos extratos, foi realizada a quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos no planejamento experimental (Ensaio 10 a 20).

Pode-se observar que a variação das condições experimentais afeta a composição dos extratos obtidos que variou entre 70,85 e 81,56% m/m. A maior concentração da mistura dos compostos foi obtida na condição de 200 W/L, 60 °C e proporção de 1:25. Nessa mesma condição foram encontradas as maiores concentrações dos compostos individuais, sendo 15,75% m/m de α -amirina e 65,80% m/m de β -amirina.

Observa-se também que o melhor resultado de rendimento de α -/ β -amirina ocorreu na condição de 200 W/L, 60 °C e razão massa/solvente de 1:25, visto que além de ter apresentado a melhor concentração também apresentou o melhor rendimento global entre todas as extrações do planejamento experimental. Nessa condição obteve-se 13,11 g da mistura dos isômeros por kg de folhas secas, sendo que foram 2,53 g de α -amirina e 10,58 g de β -amirina. Este resultado é semelhante, mas superior aos resultados encontrados em estudo anterior (KLEIN et al., 2018), em que foi obtido 11,46 g de amirinas por kg de folhas ao utilizar a EAU com folhas de uvaia em outras condições experimentais.

De forma a avaliar o efeito dos parâmetros secundário, foi realizada a quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos nos testes adicionais realizados com o uso da função pulsar do sonificador em diferentes configurações. Verifica-se que não há muita variação da concentração em função da configuração de pulsos utilizada, entretanto o melhor resultado de rendimento de α -/ β -amirina foi obtido na configuração 5 s *on* / 1 s *off*, possivelmente isso está relacionado com o maior tempo de sonicação total, pois foi fixado o tempo de contato

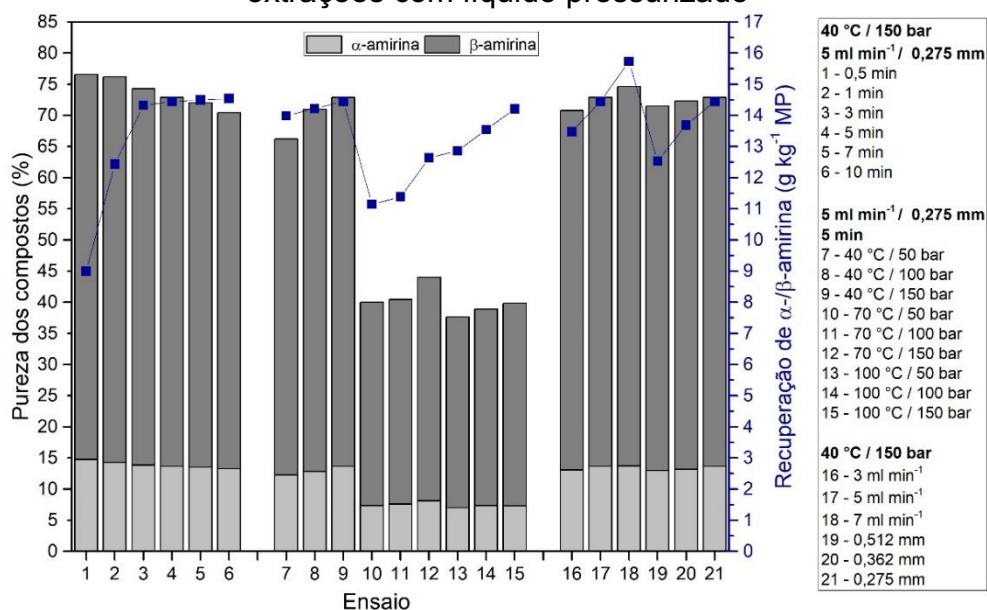
da matéria-prima com o solvente e a variação dos ciclos resultou em diferentes tempos de sonicação.

Os resultados obtidos em relação ao rendimento de α -amirina e β -amirina nas extrações assistidas por ultrassom a partir das folhas de uvaia foram elevados e superiores aos teores encontrados em outros trabalhos da literatura já apresentados na Seção 2.3.1.1 (COSSUTA et al., 2008; DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

4.7.4 Quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado

Foram avaliadas diversas condições experimentais na técnica de extração com solvente pressurizado e os resultados de quantificação de α -amirina e β -amirina são apresentados na Figura 4.28. De forma complementar, todos os resultados obtidos na quantificação de amirinas nos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado estão disponíveis no Apêndice E.

Figura 4.28 - Resultados de quantificação dos compostos α -/ β -amirina obtidos nas extrações com líquido pressurizado



A fim de avaliar o efeito do tempo de extração sobre a composição dos extratos obtidos na extração com líquido pressurizado, foram coletadas separadamente frações obtidas com diferentes tempos de extração e foi realizada a quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina. Para estes testes, foram mantidas constantes as demais condições experimentais e foram utilizadas as condições de 40 °C e 150 bar.

Primeiramente, observa-se que menores tempos de extração resultam em extratos com maior concentração dos compostos α -amirina e β -amirina. Isso pode ser explicado pela facilidade de remoção destes compostos na condição testada, sendo que com maiores tempos de extração outros compostos presentes na matriz vegetal passam a ser solubilizado e extraídos.

Pode-se observar ainda que a partir do tempo 3 minutos, o processo deixa de extrair amirinas e praticamente não há variação nos valores de rendimento de α -/ β -amirina obtida em relação à massa de folhas utilizada para a extração. Isso reforça a teoria de que a α -amirina e a β -amirina são de fácil remoção e todo o conteúdo extraível destes compostos nesta condição é removido logo no início da extração. Foi escolhido o tempo de extração de 5 min para a avaliação dos efeitos de temperatura e pressão, visto que neste tempo de extração há um equilíbrio entre a concentração dos compostos de interesse e o rendimento deles.

Foi realizada uma avaliação dos efeitos da temperatura e pressão sobre a composição dos extratos, sendo avaliadas as temperaturas de 40, 70 e 100 °C e pressões de 50, 100 e 150 bar.

A condição que resultou em maior massa de amirinas por massa de folhas foi a de 40 °C e 150 bar com 14,45 g/kg, nesta mesma condição foi encontrado o melhor resultado de concentração de α -/ β -amirina (72,91% m/m). De forma a avaliar o efeito dos parâmetros secundário, foi realizada a quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos nos testes adicionais realizados com diferentes diâmetros médios de partículas e com diferentes vazões de solvente, fixando-se a temperatura em 40°C e a pressão em 150 bar.

Verifica-se que há variação nas quantidades de amirinas obtidas, sendo que o aumento da vazão, bem como também a diminuição do tamanho das partículas, resultam no aumento da massa de amirinas obtidas por kg de folhas. O que pode ser

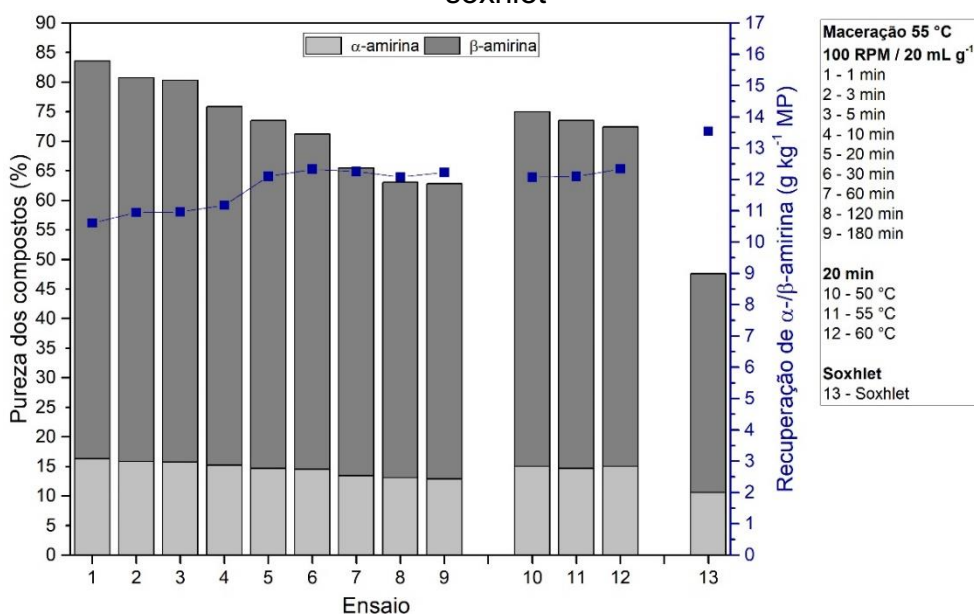
atribuído à facilidade de remoção desses compostos na superfície das partículas devido ao fato de a diminuição do tamanho aumentar a área de contato com o solvente.

Da mesma forma que observado nas técnicas anteriores, os resultados obtidos em relação ao rendimento de α -amirina e β -amirina nas extrações com líquido pressurizado foram elevados e superiores aos teores encontrados em outros trabalhos da literatura já apresentados na Seção 2.3.1.1 (COSSUTA et al., 2008; DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

4.7.5 Quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos por maceração e soxhlet

Os resultados da quantificação de α -amirina e β -amirina presentes nos extratos obtidos por maceração e soxhlet são apresentados na Figura 4.29. Os dados complementares de quantificação de amirinas nos extratos obtidos por maceração e soxhlet estão disponíveis no Apêndice F.

Figura 4.29 - Quantificação de α -/ β -amirina nos extratos obtidos por maceração e soxhlet



Foi realizada a quantificação dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos por maceração com diferentes tempos de extração, sendo eles: 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60, 120 e 180 minutos.

Primeiramente, observa-se que menores tempos de extração resultam em extratos com maior concentração dos compostos α -amirina e β -amirina, e que a concentração reduz com o aumento do tempo de extração. Isso pode ser explicado pela facilidade de remoção destes compostos na condição testada, sendo que com maiores tempos de extração outros compostos presentes na matriz vegetal passam a ser solubilizado e extraídos.

Pode-se observar ainda, que a partir de 20 minutos, praticamente não há variação nos valores de massa de amirina obtida em relação à massa de folhas utilizada para a extração, valor este, 10 vezes maior do que o tempo necessário na extração assistida por ultrassom.

Além do tempo de extração, foi verificado ainda o efeito da temperatura da extração por maceração sobre a quantidade dos compostos α -amirina e β -amirina nos extratos obtidos. Observa-se que o aumento da temperatura reduz levemente a concentração do composto β -amirina nos extratos obtidos. Contudo, ao avaliar a massa de amirinas obtida em função da massa de folhas utilizadas, verifica-se um leve aumento com o aumento da temperatura, isso está relacionado com o aumento do rendimento global.

Foi realizada ainda, a quantificação das amirinas presentes no extrato obtido por soxhlet usando-se hexano como solvente. Foi quantificada 10,60% m/m de α -amirina e 37,03% m/m de β -amirina, resultando numa soma de 47,63% m/m da mistura dos isômeros. Esse valor é bastante inferior aos obtido com outras técnicas de extração utilizando hexano como solvente. Isso se deve ao fato de a extração por soxhlet ser uma extração exaustiva com 6 horas de duração e como já foi constatado anteriormente, tempos maiores de extração favorecem a extração de outros compostos presentes nas folhas de *E. pyrifomis* e consequentemente reduzindo a concentração de amirinas no extrato.

Ao avaliar o rendimento de α -/ β -amirinas obtida utilizando-se extração por soxhlet, obteve-se 3,01 g de α -amirina e 10,54 g de β -amirina por quilograma de folhas

secas, um total de 13,55 g/kg. Este valor é bastante próximo ao obtido nas outras técnicas de extração, mas levemente superior, pois por se tratar de uma técnica exaustiva, possivelmente todo o conteúdo de amirinas presente nas folhas foi removido, inclusive o de difícil acesso que pode não ter sido extraído ao utilizar técnicas de extração menos agressivas e mais seletivas.

4.8 Determinação da capacidade antioxidante dos extratos obtidos

Inicialmente foi realizada uma triagem utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), tendo como revelador uma solução de DPPH, em que o aparecimento de uma mancha amarela, causada pela descoloração do reagente DPPH, indica que a amostra apresenta capacidade antioxidante. A Figura 4.30 demonstra a aparência típica de uma placa de CCD após a eluição e a revelação do resultado. Nela são apresentados os resultados do controle positivo utilizado. Foram utilizadas soluções com concentrações de 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 4.30 - Aparência típica de uma placa de CCD após a análise de capacidade antioxidante



Foram analisados nesta etapa os 96 extratos obtidos com as diferentes técnicas de extração. Dentre todos os extratos somente 8 apresentaram capacidade antioxidante. Os extratos que demonstraram atividade são apresentados na Tabela 4.22 juntamente com os resultados das análises de capacidade antioxidante em

equivalente trolox e da análise de compostos fenólicos totais em equivalente de ácido gálico.

Tabela 4.22 - Capacidade antioxidante dos extratos obtidos com diferentes técnicas de extração

Extração	Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol ET/ g extrato}$)	Compostos fenólicos totais (mg EAG/ g extrato)
EFS – CO ₂ + 15 % m/m etanol	132 $\pm$ 2	29 $\pm$ 4
EAU – metanol	114 $\pm$ 7	98 $\pm$ 2
EAU – etanol	192 $\pm$ 2	102,5 $\pm$ 0,7
ELP – metanol	76 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2
ELP – etanol	353 $\pm$ 2	54 $\pm$ 2
ELP – acetato de etila	126 $\pm$ 1	56 $\pm$ 3
Maceração – metanol	151 $\pm$ 2	115 $\pm$ 5
Maceração – etanol	163 $\pm$ 9	102 $\pm$ 4

Não foram encontrados resultados na literatura de capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais de extratos de *E. pyriformis*, mas outras plantas do mesmo gênero já foram estudadas anteriormente. Para os extratos obtidos a partir de folhas de *Eugenia uniflora* o resultado de compostos fenólicos totais foi similar, sendo 32,7 mg EAG/ g extrato (GARMUS et al., 2014). Capacidade antioxidante pelo método DPPH analisada nos extratos supercríticos de folhas de *Eugenia involucrata* demonstraram valores entre 90,50 – 95,35 $\mu\text{mol ET/ g extrato}$ (BARZOTTO et al., 2019).

4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura do Material Vegetal

Na Figura 4.31 é apresentada uma imagem obtida pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de partículas de folhas de uvaia após moagem e

classificação granulométrica. É possível observar que a superfície da folha apresenta características diferentes na face adaxial (superior) e abaxial (inferior) da folha.

Na face abaxial (Figura 4.33) é possível observar a presença de inúmeros estômatos (estruturas relacionadas com as trocas gasosas) e tricomas tectores unicelulares, estruturas semelhantes a pelos, que não liberam secreção e tem, entre outras funções, reduzir a perda de água por transpiração, auxiliar na defesa contra insetos predadores e diminuir a incidência luminosa. Esses resultados estão de acordo com as características morfoanatômicas das folhas de Uvaia descritas na literatura (ARMSTRONG; DO ROCIO DUARTE; MIGUEL, 2012; KLEIN et al., 2018).

Figura 4.31 - Imagem obtida por MEV das faces adaxial (a) e abaxial (b) de partículas de folha de uvaia que não passaram por nenhum processo de extração – ampliação 200 X

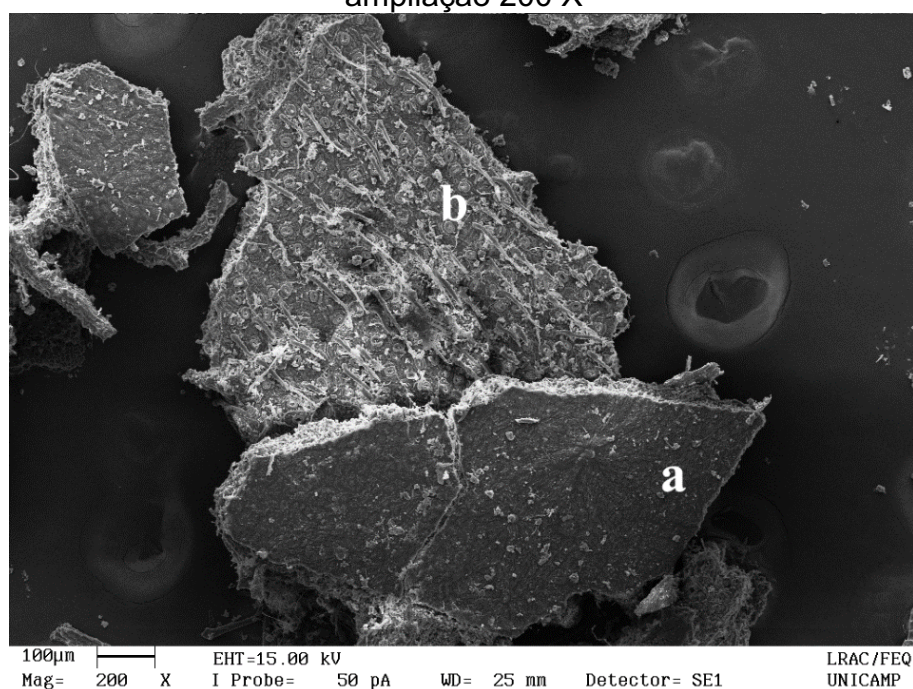


Figura 4.32 – Vista lateral obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 1000 X

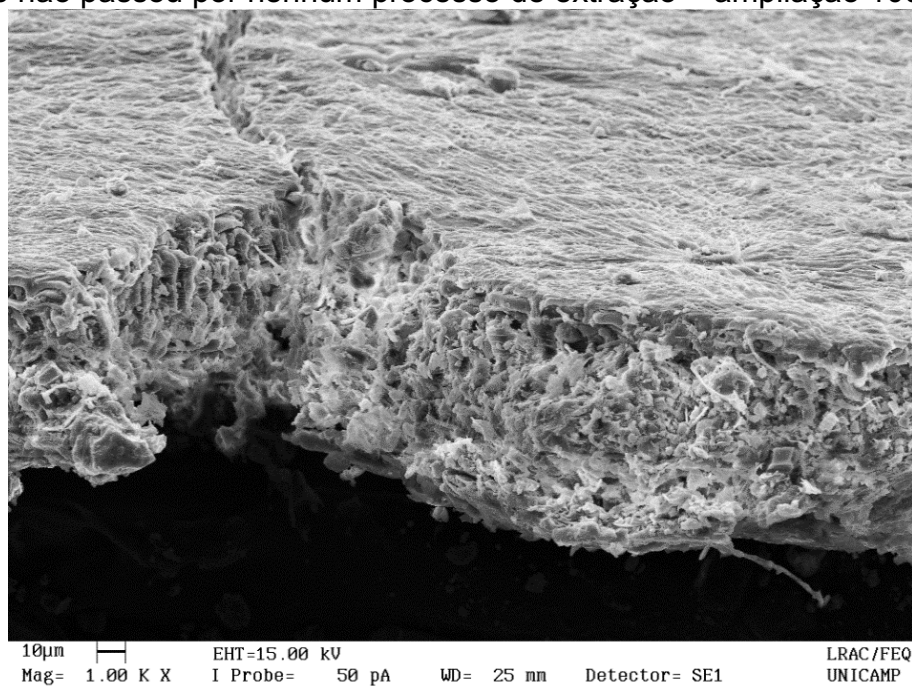
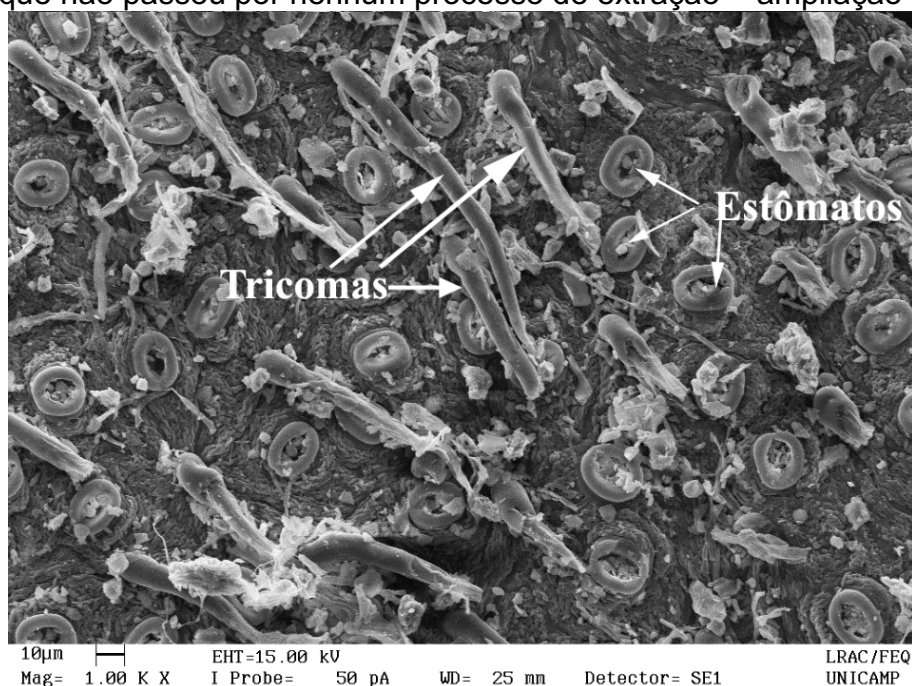


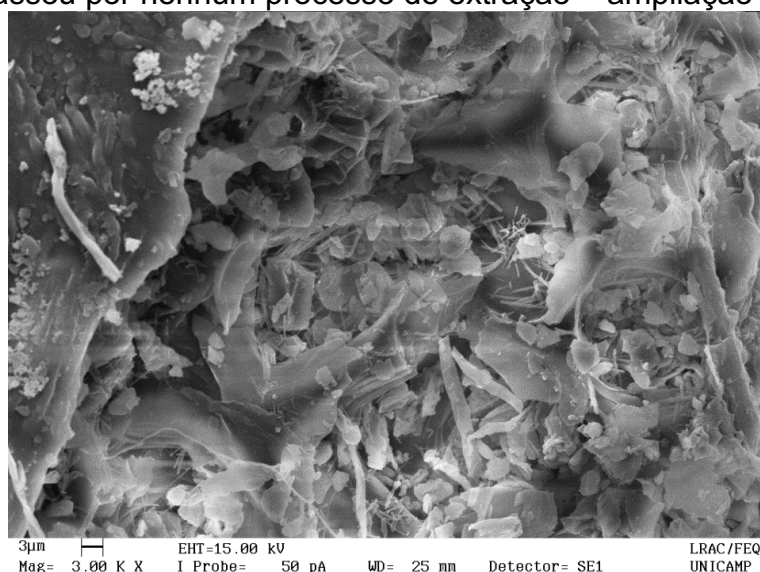
Figura 4.33 - Imagem obtida por MEV da face abaxial de uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 1000 X



Ao comparar as micrografias obtidas antes e após os processos de extração foi possível observar que na superfície (tanto superior quanto inferior) não houve alterações morfológicas. Entretanto, observou-se que na região localizada na borda

das partículas havia estruturas cristalinas nas partículas que não passaram por extração e que tais estruturas não estavam mais presentes nas partículas que passaram pelos processos de extração com CO₂ supercrítico e com hexano nas diferentes técnicas de extração. Possivelmente tais estruturas cristalinas são formadas pelos compostos α -amirina e β -amirina que em temperatura ambiente estão na fase sólida e com grande quantidade disponível para extração.

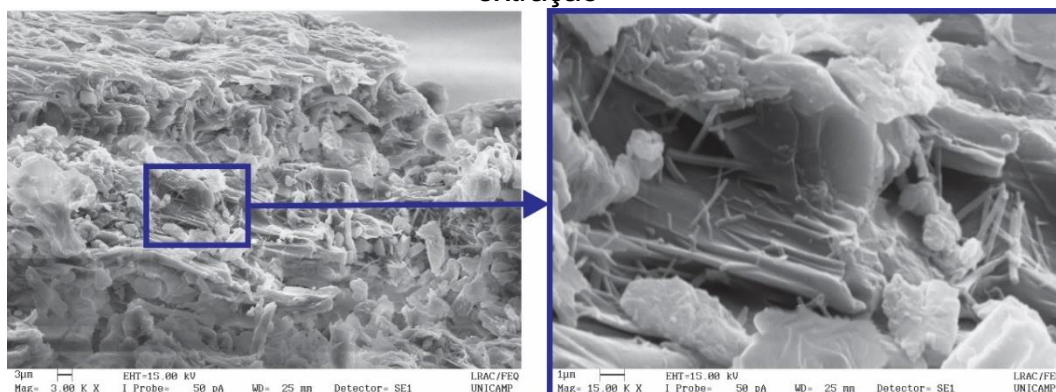
Figura 4.34 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 3000 X



Na Figura 4.34 é possível observar a região da borda citada acima, essas estruturas fazem parte do interior das folhas, que se tornou disponível devido à fragmentação das folhas.

Para facilitar a visualização das estruturas cristalinas presentes na borda das partículas antes da extração, foram obtidas micrografias com vista lateral das partículas.

Figura 4.35 – Ampliações de 3000 X e 15000 X da vista lateral obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração



Pode-se observar as estruturas cristalinas presentes na borda da partícula, sendo que essas estruturas cristalinas não estão presentes após os processos de extração supercrítica (Figura 4.36), maceração com hexano (Figura 4.37) e com hexano pressurizado (Figura 4.41).

Figura 4.36 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após a extração com CO₂ supercrítico com 200 bar e 60 °C – ampliação 3000 X

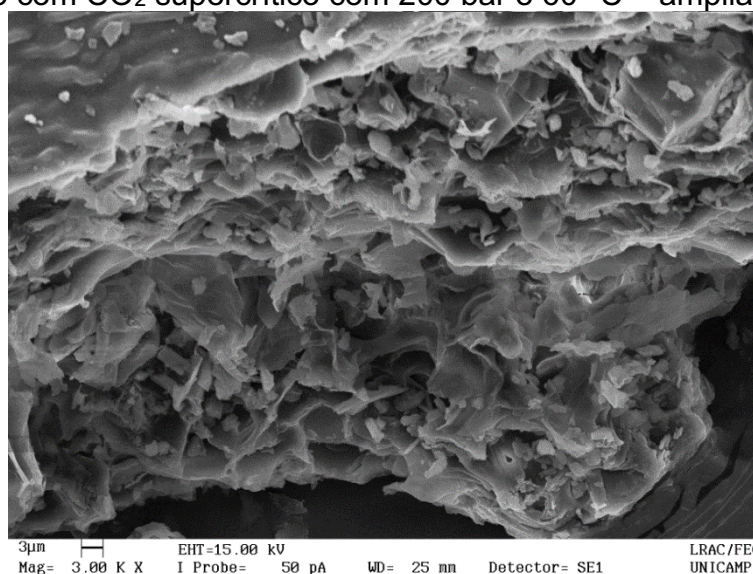
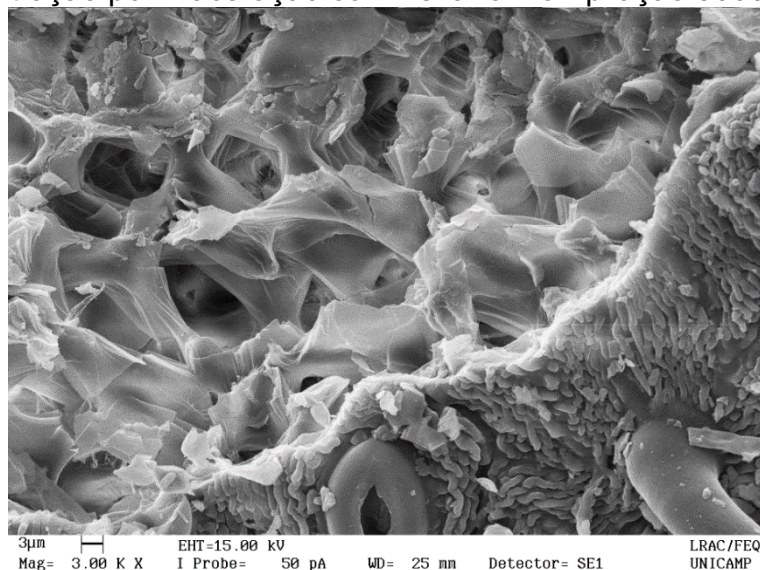
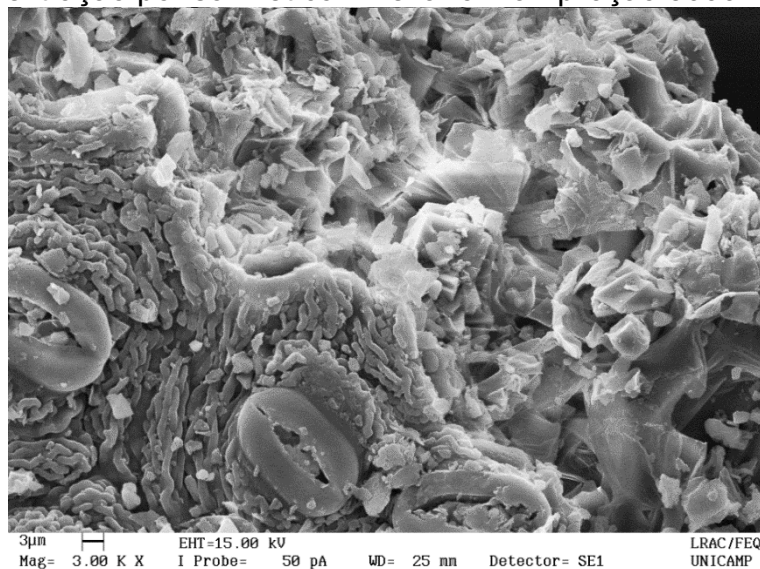


Figura 4.37 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após extração por maceração com hexano – ampliação 3000 X



Verifica-se na Figura 4.37 que a extração por maceração removeu completamente as estruturas cristalinas naturalmente presentes nas bordas da partícula e aumentou levemente a porosidade da borda pela remoção de outros compostos/estruturas.

Figura 4.38 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após extração por soxhlet com hexano – ampliação 3000 X



É possível visualizar na Figura 4.38 que as estruturas cristalinas atribuídas aos compostos α -amirina e β -amirina não estão presentes e que a borda da partícula não sofreu grandes alterações em comparação com as características da borda da partícula antes da extração. Isso possivelmente deve-se ao fato de que nesse método de extração as partículas estão acondicionadas em um cartucho de extração e não são agitadas, sendo que o mecanismo de extração se deve majoritariamente pela solubilização dos compostos no solvente, sem envolver mecanismos de remoção mecânica como pode ser observado nas outras formas de extração em que há agitação (maceração ou por ultrassom) ou utilização de fluxo de solvente com pressões elevadas (EFS e ELP).

Figura 4.39 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após 1 min de EAU com hexano – ampliação 3000 X

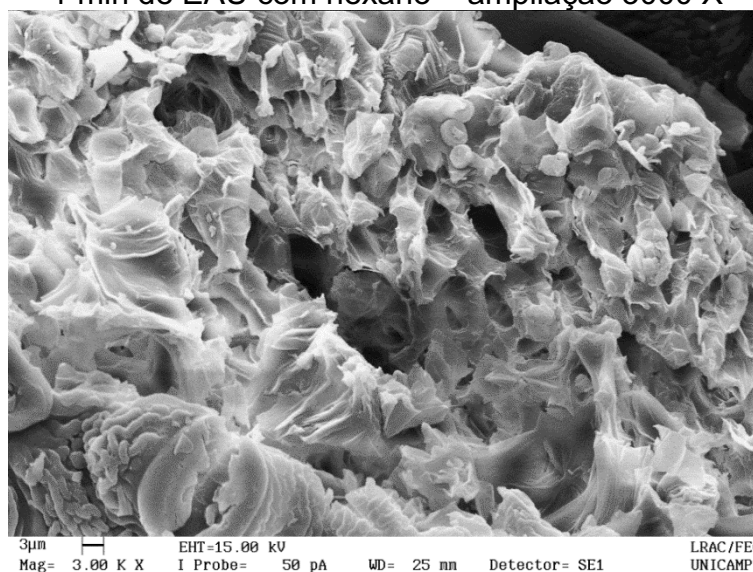
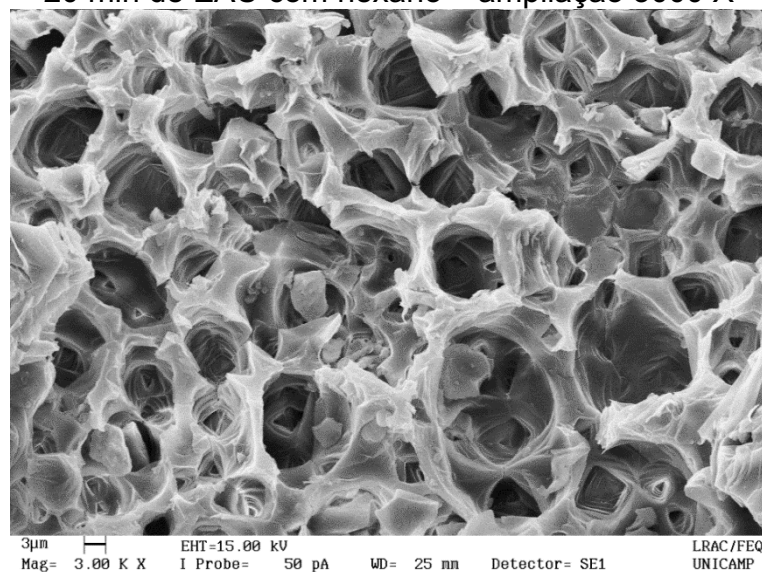


Figura 4.40 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após 20 min de EAU com hexano – ampliação 3000 X



A diferença de porosidade visualizada ao comparar a Figura 4.39 com a Figura 4.40 ajuda a compreender o mecanismo responsável pela extração dos compostos ao utilizar a técnica de extração assistida por ultrassom. Aparentemente o principal mecanismo envolvido na extração é a erosão causada pelo choque de microjatos de solvente originados durante o colapso das bolhas de cavitação próximo à superfície do material (CHEMAT et al., 2017). Além da erosão, outros fenômenos causados pela sonicação podem estar envolvidos na extração, como quebra de partículas e descamação superficial (VILKHU et al., 2008).

Figura 4.41 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após extração com hexano pressurizado – ampliação 3000 X

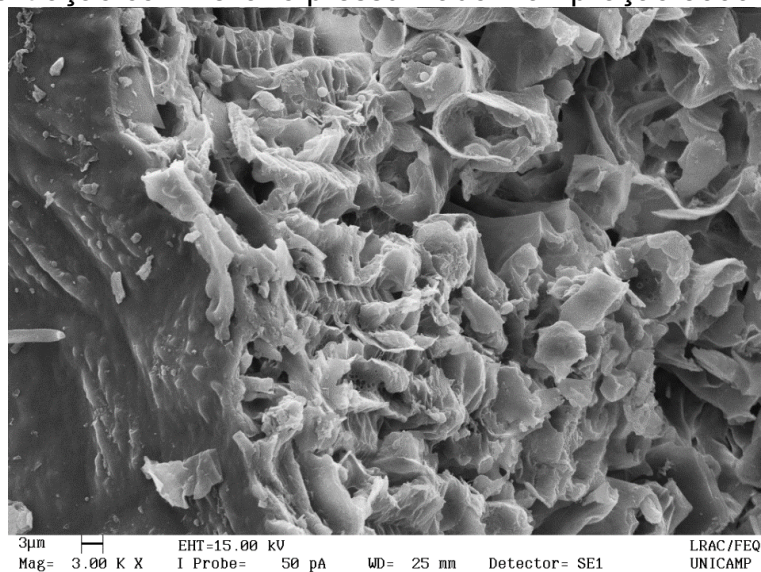
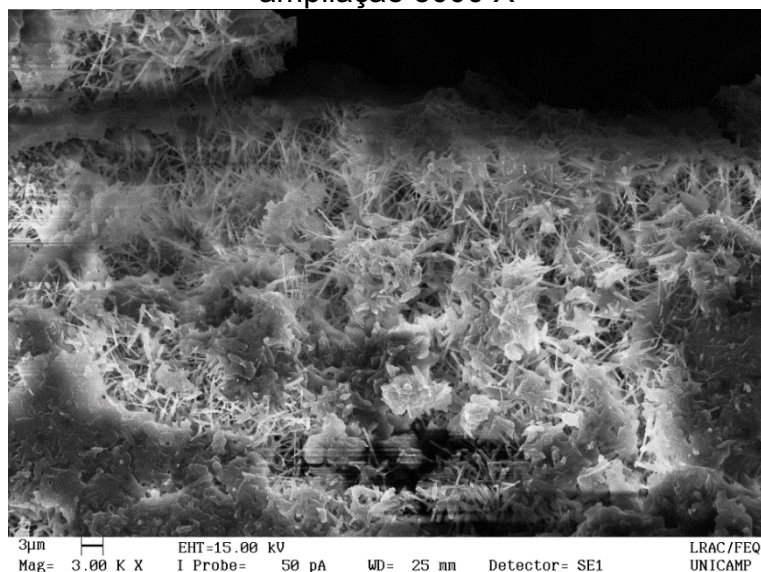


Figura 4.42 - Imagem obtida por MEV do extrato obtido com CO₂ supercrítico – ampliação 3000 X



Na Figura 4.42 é apresentado o aspecto visual do extrato de uvaia obtido com CO₂ supercrítico. O extrato utilizado para obtenção da micrografia foi o obtido com a condição de 200 bar e 60 °C. Como apresentado anteriormente na Seção 4.7.1, esse extrato apresenta 63,49% m/m da mistura de α -amirina e β -amirina, acredita-se que os cristais presentes nos extratos que são semelhantes aos observados nas folhas sejam dos isômeros α -amirina e β -amirina. As estruturas cristalinas observadas nas

micrografias obtidas nesse trabalho se assemelham visualmente com a micrografia disponível na literatura (DA SILVA JÚNIOR et al., 2017a) obtida a partir dos compostos α -amirina e β -amirina isolados da resina de *Protium heptaphyllum*.

4.10 Análise térmica do extrato

A análise térmica do extrato das folhas de uvaia, mediante curva termogravimétrica (TGA) e a primeira derivada (DTG) é apresentada na Figura 4.43. Na curva TGA são observados dois eventos térmicos, sendo que o primeiro ocorre entre as temperaturas 100 e 240 °C e, possivelmente, está relacionado à liberação do conteúdo de água (aproximadamente 7%). Após este, observa-se o principal evento de decomposição da amostra entre as temperaturas de 250 e 450 °C (pico da DTG em 368 °C), com perda de massa de aproximadamente 89%.

Figura 4.43 - Curvas da análise termogravimétrica (TGA) e da primeira derivada (DTG) do extrato obtido com EFS de folhas de uvaia

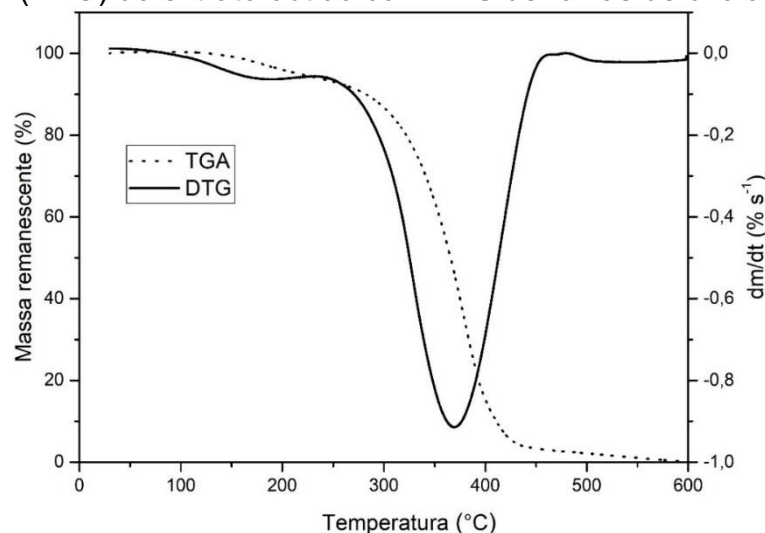
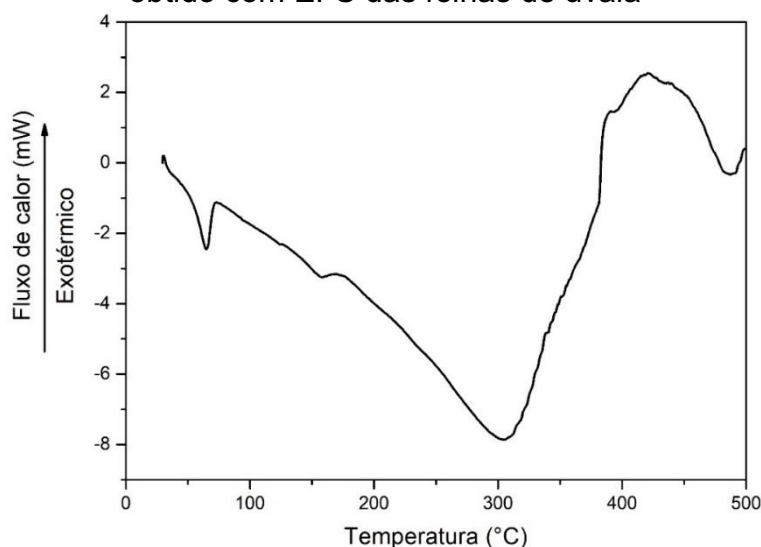


Figura 4.44 - Curva de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o extrato obtido com EFS das folhas de uvaia



Na curva DSC do extrato das folhas de uvaia, Figura 4.44, verifica-se um primeiro evento endotérmico entre as temperaturas de 53,8 e 74,6 °C, com pico em 65 °C, que está provavelmente relacionado a perda de água da amostra (DA SILVA JÚNIOR et al., 2017b; KUMAR TRIVEDI et al., 2017). Seguido deste, os eventos endotérmicos, com picos em 158,3 e 305,9 °C podem ser atribuídos, respectivamente, à fusão da mistura α -/ β -amirina e a volatilização da amostra (DA SILVA JÚNIOR et al., 2017b, 2017a).

Para a análise térmica DSC, Vieira Júnior; Souza; Chaves (2005) verificaram que o pico endotérmico para a fusão da mistura dos isômeros α e β -amirina ocorreu em 174 °C. da Silva Júnior et al. (2017a) verificaram que o evento de fusão destes ocorreu dentro do intervalo de 158 e 185 °C. Para a mesma taxa de aquecimento de 10 °C/min, da Silva Júnior et al. (2017b), encontraram o intervalo de 163 a 185 °C para a fusão da mistura de β e α - amirina (2.64:1).

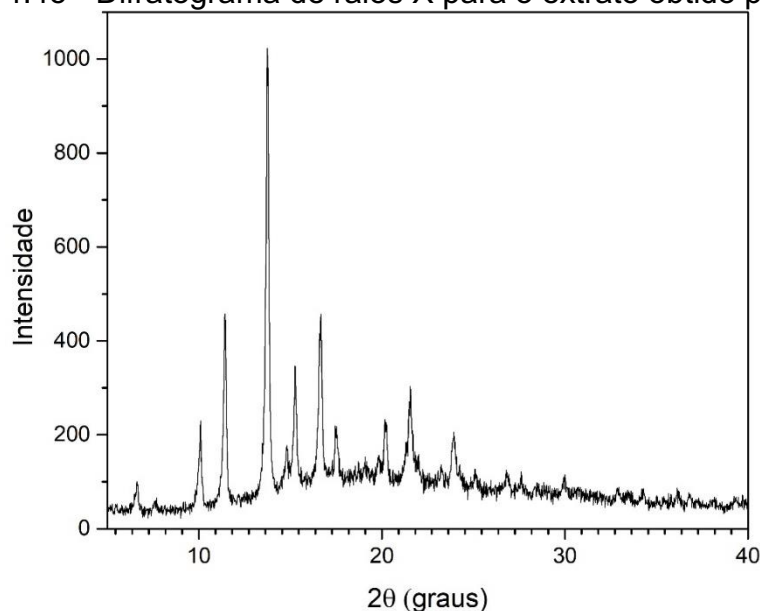
Tendo-se que quanto maior a quantidade de impurezas na amostra (neste caso, compostos diferentes dos isômeros α -amirina e β -amirina) menor o ponto de fusão no DSC e maior a faixa de temperatura em que este evento ocorre (GIRON; GOLDBRONN, 1995; VAN ROMPAY, 1986), é possível concluir que as diferenças encontradas para o ponto de fusão entre os trabalhos podem ser atribuídas à concentração e à proporção dos isômeros. Como já mencionado, o extrato das folhas

de uvaia obtido por EFS na condição de 200 bar e 60 °C constituía de 63,49 % m/m da mistura dos isômeros α -amirina e β -amirina (na proporção de 1:3,62).

4.11 Difração de raios X (DRX)

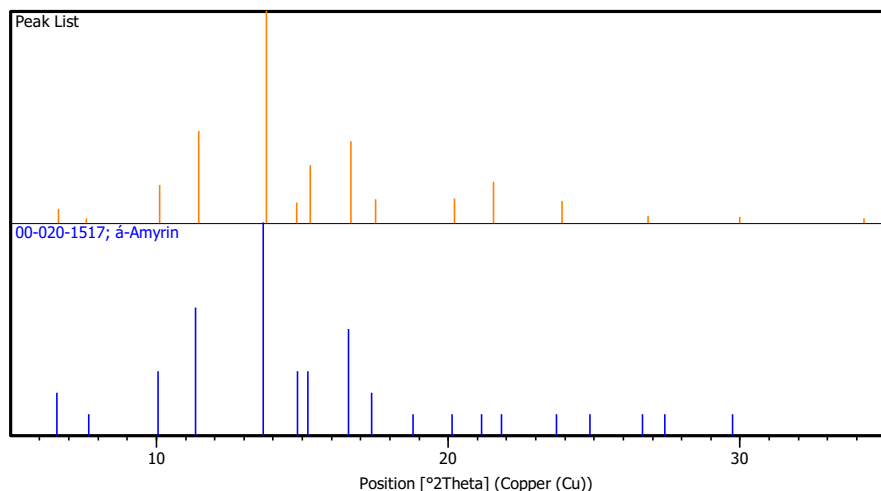
A análise de difração de raios X foi realizada com o extrato de folhas de uvaia obtido com a extração com fluido supercrítica na condição de 60 °C com 200 bar. O difratograma obtido pode ser visualizado na Figura 4.45.

Figura 4.45 - Difratograma de raios X para o extrato obtido por EFS



Ao realizar a busca no banco de dados PDF-2 no *software* do equipamento, foi encontrada similaridade com o difratograma padrão de α -amirina (código de referência: 00-020-1517). O banco de dados utilizado não possui dados da β -amirina. O comparativo dos picos da amostra com os picos padrões de α -amirina pode ser observado na Figura 4.46.

Figura 4.46 - Comparativo do difratograma da amostra com os picos do padrão de α -amirina disponíveis na base de dados PDF-2

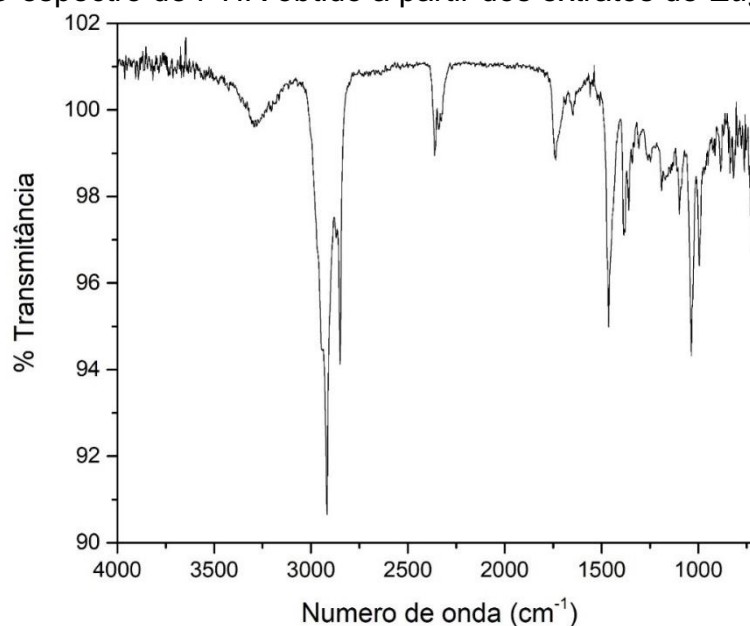


Pode-se observar que há uma boa similaridade entre os picos da amostra e os picos de α -amirina, fato que pode ser explicado pela presença de uma grande quantidade deste composto na amostra analisada (13,74% m/m).

4.12 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR (Figura 4.47) obtido a partir dos extratos de *Eugenia pyriformis* apresentou uma banda de alta intensidade em aproximadamente 2800 cm^{-1} , que corresponde à deformação vibracional axial das ligações de átomos de C-H (FERREIRA et al., 2017). Em 3500–3100 cm^{-1} é encontrada uma banda, que é atribuída ao estiramento de ligações O-H ligadas a uma cadeia carbônica cíclica (DA SILVA JÚNIOR et al., 2017a). Outra banda em 1460–1450 cm^{-1} é característica da vibração de grupos CH_2 e vibração assimétrica de grupos CH_3 (BRUNI; GUGLIELMI, 2014). O pico em 1380–1368 cm^{-1} confirma a presença de deformação de grupos dimetil ($=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) (SINGH et al., 2015). Há ainda, o pico em aproximadamente 1036 cm^{-1} que está relacionado com o estiramento da ligação C-O hidroxílica (SHARMA; MAZUMDAR, 2013).

Figura 4.47 - O espectro de FTIR obtido a partir dos extratos de *Eugenia pyriformis*



4.13 Isolamento e purificação das amirinas

O processo de separação por cromatografia em coluna foi monitorado constantemente por meio da realização de cromatografias em camada delgada (CCD) a fim de verificar se havia presença de amirinas nas frações coletadas. Das 175 frações coletadas, foi observada a presença de amirinas entre as frações 125 e 131, sendo que por similaridades das bandas visualizadas na CCD, as frações de 125 – 127 foram unidas e chamadas de F1, a fração 128 foi mantida separada e chamada de F2 e as frações 129 – 131 foram unidas e identificadas como F3. Após a evaporação, foi possível observar que o material resultante se apresentava como um pó branco levemente amarelado e com características cristalinas. Já o material obtido a partir do processo de purificação desenvolvido que emprega hexano como solvente (identificado como FC), apresentou aspecto semelhante, mas com coloração branca. Na Tabela 4.23 são apresentados os resultados de massa de material resultante, bem como a pureza de amirinas determinada por CLAE.

Tabela 4.23 - Resultados obtidos nos processos de purificação

Amostra	Massa resultante (g)	α -amirina (%)	β -amirina (%)	Total (%)
Extrato bruto	-	5,55	53,79	59,34
F1	0,3485	12,93	58,49	71,42
F2	0,1380	12,60	66,17	78,77
F3	0,1745	10,29	63,13	73,42
FC	0,7535	10,06	83,79	93,85

É possível observar, a partir dos dados obtidos, que o método desenvolvido neste trabalho se mostrou mais eficiente do que o método convencional de separação por cromatografia em coluna aberta. A fração obtida alcançou 93,85% de pureza da mistura de α -/ β -amirina, enquanto que a fração com melhor pureza da cromatografia apresentou somente 78,77% de pureza. Isso indica que o método desenvolvido é mais viável e eficiente, pois além de apresentar melhores resultados, é mais simples de ser executado, é mais rápido e tem menor consumo de solventes.

4.14 Perfil de bioatividade dos extratos obtidos com os diferentes solventes e técnicas de extração

4.14.1 Inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase

A atividade inibitória de α -glucosidase e de α -amilase foi avaliada para os 19 extratos obtidos com os diferentes métodos de extração (Tabela 4.24). Para todos os métodos de extração avaliados, os extratos obtidos com etanol e metanol apresentaram os melhores resultados de inibição. Possivelmente, este comportamento pode estar relacionado à polaridade dos solventes utilizados, uma vez que os tipos de compostos extraídos variam de acordo com a polaridade dos solventes (NAWAZ et al., 2020). Alguns experimentos resultaram em valores negativos de inibição, o que indica que o extrato causou uma ativação na enzima ao invés de uma inibição, como já relatado anteriormente na literatura para outros compostos (TCHAMGOUÉ et al., 2020). Este comportamento pode estar relacionado com uma mudança conformacional derivada da ligação dos compostos presentes nos extratos à enzima (KIM; KWON; SON, 2000). Já os experimentos que apresentaram inibição

superior à 100%, podem ter sofrido influência de características inerentes às amostras, como uma absorção de fundo causada pelos fitoquímicos presentes nos extratos (TAHTAH et al., 2016).

Tabela 4.24 - Valores de triagem da atividade de inibição para cada um dos 19 diferentes extratos de folhas de *Eugenia pyriformis*

Nome da amostra	Codificação	α -glicosidase ¹	α -amilase ²	PTP1B ³
SFE_CO2	A1	26,23 $\pm$ 4,72	-29,91 $\pm$ 6,62	108,66 $\pm$ 19,68
SFE_CO2_EAC	A2	21,84 $\pm$ 2,92	-22,49 $\pm$ 6,29	82,12 $\pm$ 0,78
SFE_CO2_ETH	A3	13,96 $\pm$ 2,51	-27,67 $\pm$ 18,41	122,13 $\pm$ 5,98
PLE_MET	A4	99,44 $\pm$ 0,05	89,77 $\pm$ 0,5	102,91 $\pm$ 9,00
PLE_ETH	A5	99,33 $\pm$ 0,31	95,8 $\pm$ 0,89	107,42 $\pm$ 6,93
PLE_EAC	A6	92,83 $\pm$ 1,8	24,07 $\pm$ 7,3	147,15 $\pm$ 27,30
PLE_HEX	A7	98,07 $\pm$ 0,57	-2,12 $\pm$ 5,74	39,73 $\pm$ 15,24
UAE_MET	B1	99,39 $\pm$ 0,25	92,7 $\pm$ 0,92	95,52 $\pm$ 3,19
UAE_ETH	B2	99,31 $\pm$ 0,15	97,51 $\pm$ 1,07	88,30 $\pm$ 13,18
UAE_EAC	B3	8,85 $\pm$ 3,52	-48,12 $\pm$ 16,64	131,80 $\pm$ 12,14
UAE_HEX	B4	26,87 $\pm$ 2,41	-26,9 $\pm$ 16,45	47,19 $\pm$ 16,35
MAC_MET	B5	99,17 $\pm$ 0,31	93,39 $\pm$ 0,36	96,16 $\pm$ 3,24
MAC_ETH	B6	98,77 $\pm$ 0,25	88,49 $\pm$ 1,81	78,85 $\pm$ 9,03
MAC_EAC	B7	-0,78 $\pm$ 3,82	-17,6 $\pm$ 10,18	25,84 $\pm$ 9,19
MAC_HEX	C1	30,42 $\pm$ 4,11	-39,21 $\pm$ 2,76	64,62 $\pm$ 27,30
SOX_MET	C2	99,34 $\pm$ 0,25	94,49 $\pm$ 1,79	106,37 $\pm$ 4,34
SOX_ETH	C3	99,25 $\pm$ 3,19	95,43 $\pm$ 0,68	92,17 $\pm$ 16,67
SOX_EAC	C4	94,38 $\pm$ 1,15	40,73 $\pm$ 9,24	127,48 $\pm$ 10,10
SOX_HEX	C5	17,57 $\pm$ 0,15	-8,56 $\pm$ 8,78	60,01 $\pm$ 38,50

¹ % de inibição a 800 μ g/mL

² % de inibição a 400 μ g/mL

³ % de inibição a 100 μ g/mL

Nas amostras em que foi encontrada atividade inibitória de α -glicosidase ou de α -amilase, os valores de IC₅₀ foram determinados usando ensaios de inibição dependente da concentração. Os valores de IC₅₀ são exibidos na Tabela 4.25. Diversos extratos mostraram forte atividade inibitória, particularmente contra α -glicosidase. O extrato com melhor IC₅₀ foi o extrato metanólico obtido por extração assistida por ultrassom (1,85 μ g/mL). Este valor é semelhante ao reportado anteriormente para o extrato bruto de *Morus alba* (1,70 μ g/mL) (ZHAO et al., 2018). Não foram encontrados na literatura estudos de inibição de α -glicosidase utilizando extratos de *Eugenia pyriformis*.

Tabela 4.25 - Valores de IC₅₀ da atividade de inibitório (µg/mL) para cada um dos 19 diferentes extratos de folhas de *Eugenia pyriformis*.

Amostra	Codificação	α -glucosidase	α -amilase
SFE_CO2	A1	> 400	> 800
SFE_CO2_EAC	A2	> 400	> 800
SFE_CO2_ETH	A3	> 400	> 800
PLE_MET	A4	2,09	79,71
PLE_ETH	A5	3,62	54,69
PLE_EAC	A6	33,49	> 800
PLE_HEX	A7	25,79	> 800
UAE_MET	B1	1,85	54,72
UAE_ETH	B2	2,5	42,13
UAE_EAC	B3	> 400	> 800
UAE_HEX	B4	> 400	> 800
MAC_MET	B5	2,3	53,62
MAC_ETH	B6	19,75	49,68
MAC_EAC	B7	> 400	> 800
MAC_HEX	C1	> 400	> 800
SOX_MET	C2	3,62	77,61
SOX_ETH	C3	3,43	60,8
SOX_EAC	C4	14,86	> 800
SOX_HEX	C5	> 400	> 800

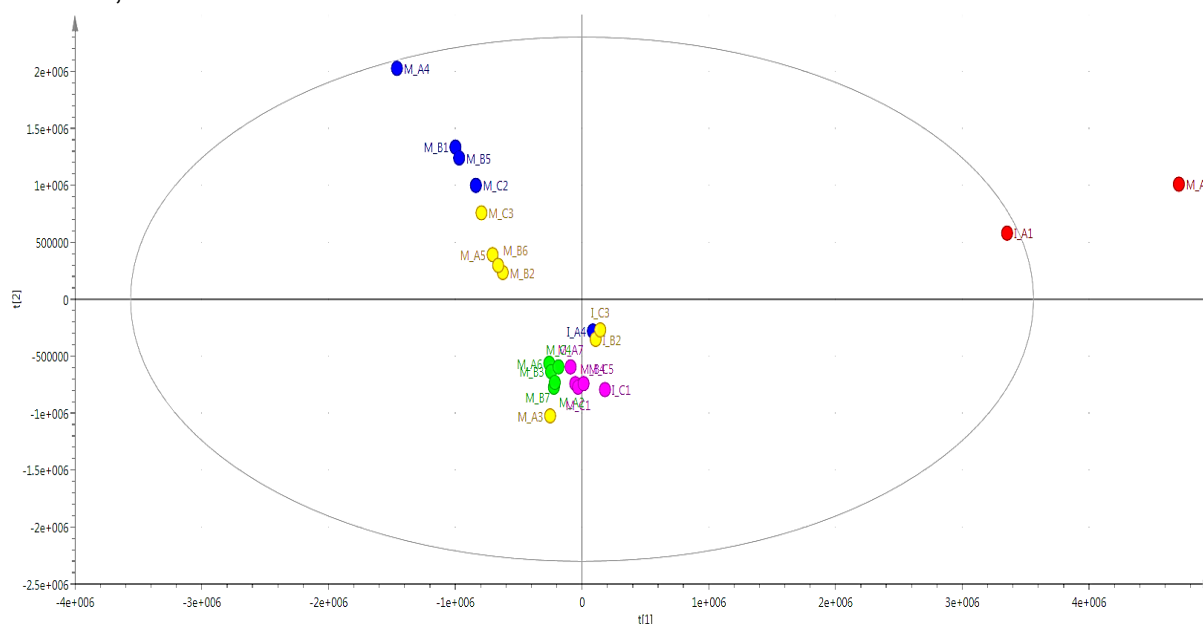
4.14.2 PCAs para os cromatogramas de CLAE-EMAR e espectros de RMN de ¹H dos extratos relacionados com os valores de IC₅₀

As PCAs foram realizadas utilizando os cromatogramas de CLAE-EMAR e espectros de RMN de ¹H para se determinar quais extratos e quais picos/compostos poderiam ser responsáveis pela atividade inibitória da α -glucosidase e da α -amilase encontradas nas folhas de *Eugenia pyriformis*.

Quando a PCA foi realizada com os cromatogramas de CLAE-EMAR dos extratos centrados na média, nenhum agrupamento foi aparente ao se comparar os diferentes métodos de extração (EFS, ELP, EAU, maceração ou soxhlet) para os três primeiros componentes principais (PCs). No entanto, uma tendência de agrupamento para as diferentes amostras dependendo do tipo de solvente foi observada no gráfico de pontuação do PCA do PC1 e PC2 (Figura 4.48). As amostras extraídas com CO₂ supercrítico puro foram claramente separadas do resto das amostras na direção

positiva de PC1. As amostras extraídas com acetato de etila ou hexano, respectivamente, foram agrupadas cada uma no meio do gráfico de PCA. As amostras extraídas com etanol estavam no centro do gráfico de pontuação ou na direção negativa do PC1 e na direção positiva do PC2. Um padrão semelhante, como para as amostras extraídas com etanol, foi visto para as amostras extraídas com metanol. As amostras extraídas com metanol foram as amostras mais separadas das demais, exceto quando comparadas às amostras extraídas com CO₂ supercrítico puro.

Figura 4.48 – Gráfico de pontuação do PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média. A coloração varia de acordo com os solventes utilizados no método de extração. Vermelho: scCO₂ puro, amarelo: EtOH, verde: AcEt, rosa: hexano, azul: metanol.



Ao atribuir cores de acordo com os valores de IC₅₀ para atividade de inibição de α -glicosidase ou α -amilase, padrões semelhantes foram observados (Figura 4.49 e Figura 4.50). As amostras na direção negativa de PC1 e na direção positiva de PC2 foram principalmente as amostras que deram origem à atividade de inibição. No entanto, algumas das amostras dissolvidas em isopropanol situadas perto do centro do gráfico de pontuação também mostraram atividade de inibição de α -glicosidase e α -amilase.

Figura 4.49 – Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média como na figura anterior. A coloração está de acordo com os valores de IC_{50} para a atividade de inibição da α -glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde: média atividade de inibição, amarelo: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.

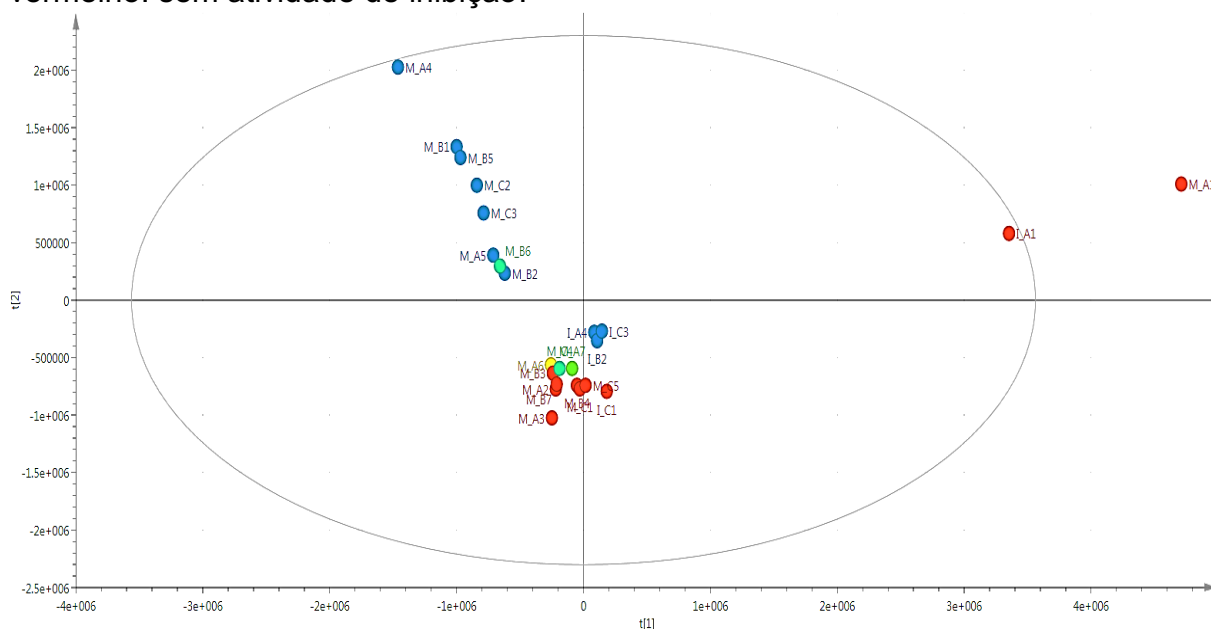
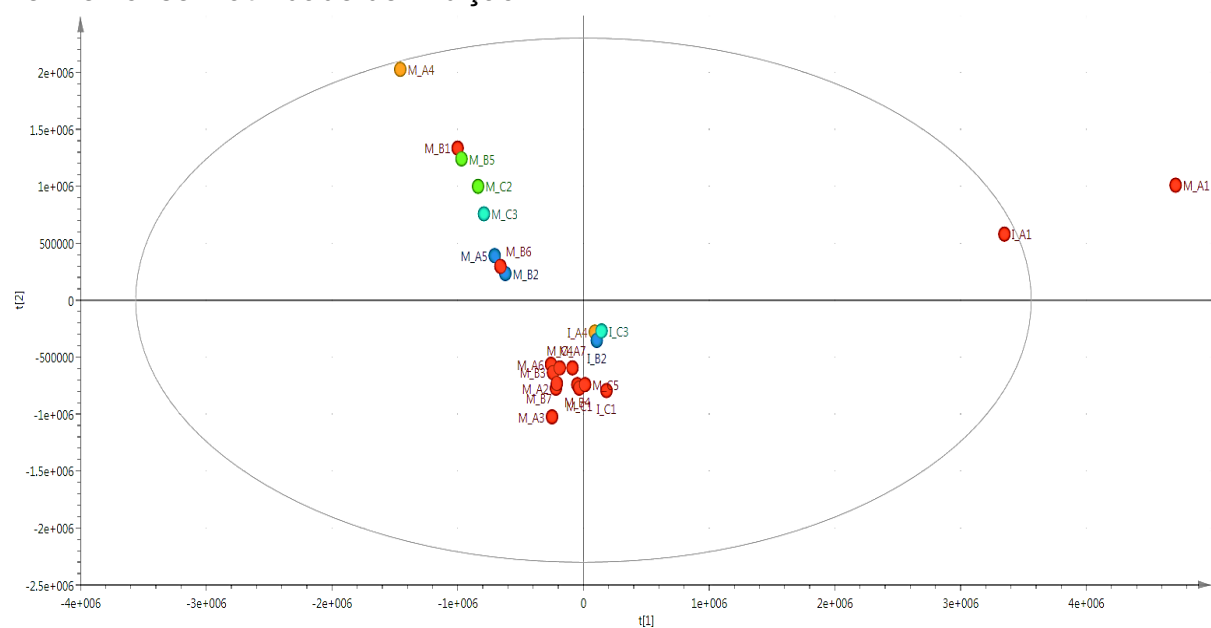


Figura 4.50 - Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média como na Figura 4.61. A coloração está de acordo com os valores de IC_{50} para a atividade de inibição da α -amilase. Azul: alta atividade de inibição, verde: média atividade de inibição, amarelo: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.



Quando a PCA foi realizada nos cromatogramas centrados na média e na escala de Pareto (Figura 4.51), não foi observada uma separação tão evidente das amostras de acordo com o tipo de solvente de extração, como para os cromatogramas que estavam apenas centrados na média (Figura 4.48). As Figura 4.52 e Figura 4.53 mostram os gráficos de pontuação para os cromatogramas com escala de Pareto ao colorir de acordo com os valores de IC_{50} para a atividade de inibição de α -glicosidase e α -amilase, respectivamente, enquanto a Figura 4.54 mostra o gráfico de carregamento. Ao colorir cada amostra no BPC de acordo com seus valores de IC_{50} de α -glicosidase (Figura 4.55) ou α -amilase, uma indicação de quais picos podem estar relacionados a compostos que causam atividade de inibição é aparente. Quanto aos dados centrados na média, também é visualizado a partir dos dados em escala de Pareto que as amostras extraídas com etanol ou metanol são as amostras com alta atividade de inibição (Figura 4.51, Figura 4.52 e Figura 4.53). As amostras ativas estão localizadas principalmente na direção negativa de PC1, e a partir do gráfico de carregamento é aparente que picos em cerca de 2,5, 2,8, 19,5, 28,3, 31 e 33,5 minutos podem ser responsáveis por esta atividade de inibição (Figura 4.52, Figura 4.53, Figura 4.54 e Figura 4.55).

Figura 4.51 – Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de Pareto. A coloração é de acordo com os solventes utilizados no método de extração. Vermelho: $scCO_2$ puro, amarelo: EtOH, verde: AcEt, rosa: hexano, azul: metanol.

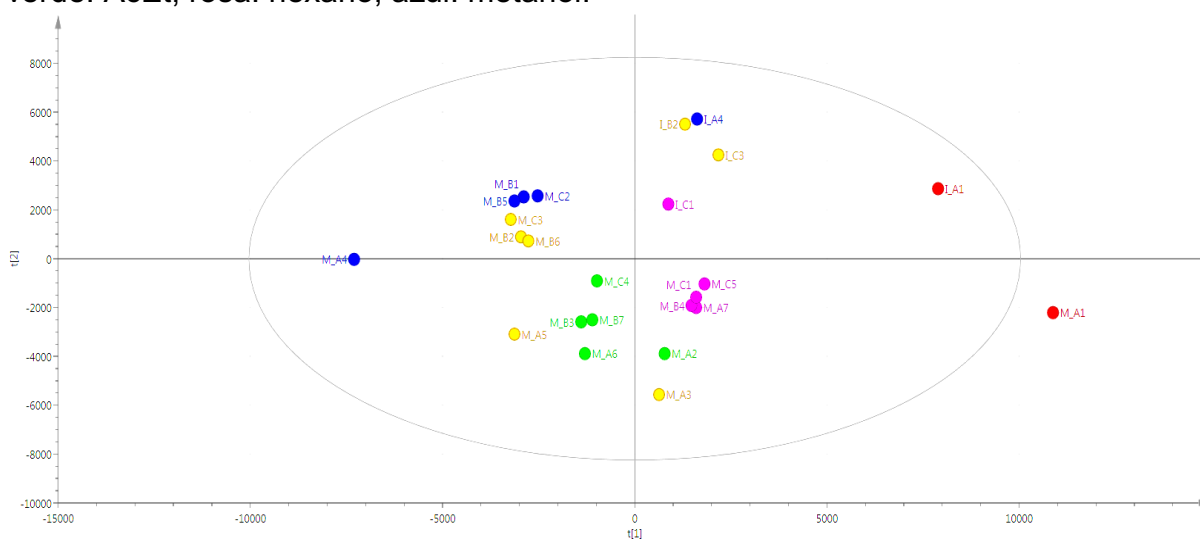


Figura 4.52 - Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de Pareto como na Figura 4.65. A coloração está de acordo com os valores de IC_{50} para a atividade de inibição de α -glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde: média alta atividade de inibição, amarelo: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.

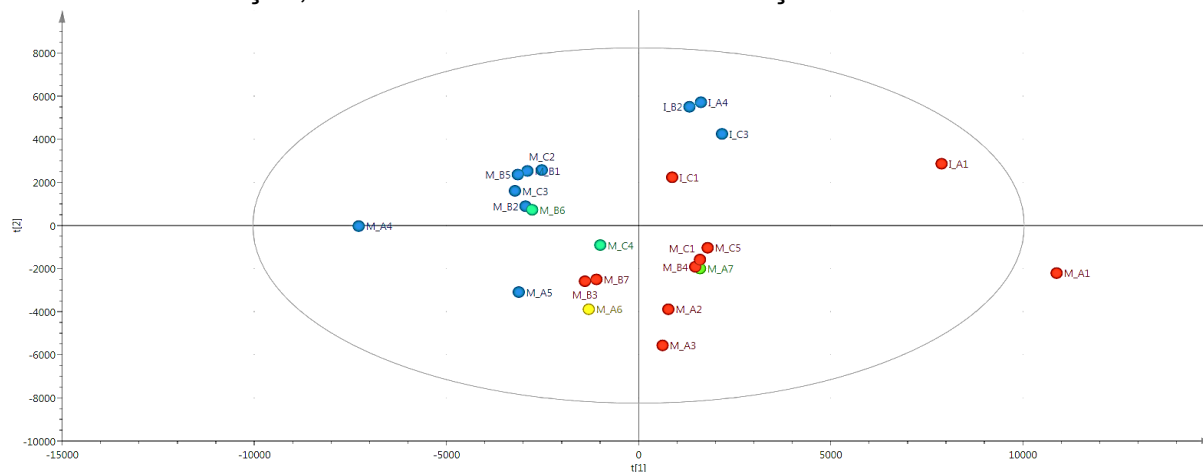


Figura 4.53 – Gráfico de pontuação de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de Pareto como na Figura 4.65. A coloração está de acordo com os valores de IC_{50} para a atividade de inibição de α -amilase. Azul: alta atividade de inibição, verde: média alta atividade de inibição, amarelo: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.

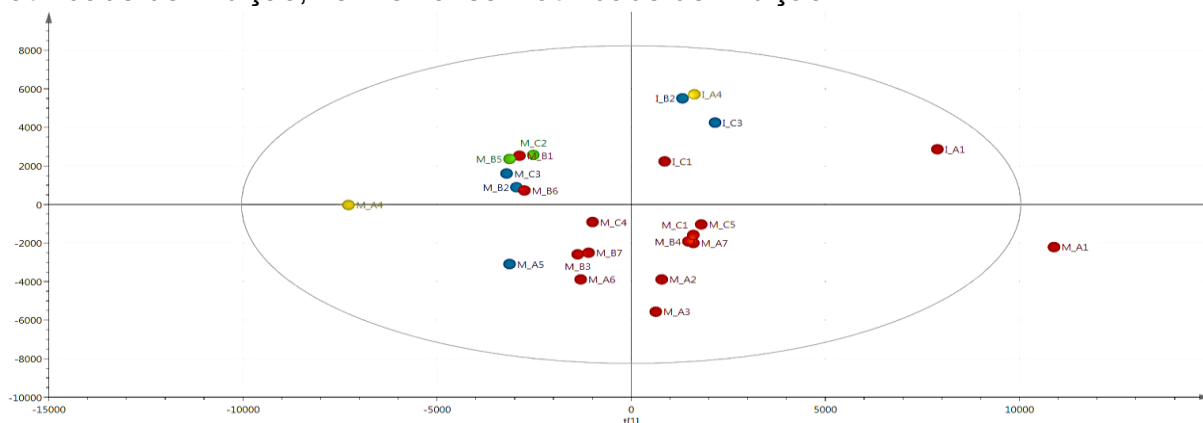


Figura 4.54 - Gráfico de carregamento de PCA dos cromatogramas de extratos de folhas de uvaia centrados na média e escalados de Pareto

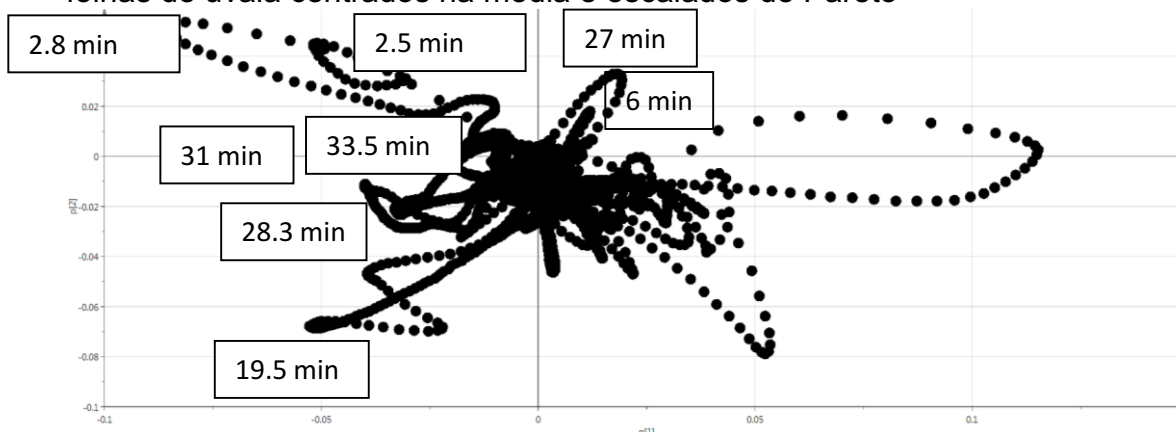
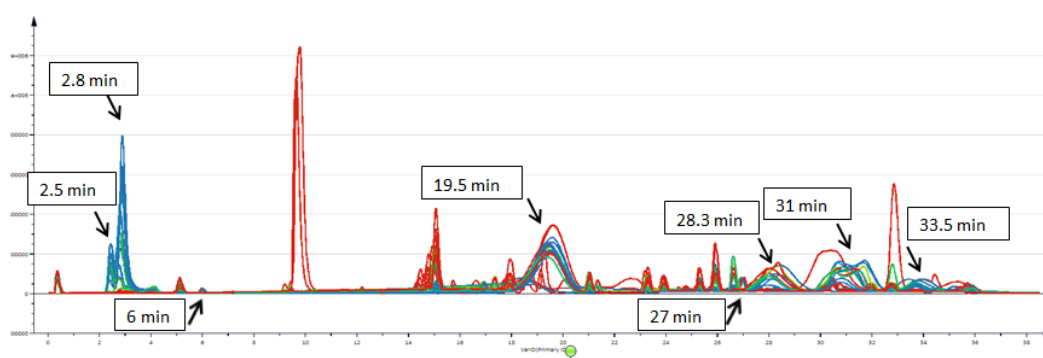


Figura 4.55 – Cromatogramas de todos os diferentes extratos de folhas de uvaia. A coloração está de acordo com os valores de IC_{50} para a atividade de inibição da α -glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde escuro: média alta atividade de inibição, verde claro: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.



No modelo PCA em que os cromatogramas estão na escala de Pareto, mais peso é dado a picos médios e menores, em comparação com cromatogramas que não são escalados, nos quais os picos grandes recebem mais peso. Portanto, o modelo de PCA em que nenhuma escala é aplicada fornece uma boa indicação de quais dos picos, e consequentemente compostos, podem ser responsáveis pela atividade de inibição. No entanto, o modelo com os cromatogramas com escala de Pareto também permite a possível identificação de picos menores que podem estar relacionados a compostos responsáveis pela atividade de inibição. Nos dados em escala de Pareto, as amostras também são mais separadas no gráfico de PCA, o que oferece uma melhor opção para identificar amostras individuais ou um grupo de amostras que têm uma alta atividade de inibição. No presente estudo, é evidente que

três das amostras dissolvidas em isopropanol são separadas das outras amostras ativas de inibição de α -glicosidase ou α -amilase, devido a outras variáveis de pico (Figura 4.51, Figura 4.52, Figura 4.53, Figura 4.54 e Figura 4.55). Essas variáveis de pico de BPC são picos menores (Figura 4.55), em cerca de 6 e 27 minutos, e podem contribuir ou ser responsáveis pela atividade de inibição nessas amostras.

O PCA foi realizado em espectros de RMN de ^1H centrados na média de extratos de folhas de *Eugenia pyriformis*, em espectros sem escala, em espectros em escala de UV (Figura 4.56) e em escala de Pareto. Os gráficos de pontuação de PCA de PC1 e PC2 dos três modelos de PCA diferentes pareciam semelhantes. As amostras extraídas com metanol e etanol foram localizadas na direção negativa de PC1 (Figura 4.56). Esse padrão é semelhante ao observado para os cromatogramas (Figura 4.51). Consequentemente, também foram observados padrões semelhantes para as atividades de inibição da α -glicosidase (Figura 4.57) e α -amilase, mostrando que o metanol seguido pelas amostras extraídas com etanol tem a maior atividade de inibição.

Figura 4.56 – Gráfico de pontuação de PCA de espectros de RMN de ^1H de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de UV. A coloração é de acordo com os solventes utilizados no método de extração. Vermelho: scCO_2 puro, amarelo: EtOH, verde: AcEt, rosa: hexano, azul: metanol.

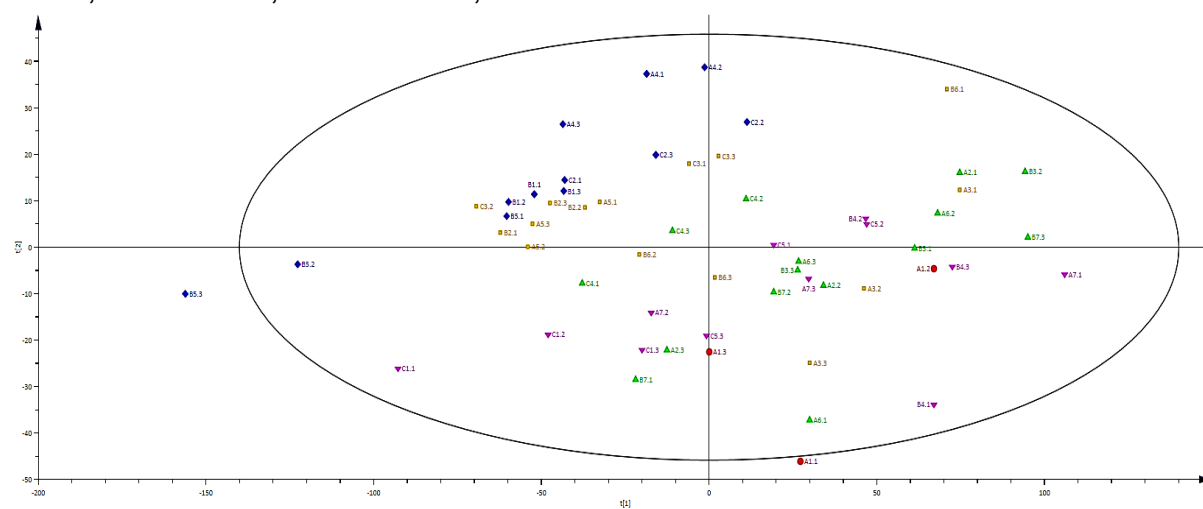
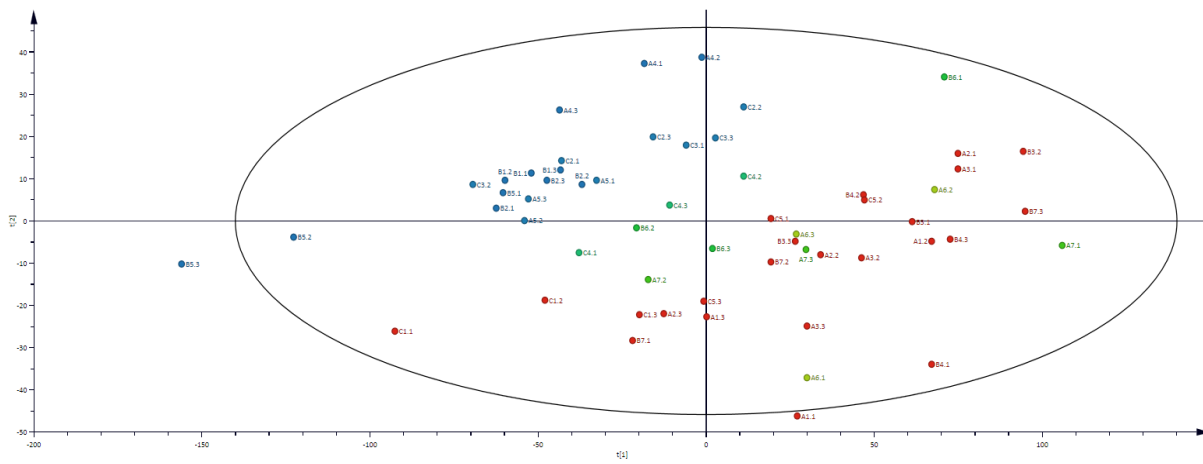


Figura 4.57 – Gráfico de pontuação de PCA de espectros de RMN de ^1H centrados na média e em escala de UV de extratos de folhas de uvaia. Coloração como na Figura 4. A coloração está de acordo com os valores de IC_{50} para a atividade de inibição da α -glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde escuro: média alta atividade de inibição, verde claro: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.



A Figura 4.58 mostra o gráfico de carregamento de espectros de RMN de ^1H centrados na média e em escala de UV. Os dados em escala de UV foram escolhidos a fim de aumentar a chance de identificar não apenas picos grandes, mas também possivelmente picos médios e menores provenientes de compostos que podem ser responsáveis pela atividade de inibição da α -glicosidase ou α -amilase. Quanto aos cromatogramas, ao colorir cada amostra nos espectros de ^1H NMR de acordo com seus valores de IC_{50} de α -glicosidase (Figura 4.59) ou α -amilase, uma indicação de quais picos podem estar relacionados aos compostos que causam atividade de inibição, torna-se aparente.

Figura 4.58 – Gráfico de carregamento de PCA de espectros de RMN de ^1H de extratos de folhas de uvaia centrados na média e em escala de UV.

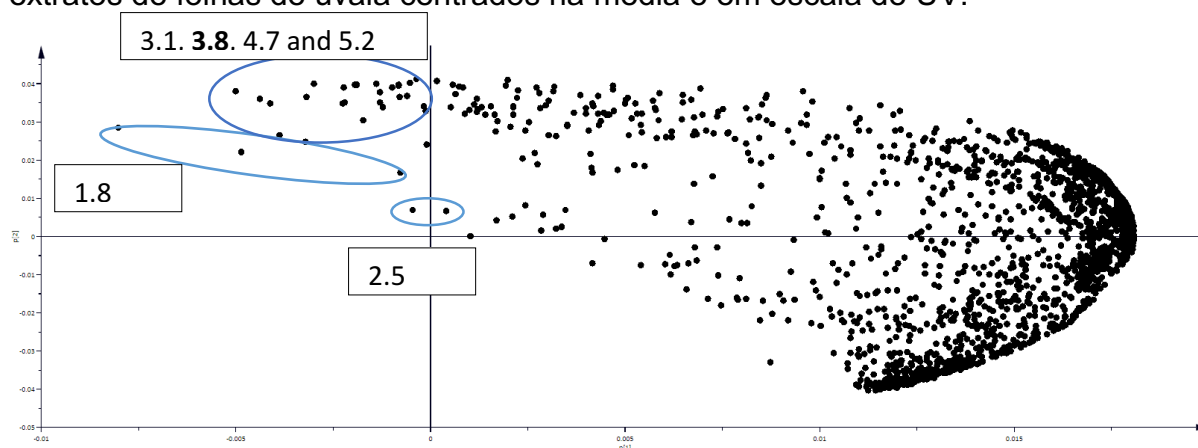
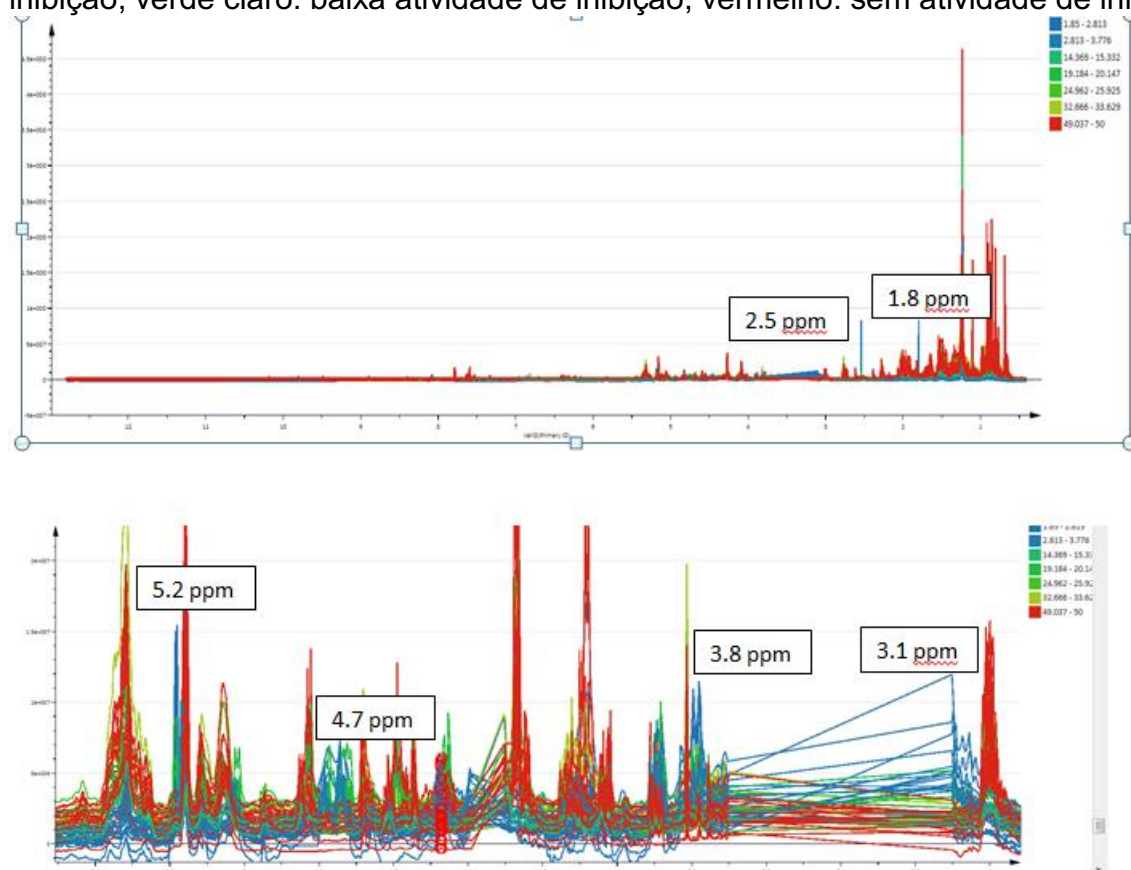


Figura 4.59 – Espectros de ^1H NMR de todos os diferentes extratos de folhas de uvaia. A coloração está de acordo com os valores de IC_{50} para a atividade de inibição da α -glicosidase. Azul: alta atividade de inibição, verde escuro: média alta atividade de inibição, verde claro: baixa atividade de inibição, vermelho: sem atividade de inibição.



A partir das Figura 4.56, Figura 4.57, Figura 4.58 e Figura 4.59 pode-se observar que vários picos (em cerca de 1,8, 2,5, 3,1, 3,8, 4,7 e 5,2 ppm) derivam de

compostos que podem ser responsáveis pela atividade de inibição da α -glicosidase ou α -amilase observada nas amostras extraídas de metanol e etanol.

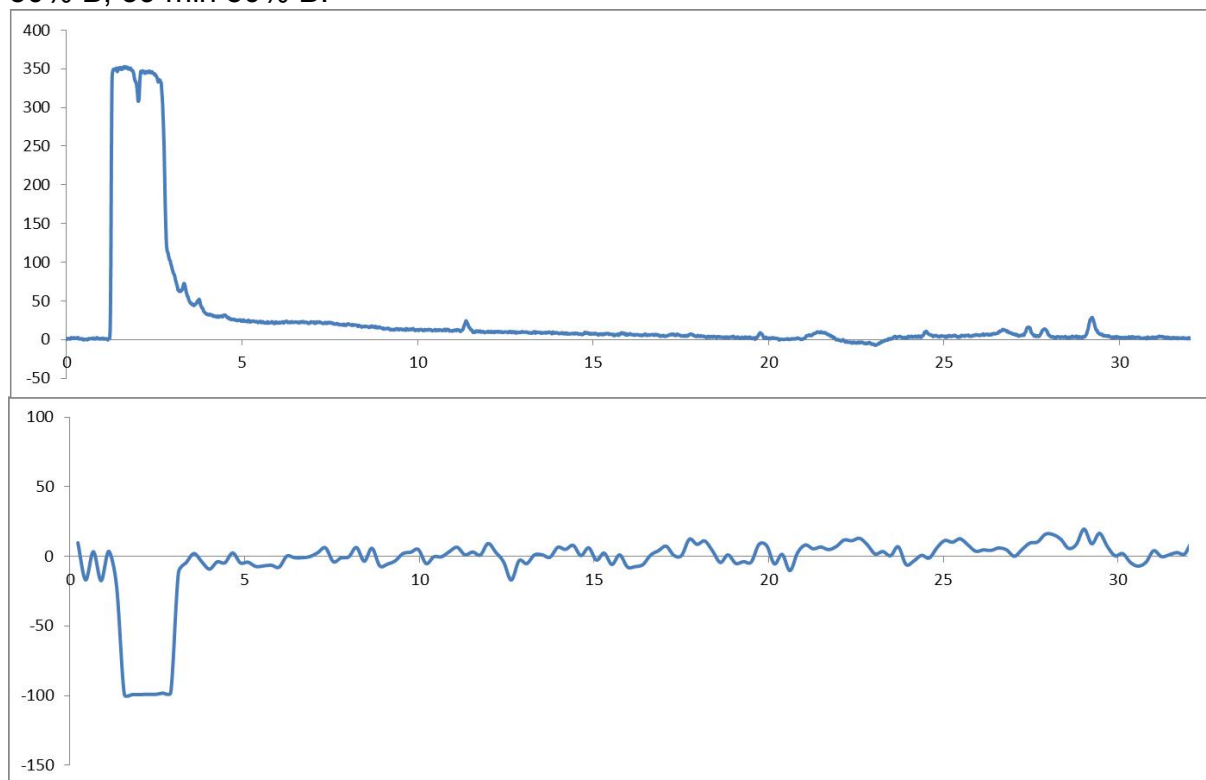
4.14.3 Perfil de inibição de alta resolução de α -glicosidase

Os PCAs dos cromatogramas de CLAE-EMAR e espectros de RMN de ^1H indicaram que as amostras extraídas com metanol geralmente tinham alta atividade de inibição para α -glicosidase e α -amilase. Da Tabela 4.24 e Tabela 4.25, a amostra (UAE_MET) extraída com metanol com a melhor atividade de inibição para α -glicosidase e a segunda melhor atividade de inibição α -amilase foi escolhida para análise posterior.

10 μL de solução de extrato bruto (10 mg/mL em Metanol) foram injetados e separados usando o seguinte perfil de gradiente de eluição: 0 min, 50% B, 20 min 100% B, 30 min 100% B, 32 min 50% B, 39 min 50% B. Os resultados obtidos (Figura 4.60) corroboram os resultados obtidos através da análise de PCA que indicou que compostos na região de 2,5/2,8 min podem ser responsáveis pela atividade de inibição dos extratos.

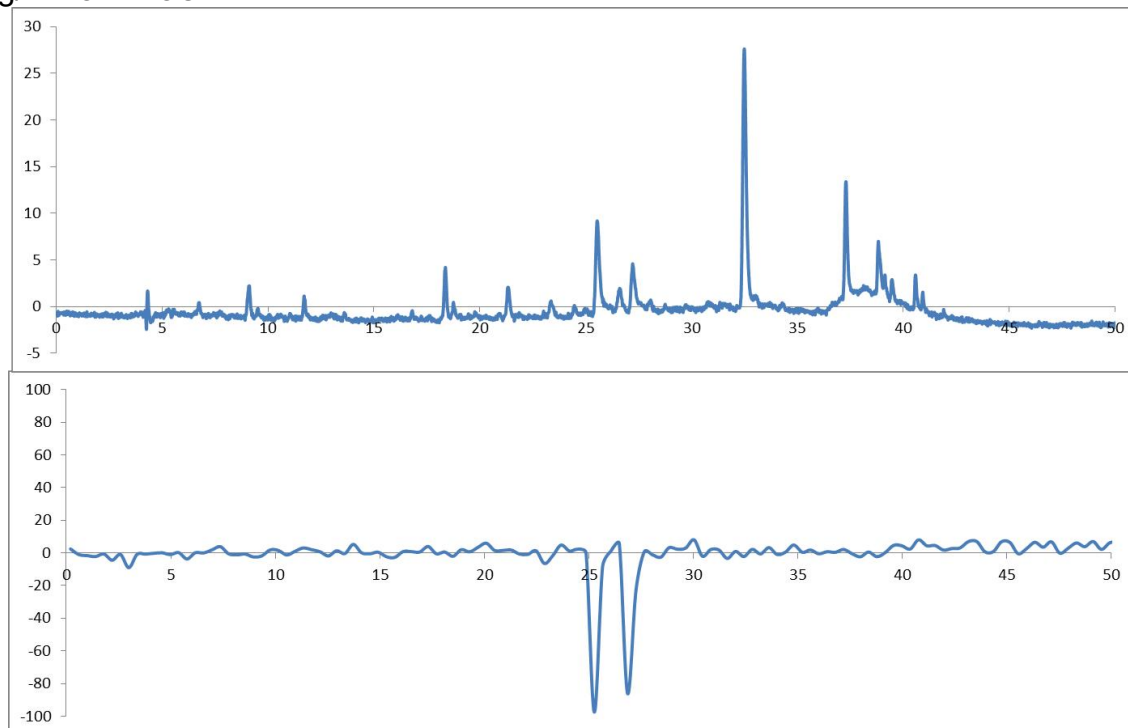
Figura 4.60 – Cromatograma de HPLC (parte superior) do extrato bruto UAE_MET e perfis de inibição de α -glicosidase de alta resolução correspondentes (parte inferior).

Perfil de gradiente de eluição: 0 min, 50% B, 20 min 100% B, 30 min 100% B, 32 min 50% B, 39 min 50% B.



A fim de melhorar a separação dos compostos e otimizar o perfil de inibição de α -glicosidase foram realizadas alterações na metodologia até que se estabeleceu a seguinte condição: 0 min, 0% B, 30 min 20% B, 50 min 100% B, 60 min 100% B, 61 min 0% B, 71 min 0% B foi injetado 2 μ L de solução de extrato com 10 mg / mL em MeOH).

Figura 4.61 – Cromatograma de HPLC (parte superior) do extrato bruto UAE_MET e perfis de inibição de α -glicosidase de alta resolução correspondentes (parte inferior). Perfil de gradiente de eluição: 0 min, 0% B, 30 min 20% B, 50 min 100% B, 60 min 100% B, 61 min 0% B, 71 min 0% B. Injetados 10 μ L de solução de extrato com 2 mg/mL em MeOH.



É possível observar na Figura 4.61 altos níveis de inibição no biocromatograma relacionados com os picos em 25,7 (97,5%) e 27,2 min (86,0%). Esses picos de inibição correspondem diretamente aos picos observados no cromatograma UV em 25,5 e 27,2 min. Portanto, esses picos foram investigados posteriormente com o objetivo de determinar quais compostos são responsáveis pela inibição da α -glicosidase.

4.14.4 Identificação dos metabólitos por CLAE-EMAR e RMN

Os picos cromatográficos 4 e 6 foram submetidos à análise de HPLC-HRMS-NMR, e a análise dos dados de HRMS e NMR obtidos no modo HPLC-HRMS-NMR permitiu a identificação de compostos conforme descrito abaixo. O pico 4 (459,0904 $[M + H]^+$ ($C_{22}H_{19}O_{11}^+$)) foi identificado como galato de epigallocatequina (EGCG) comparando ressonâncias de RMN de 1H com referência autêntica. O pico 6

(459,0906 [M + H]⁺) não foi identificado devido à quantidade isolada não ter sido suficiente para a realização de uma identificação baseada em RMN. É a primeira vez que galato de epigallocatequina é relatado em extratos de *Eugenia pyriformis*. Entretanto, o composto já é conhecido por sua atividade inibitória contra as enzimas α -amilase e α -glicosidase (GAO et al., 2013).

5 CONCLUSÕES

5.1 Conclusões gerais

Os resultados obtidos neste projeto mostraram-se promissores nas diferentes técnicas de extração utilizadas para a obtenção de extratos a partir de folhas de uvaia. Sendo que em todas as extrações avaliadas foi observada a presença dos compostos de interesse: α -amirina e β -amirina.

Ao observar os resultados de uma forma geral, o melhor rendimento global (20,30% m/m) foi obtido utilizando-se a técnica de extração com solvente pressurizado com metanol como solvente. Contudo, o rendimento global não é o resultado mais importante, pois o objetivo prioritário desta pesquisa é a obtenção de α -amirina e β -amirina, sendo que nessas condições, a concentração foi de somente 5,68% m/m. Para a obtenção desses compostos observou-se que os solventes apolares são os mais indicados por apresentarem os melhores resultados de concentração.

O melhor resultado de concentração foi encontrado no extrato obtido pela extração assistida por ultrassom com hexano como solvente. Utilizando-se essa técnica em combinação com o solvente mencionado foi obtido 81,56% m/m da mistura de α -amirina e β -amirina no extrato. Nessas condições, o rendimento global da extração foi 1,74% m/m e a rendimento dos compostos de interesse foi de 13,11 g kg⁻¹ de matéria-prima.

Considerando-se somente os resultados obtidos com hexano como solvente, o melhor resultado de rendimento de α -amirina e β -amirina foi obtido na extração com líquido pressurizado utilizando hexano como solvente. O resultado obtido foi 15,74 g kg⁻¹ de matéria-prima, sendo que nessa mesma condição a concentração de α -/ β -amirina foi 74,64% m/m com rendimento global de extração de 2,11% m/m. O melhor rendimento global da extração assistida por ultrassom foi 1,74% m/m, obtido na condição de 200 W/L, 60 °C e razão amostra/solvente 1:25 g:mL e partículas de 0,362 mm. A maior concentração de α -/ β -amirinas (81,56% m/m) foi obtida nas mesmas condições experimentais, resultando numa rendimento de 13,11 g kg⁻¹ de matéria-prima. Na extração por maceração o melhor rendimento global

(1,70% m/m) foi obtido com 60 °C, 100 RPM e 20 minutos de extração. Nessa mesma condição a concentração obtida foi 72,44% m/m com rendimento de 12,34 g kg⁻¹ MP. Já na extração por soxhlet o rendimento global foi de 2,84% m/m, concentração de 47,63% m/m e rendimento de 13,55 g kg⁻¹ MP. A adição de cossolvente na extração com CO₂ supercrítico aumentou consideravelmente o rendimento global das extrações, chegando em 3,95% ao utilizar-se 15% m/m de etanol. Nesta mesma condição, a rendimento de amirina foi a maior da técnica de extração com fluido supercrítico (16,12 g kg⁻¹ MP), entretanto, a concentração foi a menor obtida (40,90% m/m).

Somente extratos obtidos com solventes polares (metanol e etanol) apresentaram resultados positivos nas análises teor de compostos fenólicos e de capacidade antioxidante. O maior teor de compostos fenólicos totais (115 ± 5 mg EAG/g extrato) foi encontrado no extrato obtido por maceração utilizando metanol como solvente de extração. Já o maior valor de capacidade antioxidante (353 ± 2 µmol ET/g extrato) foi obtido a partir da extração com líquido pressurizado utilizando etanol como solvente.

Os modelos matemáticos utilizados na extração com fluido supercrítico (2ª ordem, equilíbrio, BIC e os modelos baseados nas equações de equilíbrio de Langmuir e de Freundlich) representaram apropriadamente os dados experimentais, sendo que o modelo desenvolvido a partir das equações de equilíbrio de adsorção de Freundlich foi o que, estatisticamente, melhor descreveu as cinéticas de extração.

Foi possível verificar que a escala utilizada na extração com fluido supercrítico não alterou significativamente o comportamento das curvas cinéticas, nem o rendimento global ao final da extração. A adição de cossolventes resultou em menores custos de produção estimados pela análise econômica da extração com fluido supercrítico, sendo que a adição de 5% m/m de etanol apresentou os melhores resultados entre as condições avaliadas.

Os processos estudados para a purificação das amirinas demonstraram-se eficazes, resultando em elevados teores dos compostos de interesse nas frações purificadas. O método desenvolvido neste projeto conseguiu atingir um valor superior de pureza ao comparado com o método clássico de separação por cromatografia em coluna aberta, o que destaca este novo procedimento como favorável na purificação de α-/β-amirinas.

As análises térmicas realizadas (DSC e TG/DTG), bem como as análises de FTIR e DRX, demonstraram resultados específicos que puderam ser relacionados com a alta quantidade dos compostos α -/ β -amirina presentes nos extratos. A partir das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar características morfoanatômicas das partículas de folhas de uvaia, bem como identificar possíveis mecanismos envolvidos nos processos de extração.

Nos estudos de bioatividade, os extratos de *Eugenia pyriformis* demonstraram principalmente atividade inibitória da enzima α -glicosidase, sendo mais promissores os extratos obtidos com etanol e metanol. O mapeamento realizado no extrato metanólico obtido por extração assistida por ultrassom da inibição de α -glicosidase pelo ensaio de inibição de alta resolução e HPLC-HRMS -NMR, aponta para um composto identificado como galato de epigallocatequina. Esta informação pode ser usada para estabelecer a *Eugenia pyriformis* como uma fonte valiosa para um futuro alimento funcional e/ou como uma fonte para novos medicamentos usados no tratamento do diabetes tipo 2.

Os resultados apresentados nesse trabalho possibilitam um melhor entendimento dos processos de extração de α -/ β -amirina a partir de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis*) e seletividade dos mesmos. Resultados de grande importância no desenvolvimento de aplicações nos mais diferentes ramos industriais (cosméticos, medicamentos, etc).

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Para continuidade deste estudo desenvolvido, tem-se as seguintes sugestões:

- Identificar demais compostos presentes nos extratos obtidos com os diferentes solventes e técnicas de extração utilizando métodos analíticos específicos, tais como espectrometria de massas e similares;
- Desenvolver modelos matemáticos aplicáveis para as demais técnicas de extração;
- Otimizar o processo de purificação de amirinas desenvolvido neste projeto a fim de avaliar possíveis efeitos das etapas e procedimentos utilizados;

- Realizar estudos de possíveis aplicações do material obtido a partir do processo de purificação das amirinas;
- Aprimorar isolamento dos compostos responsáveis pela atividade inibitória das enzimas relacionadas com o tratamento da diabetes tipo 2, a fim de identificar o compostos que não foi identificado neste trabalho;
- Estudo do possível aproveitamento da biomassa residual das extrações.

6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

6.1 Patente depositada

KLEIN, Elissandro J.; VIEIRA, Melissa G. A.; SILVA, Edson A. Processo de extração a partir de folhas de uvaia, composição obtida pelo processo e uso da mesma. 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180063774. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 28/03/2018

6.2 Publicações em periódicos

KLEIN, Elissandro. J.; SANTSO, Kátia A.; PALÚ, Fernando; VIEIRA, Melissa G. A.; SILVA, Edson A. Use of supercritical CO₂ and ultrasound-assisted extractions to obtain α/β -amyrin-rich extracts from uvaia leaves (*Eugenia pyriformis* Cambess.). The Journal of Supercritical Fluids, v. 137, p. 1–8, 23 jul. 2018.

DOI: 10.1016/j.supflu.2018.02.019. ISSN: 08968446.

KLEIN, Elissandro J.; NÁTHIA-NEVES, Grazielle; VARDANEGA, Renata; MEIRELES, Maria Angela; SILVA, Edson A.; VIEIRA, Melissa G. A.; Supercritical CO₂ extraction of α/β -amyrin from *Eugenia pyriformis* Cambess: effect of pressure and co-solvents addition. The Journal of Supercritical Fluids. V. 153, November 2019, 104595.

DOI: 10.1016/j.supflu.2019.104595. ISSN: 08968446.

KLEIN, Elissandro J.; JOHANN, Gracielle; SILVA, Edson A.; VIEIRA, Melissa G. A.; Mathematical modeling of supercritical CO₂ extraction of *Eugenia pyriformis* Cambess. leaves. Chemical Engineering Communications. 2020.

DOI: 10.1080/00986445.2020.1798936. ISSN: 08968446.

6.3 Publicações em eventos científicos

KLEIN, Elissandro J.; SANTOS, Kátia A.; NAROK, Franciele; SILVA, Edson A.; VIEIRA, Melissa G. A. Supercritical Fluid Extraction of *Eugenia pyriformis* leaves. 12th International Symposium on Supercritical Fluids, 2018, Antibes-Juan-les-Pins (França). Proceedings of 12th International Symposium on Supercritical Fluids. Valece - France: International Society for Advancement of Supercritical Fluids, 2018.

ISBN 978-2-9564117-1-0.

KLEIN, E. J.; VARDANEGA, R.; NATHIA-NEVES, G.; MEIRELES, M. A. A.; SILVA, E. A.; VIEIRA, M. G. A. Supercritical CO₂ extraction of α -/ β -amyrin from uvaia leaves: effects of scCO₂ flow rate and particle size. In: V Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (Prosciba), 2019, Campinas. Book of Abstracts - V Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (Prosciba), 2019.

6.4 Publicações em elaboração

KLEIN, Elissandro J.; CARVALHO, Pedro Ivo Nunes; NÁTHIA-NEVES, Grazielle; VARDANEGA, Renata; MEIRELES, Maria Angela; SILVA, Edson A.; VIEIRA, Melissa G. A.; Uvaia (*Eugenia pyriformis*) extraction optimization using supercritical fluid technology: techno-economical evaluation.

KLEIN, Elissandro J.; STRAAD, Ida K.; SILVA, Edson A.; STAERK, Dan; VIEIRA, Melissa G. A.; Bioactivity-profiling of crude extracts of *Eugenia pyriformis* using ¹H NMR metabolomics and high-resolution α -glucosidase profiling combined with HPLC-PDA- HRMS-SPE-NMR.

7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, Neveen; AL-ENAZI, Nouf Mohammad; AL-HOMAIDAN, Ali a.; IBRAHEEM, Ibraheem Borie Mohammad; AL-OTHMAN, Monerah Rashed; HATAMLEH, Ashraf Atef. Antibacterial b-amyrin isolated from Laurencia microcladia. **Arabian Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 32–37, 2013. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.09.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.033>.
- ALMEIDA, Priscilla P.; MEZZOMO, Natália; FERREIRA, Sandra R. S. Extraction of *Mentha spicata* L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition. **Food and Bioprocess Technology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 548–559, 2012. DOI: 10.1007/s11947-010-0356-y. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-010-0356-y>. Acesso em: 19 mar. 2019.
- APEL, Miriam A.; SOBRAL, Marcos; SCHAPOVAL, Elfrides E. S.; HENRIQUES, Amélia T.; MENUT, Chantal; BESSIÈRE, Jean-Marie. Chemical Composition of the Essential Oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: Section *Dichotomae*. **Journal of Essential Oil Research**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 191–192, 2004. DOI: 10.1080/10412905.2004.9698694. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2004.9698694#.VenOYdJVik> p. Acesso em: 4 set. 2015.
- ARAGÃO, Gislei F.; CARNEIRO, Lyvia M. V.; JUNIOR, Antônio P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, Paulo N.; LEMOS, Telma L. G.; VIANA, Glaucé S. De B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 85, n. 4, p. 827–834, 2006. DOI: 10.1016/j.pbb.2006.11.019.
- ARMSTRONG, Lorene; DO RÓCIO DUARTE, Márcia; MIGUEL, Obdulio Gomes. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *eugenia pyriformis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 475–481, 2012. DOI: 10.1590/S0102-695X2012005000022.
- AZMIR, Jannatul et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- BARBOSA, Hugo M. A.; DE MELO, Marcelo M. R.; COIMBRA, Manuel A.; PASSOS, Cláudia P.; SILVA, Carlos M. Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 85, p. 165–172, 2014. DOI: 10.1016/j.supflu.2013.11.011.
- BARROS, Francisco W. a et al. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 1268–1276, 2011. DOI: 10.1016/j.bmc.2010.12.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.12.016>.
- BARTON, Paul; HUGHES, Robert E.; HUSSEIN, Mamoun M. Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 157–162, 1992. DOI: 10.1016/0896-8446(92)90002-2. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0896844692900022>. Acesso em: 13 jan. 2016.

BARZOTTO, Ionete Lúcia Milani; SANTOS, Kátia Andressa; DA SILVA, Edson Antônio; SENE, Ana C.; DA SILVA, Newton S.; VIEIRA, Lúcia. Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and α -tocopherol content. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 143, p. 55–63, 2019. DOI: 10.1016/J.SUPFLU.2018.08.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844618303887#tbl0025>. Acesso em: 18 mar. 2019.

BENDICHO, C.; LAVILLA, I. EXTRACTION | Ultrasound Extractions. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.04571-6.

BRUNI, Silvia; GUGLIELMI, Vittoria. Identification of archaeological triterpenic resins by the non-separative techniques FTIR and ^{13}C NMR: The case of *Pistacia* resin (mastic) in comparison with frankincense. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 121, p. 613–622, 2014. DOI: 10.1016/J.SAA.2013.10.098.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1089, n. 1, p. 1–17, 2005. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.06.072.

CARRILHO, Emanuel; TAVARES, Maria Cecília H.; LANÇAS, Fernando M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química Nova**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 509–515, 2001. DOI: 10.1590/S0100-40422001000400012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000400012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 4 set. 2015.

CARVALHO, Pedro I. N.; OSORIO-TOBÓN, J. Felipe; ROSTAGNO, Mauricio A.; PETENATE, Ademir J.; MEIRELES, M. Angela A. Techno-economic evaluation of the extraction of turmeric (*Curcuma longa* L.) oil and ar-turmerone using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 105, p. 44–54, 2015. DOI: 10.1016/j.supflu.2015.03.020.

CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A. Comprehensive Sampling and Sample Preparation. In: **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**. [s.l.] : Elsevier, 2012. p. 117–133. DOI: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00039-9. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123813732000399>. Acesso em: 10 jan. 2016.

CHÁFER, A.; BERNA, A. Study of kinetics of the d-pinitol extraction from carob pods using supercritical CO_2 . **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 94, p. 212–215, 2014. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.07.015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844614001946>. Acesso em: 11 jan. 2016.

CHEMAT, Farid; ROMBAUT, Natacha; SICAIÉ, Anne-Gaëlle; MEULLEMIESTRE, Alice; FABIANO-TIXIER, Anne-Sylvie; ABERT-VIAN, Maryline. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 34, p. 540–560, 2017. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.

CHEMAT, Farid; ZILL-E-HUMA; KHAN, Muhammed Kamran. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics**

Sonochemistry, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>.

CHING, Jianhong; CHUA, Tung Kian; CHIN, Lee Cheng; LAU, Aik Jiang; PANG, Yun Keng; JAYA, Johannes Murti; TAN, Chay Hoon; KOH, Hwee Ling. β -amyrin from *Ardisia elliptica* Thunb. Is more potent than aspirin in inhibiting collagen-induced platelet aggregation. **Indian Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 275–279, 2010.

COELHO, J. A. P.; PEREIRA, A. P.; MENDES, R. L.; PALAVRA, A. M. F. Supercritical carbon dioxide extraction of *Foeniculum vulgare* volatile oil. **Flavour and Fragrance Journal**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 316–319, 2003. DOI: 10.1002/ffj.1223. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1223>. Acesso em: 29 maio. 2019.

COSSUTA, D.; SIMÁNDI, B.; VÁGI, E.; HOHMANN, J.; PRECHL, A.; LEMBERKOVICS, É.; KÉRY, Á.; KEVE, T. Supercritical fluid extraction of *Vitex agnus castus* fruit. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 47, p. 188–194, 2008. DOI: 10.1016/j.supflu.2008.07.014.

COSTA, Paulo; SOUSA LOBO, José Manuel. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00095-1. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098701000951>. Acesso em: 6 jan. 2015.

DA SILVA JÚNIOR, Walter Ferreira et al. Thermal behavior and thermal degradation kinetic parameters of triterpene α , β amyrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 127, n. 2, p. 1757–1766, 2017. a. DOI: 10.1007/s10973-016-6046-x.

DA SILVA JÚNIOR, Walter; PINHEIRO, Jonas; DE MENEZES, Danielle; E SILVA, Natan; DE ALMEIDA, Patrícia; LIMA, Emerson; DA VEIGA JÚNIOR, Valdir; DE AZEVEDO, Eduardo; DE LIMA, Ádley. Development, Physicochemical Characterization and In Vitro Anti-Inflammatory Activity of Solid Dispersions of α , β Amyrin Isolated from Protium Oilresin. **Molecules**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 1512, 2017. b. DOI: 10.3390/molecules22091512. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/9/1512>. Acesso em: 3 jul. 2018.

DA SILVA, Rui P. F. F.; ROCHA-SANTOS, Teresa A. P.; DUARTE, Armando C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 76, p. 40–51, 2016. DOI: 10.1016/j.trac.2015.11.013.

DANLAMI, Jibrin Mohammed; ARSAD, Agus; AHMAD ZAINI, Muhammad Abbas; SULAIMAN, Hanizam. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 605–626, 2014. DOI: 10.1515/revce-2013-0038. Disponível em: <http://www.degruyter.com/view/j/revce.2014.30.issue-6/revce-2013-0038/revce-2013-0038.xml>.

DE AGUIAR, Ana Carolina; OSORIO-TOBÓN, J. Felipe; VIGANÓ, Julianne; MARTÍNEZ, Julian. Economic evaluation of supercritical fluid and pressurized liquid extraction to obtain phytonutrients from biquinho pepper: Analysis of single and sequential-stage processes. **Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 165, p. 104935, 2020. DOI: 10.1016/j.supflu.2020.104935.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 92, p. 115–176, 2014. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.04.007. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844614000928> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844614000928>.

DE SOUZA, Alexandre Teixeira; BENAZZI, Toni Luis; GRINGS, Marcelo Boer; CABRAL, Vladimir; ANTÔNIO DA SILVA, Edson; CARDOZO-FILHO, Lúcio; CEVA ANTUNES, Octavio Augusto. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 182–187, 2008. DOI:

10.1016/J.SUPFLU.2008.08.001. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844608002416>. Acesso em: 28 mar. 2019.

DIAS, Marluce Oliveira; HAMERSKI, Lidilhone; PINTO, Angelo C. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência.

Química Nova, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 704–706 (In Portuguese), 2011. DOI: 10.1590/S0100-40422011000400026.

DÍAZ-RUIZ, Gloria; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, Liliana; LUNA, Héctor; DEL CARMEN WACHER-RODARTE, María; NAVARRO-OCAÑA, Arturo. Growth inhibition of streptococcus from the oral cavity by α -Amyrin esters. **Molecules**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 12603–12611, 2012. DOI: 10.3390/molecules171112603.

DO NASCIMENTO, Luís Adriano S.; GUILHON, Giselle M. S. P.; ARRUDA, Mara S. P.; SANTOS, Lourivaldo S.; ARRUDA, Alberto C.; MÜLLER, Adolfo H.; DA SILVA, Milton N.; RODRIGUES, Silvane T.; DE CARVALHO, Mário G. Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC.) Engl., Ochnaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 823–827, 2009. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000600004.

ENUJIUGHA, Victor N.; TALABI, Justina Y.; MALOMO, Sunday A.; OLAGUNJU, Aderonke I. DPPH Radical Scavenging Capacity of Phenolic Extracts from African Yam Bean (*Sphenostylis stenocarpa*). **Food and Nutrition Sciences**, [S. l.], v. 3, p. 7–13, 2012. DOI: 10.4236/fns.2012.31002. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.31002>. Acesso em: 12 mar. 2019.

ERDOGAN, Selim; ATES, Burhan; DURMAZ, Gokhan; YILMAZ, Ismet; SECKIN, Turgay. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 49, n. 7, p. 1592–1597, 2011. DOI: 10.1016/j.fct.2011.04.006.

FARIAS-CAMPOMANES, Angela; MEIRELES, Maria Angela A. Pisco Bagasse as a Potential Source of Bioactive Compounds – A Review. **Recent Patents on Engineering**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 41–50, 2013. DOI:

10.2174/1872212111307010004. Disponível em:

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84876744472&partnerID=tZOtx3y1>.

FELFÖLDI-GÁVA, Anikó; SZARKA, Szabolcs; SIMÁNDI, Béla; BLAZICS, Balázs; SIMON, Blanka; KÉRY, Ágnes. Supercritical fluid extraction of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 61, p. 55–61, 2012. DOI: 10.1016/J.SUPFLU.2011.10.003. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844611004268#sec0105>. Acesso em: 19 mar. 2019.

FERREIRA, Rosilene; SILVA JÚNIOR, Walter; VEIGA JUNIOR, Valdir; LIMA, Ádley; LIMA, Emerson. Physicochemical Characterization and Biological Activities of the Triterpenic Mixture α,β -Amyrenone. **Molecules**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 298, 2017. DOI: 10.3390/molecules22020298.

FIORI, Luca; BASSO, Daniele; COSTA, Paolo. Supercritical extraction kinetics of seed oil: A new model bridging the 'broken and intact cells' and the 'shrinking-core' models. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 131–138, 2009. DOI: 10.1016/j.supflu.2008.09.019.

FREUND, Rudolf J.; LITTELL, Ramon C. SAS System for Regression SAS Series . In: **Statistical Applications**. [s.l.] : SAS Institute, 1995.

GARMUS, Tábata T.; PAVIANI, Losiane C.; QUEIROGA, Carmen L.; MAGALHÃES, Pedro M.; CABRAL, Fernando A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 86, p. 4–14, 2014. DOI: 10.1016/J.SUPFLU.2013.11.014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844613003884>. Acesso em: 18 mar. 2019.

GIANNUZZO, Amelia N.; BOGGETTI, Hector J.; NAZARENO, Monica A.; MISHIMA, Horacio T. Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*. **Phytochemical Analysis**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 221–223, 2003. DOI: 10.1002/pca.706. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.706>. Acesso em: 18 mar. 2019.

GIRON, D.; GOLDBRONN, C. Place of DSC purity analysis in pharmaceutical development. **Journal of Thermal Analysis**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 217–251, 1995. DOI: 10.1007/BF02547150.

GONÇALVES, Renata Menoci; LEMOS, Caroline Ortega Terra; LEAL, Ivana Correa Ramos; NAKAMURA, Celso Vataru; CORTEZ, Diógenes Aparício Garcia; DA SILVA, Edson Antonio; CABRAL, Vladimir Ferreira; CARDOZO-FILHO, Lúcio. Comparing conventional and supercritical extraction of (-)-mammea A/BB and the antioxidant activity of *calophyllum brasiliense* extracts. **Molecules**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 6215–6229, 2013. DOI: 10.3390/molecules18066215.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; COMAS-SERRA, F.; FEMENIA, A.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics sonochemistry**, [S. l.], v. 22, p. 506–14, 2015. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.05.027. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417714001886>. Acesso em: 4 mar. 2016.

GONZÁLEZ-CENTENO, María Reyes; KNOERZER, Kai; SABAREZ, Henry; SIMAL, Susana; ROSSELLÓ, Carmen; FEMENIA, Antoni. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - A response surface approach. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 2176–2184, 2014. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.01.021.

GOTO, Motonobu; ROY, Bhupesh C.; HIROSE, Tsutomu. Shrinking-core leaching

model for supercritical-fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 128–133, 1996. DOI: 10.1016/S0896-8446(96)90009-1.

GREEN, Don W.; PERRY, Robert H. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. 8th. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2008.

GROSSO, C.; COELHO, J. P.; PESSOA, F. L. P.; FARELEIRA, J. M. N. A.; BARROSO, J. G.; URIETA, J. S.; PALAVRA, A. F.; SOVOVÁ, H. Mathematical modelling of supercritical CO₂ extraction of volatile oils from aromatic plants.

Chemical Engineering Science, [S. l.], v. 65, n. 11, p. 3579–3590, 2010. DOI: 10.1016/J.CES.2010.02.046. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250910001429>. Acesso em: 4 jun. 2018.

HALDAR, Saikat; KALE, Balaji S.; JADHAV, Dipesh D.; THULASIRAM, Hirekodathakallu V. Lipase mediated separation of triterpene structural isomers, α - and β -amyrin. **Tetrahedron Letters**, [S. l.], v. 55, n. 19, p. 3122–3125, 2014. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.04.015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403914006121>. Acesso em: 4 set. 2015.

HAMINIUK, Charles Windson Isidoro; PLATA-OVIEDO, Manuel Salvador Vicente; DE MATTOS, Gisely; CARPES, Solange Teresinha; BRANCO, Ivanise Guilherme. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 51, n. October, p. 1–5, 2012. DOI: 10.1007/s13197-012-0759-z.

HAMINIUK, Charles Windson Isidoro; PLATA-OVIEDO, Manuel Salvador Vicente; GUEDES, Amanda Roman; STAFUSSA, Ana Paula; BONA, Evandro; CARPES, Solange Teresinha. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 46, n. 7, p. 1529–1537, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02653.x.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C. C.; MONTALBETTI-MORENO, Y.; RABANAL, R. M. Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 93, n. 2–3, p. 279–284, 2004. DOI: 10.1016/j.jep.2004.03.044.

HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, Liliana; MANGAS, Susana; PALAZÓN, Javier; NAVARRO-OCAÑA, Arturo. Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 476–480, 2010. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.01.009.

HERRERO, Miguel; CIFUENTES, Alejandro; IBÁÑEZ, Elena. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.058.

HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M. S.; GUEDES, M. A.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antinociceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 630–634, 2008. DOI: 10.1016/j.phymed.2007.11.016.

HUANG, Zhen; SHI, Xiao-han; JIANG, Wei-juan. Theoretical models for supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1250, p. 2–26, 2012. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.04.032.

ISHII, Masakazu; NAKAHARA, Tatsuo; IKEUCHI, Shingo; NISHIMURA, Masahiro. **β -Amyrin induces angiogenesis in vascular endothelial cells through the Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling pathway** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2015. DOI:

10.1016/j.bbrc.2015.10.085. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.085>.

ISPE. **GAMP 5 Guide: Compliant GxP Computerized Systems | ISPE | International Society for Pharmaceutical Engineering**. [s.l.] : ISPE, 2008.

Disponível em: <https://ispe.org/publications/guidance-documents/gamp-5>. Acesso em: 14 set. 2020.

JEON, Se Jin et al. Positive effects of β -amyrin on pentobarbital-induced sleep in mice via GABAergic neurotransmitter system. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 291, p. 232–236, 2015. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.05.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.005>.

JOHANN, S.; SOLDI, C.; LYON, J. P.; PIZZOLATTI, M. G.; RESENDE, M. A. Antifungal activity of the amylin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. **Letters in applied microbiology**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 148–53, 2007. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02162.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651210>. Acesso em: 9 set. 2015.

KANNAN, S.; VIJAYAKUMAR, B.; SURESHKUMAR, C.; MOHANKUMAR, R.; NARASIMHAN, S. Insect antifeedant and growth regulating activities of β -amyrin from *Sarcostemma acidum*. **Asian Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 1167–1168, 2013. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84875135985&partnerID=tZOtx3y1>.

KESZEI, Andras; BRUBAKER, Curt L.; FOLEY, William J. A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. **Australian Journal of Botany**, [S. l.], v. 56, n. 3, p. 197–213, 2008. DOI: 10.1071/BT07146.

KIM, Jong Sang; KWON, Chong Suk; SON, Kun Ho. Inhibition of α -glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [S. l.], v. 64, n. 11, p. 2458–2461, 2000. DOI: 10.1271/bbb.64.2458.

KLEIN, Elissandro Jair. **OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE UVAIA (*Eugenia pyriformis* Cambess.) UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO E EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ASSISTIDA POR ULTRASSOM**. 2016. Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo - PR, 2016.

KLEIN, Elissandro Jair; NÁTHIA-NEVES, Grazielle; VARDANEGA, Renata; MEIRELES, M. Angela A.; ANTÔNIO DA SILVA, Edson; VIEIRA, Melissa Gurgel Adeodato. Supercritical CO₂ extraction of α / β -amyrin from uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.): Effects of pressure and co-solvent addition. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], p. 104595, 2019. DOI: 10.1016/J.SUPFLU.2019.104595. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844619302906>. Acesso em: 23 ago. 2019.

KLEIN, Elissandro Jair; SANTOS, Kátia Andressa; PALÚ, Fernando; VIEIRA, Melissa Gurgel Adeodato; DA SILVA, Edson Antônio. Use of supercritical CO₂ and ultrasound-assisted extractions to obtain α / β -amyrin-rich extracts from uvaia leaves (*Eugenia pyriformis* Cambess.). **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 137, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1016/j.supflu.2018.02.019.

- KNEZ, Ž.; MARKOČIČ, E.; LEITGEB, M.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ HRNČIČ, M.; ŠKERGET, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, [S. l.], v. 77, p. 235–243, 2013. DOI: 10.1016/j.energy.2014.07.044.
- KUMAR TRIVEDI, Mahendra et al. Influence of the Biofield Energy Healing Treatment on Physicochemical, Thermal and Behavioral Properties of Ashwagandha (*Withania somnifera*) Root Extract. **American Journal of BioScience**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 25–34, 2017. DOI: 10.11648/j.ajbio.20170502.12.
- KUPSKI, Sérgio Carlos; KLEIN, Elissandro Jair; DA SILVA, Edson Antônio; PALÚ, Fernando; GUIARDELLO, Reginaldo; VIEIRA, Melissa Gurgel Adeodato. Mathematical modeling of supercritical CO₂ extraction of hops (*Humulus lupulus* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 130, p. 347–356, 2017. DOI: 10.1016/j.supflu.2017.06.011.
- LE MOS, Caroline Ortega Terra; GARCIA, Vitor Augusto dos Santos; GONÇALVES, Renata Menoci; LEAL, Ivana Correa Ramos; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias; FILHO, Lúcio Cardozo; CABRAL, Vladimir Ferreira. Supercritical extraction of neolignans from *Piper regnelli* var. *pallidum*. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 71, p. 64–70, 2012. DOI: 10.1016/J.SUPFLU.2012.07.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844612002422>. Acesso em: 4 jun. 2018.
- LISBÔA, Gustavo N.; KINUPP, Valdely F.; BARROS, Ingrid B. I. De. *Eugenia pyriformis* - Uvaia. In: CORADIN, Lidio; SIMINSKI, Alexandre; REIS, Ademir (org.). **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente - MMA, 2011. p. 167–169.
- LIST, P. H.; SCHIMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. 1. ed. Florida: CRC Press, 1990. Disponível em: <https://books.google.mw/books?id=2CNY46snR6oC&printsec=copyright#v=onepage&q=washing&f=false>. Acesso em: 15 dez. 2020.
- LUO, Hui; CAI, Yongqiang; PENG, Zhijun; LIU, Tao; YANG, Shengjie. Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. **Chemistry Central journal**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1, 2014. DOI: 10.1186/1752-153X-8-1. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3880984&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- LUZIA, Dmm; BERTANHA, Bj; JORGE, N. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. **Revista do Instituto ...**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 175–180, 2010. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v69n2/v69n2a05.pdf>.
- MATOS, Israel; BENTO, Allisson Freire; MARCON, Rodrigo; CLAUDINO, Rafaela Franco; CALIXTO, João B. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α,β -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 54, n. 3–4, p. 482–492, 2013. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.01.018.
- MATTOS, J. R. Myrtaceae do Rio Grande do Sul. **Roesslária**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 163–167, 1984.
- MAZZUTTI, Simone; FERREIRA, Sandra R. S.; RIEHL, Carlos a. S.; SMANIA, Artur;

SMANIA, Fabio a.; MARTÍNEZ, Julian. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 70, p. 48–56, 2012. DOI: 10.1016/j.supflu.2012.06.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.06.010>.

MEIRELES, Maria A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: MARTINEZ, Jose L. (org.). **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**. [s.l.] : CRC Press, 2008. p. 259–290. DOI: 10.1201/9781420006513-14. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/>. Acesso em: 14 set. 2020.

MILIĆ, Petar S.; RAJKOVIĆ, Katarina M.; STAMENKOVIĆ, Olivera S.; VELJKOVIĆ, Vlada B. Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). **Ultrasonics sonochemistry**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 525–34, 2013. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417712001563>. Acesso em: 2 mar. 2016.

MUSTAFA, Arwa; TURNER, Charlotta. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011. DOI: 10.1016/j.aca.2011.07.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>.

NAIK, S. N.; LENTZ, H.; MAHESHWARI, R. C. Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid–vapor equilibrium conditions. **Fluid Phase Equilibria**, [S. l.], v. 49, p. 115–126, 1989. DOI: 10.1016/0378-3812(89)80009-3. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378381289800093>. Acesso em: 13 jan. 2016.

NARENDER, T.; KHALIQ, T.; SINGH, A. B.; JOSHI, M. D.; MISHRA, P.; CHATURVEDI, J. P.; SRIVASTAVA, A. K.; MAURYA, R.; AGARWAL, S. C. Synthesis of α -amyrin derivatives and their in vivo antihyperglycemic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 1215–1222, 2009. DOI: 10.1016/j.ejmech.2008.09.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.09.011>.

NÁTHIA-NEVES, Grazielle; VARDANEGA, Renata; HATAMI, Tahmasb; MEIRELES, M. Angela A. Process integration for recovering high added-value products from *Genipa americana* L.: Process optimization and economic evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 164, p. 104897, 2020. DOI: 10.1016/j.supflu.2020.104897.

NAWAZ, Haq; SHAD, Muhammad Aslam; REHMAN, Najiha; ANDALEEB, Hina; ULLAH, Najeeb. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 56, p. 17129, 2020. DOI: 10.1590/s2175-97902019000417129. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902019000417129>. Acesso em: 15 set. 2020.

OKUTAN, Leyla; KONGSTAD, Kenneth T.; JÄGER, Anna K.; STAERK, Dan. High-Resolution α -Amylase Assay Combined with High-Performance Liquid Chromatography–Solid-Phase Extraction–Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Expedited Identification of α -Amylase Inhibitors: Proof of Concept

- and α -Amylase Inhibitor in Cinnamon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 62, n. 47, p. 11465–11471, 2014. DOI: 10.1021/jf5047283. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf5047283>. Acesso em: 5 abr. 2019.
- OLIVEIRA, Andreia P.; SILVA, Luís R.; ANDRADE, Paula B.; VALENTAO, Patrícia; SILVA, Branca M.; GONC-ALVES, Rui F.; PEREIRA, José a.; DE PINHO, Paula Guedes. Further insight into the latex metabolite profile of *ficus carica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 20, p. 10855–10863, 2010. DOI: 10.1021/jf1031185.
- OLIVEIRA, Francisco a.; LIMA-JUNIOR, Roberto C. P.; CORDEIRO, Wilcare M.; VIEIRA-JÚNIOR, Gerardo M.; CHAVES, Mariana H.; ALMEIDA, Fernanda R. C.; SILVA, Regilane M.; SANTOS, Flavia a.; RAO, Vietla S. N. Pentacyclic triterpenoids, α,β -amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 78, n. 4, p. 719–725, 2004. a. DOI: 10.1016/j.pbb.2004.05.013.
- OLIVEIRA, Francisco A.; VIEIRA-JÚNIOR, Gerardo M.; CHAVES, Mariana H.; ALMEIDA, Fernanda R. C.; SANTOS, Kelcyana A.; MARTINS, Fabrício S.; SILVA, Regilane M.; SANTOS, Flavia A.; RAO, Vietla S. N. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta medica**, [S. l.], v. 70, n. 8, p. 780–782, 2004. b. DOI: 10.1055/s-2004-827212.
- ORPHANIDES, Antia; GOULAS, Vlasios; GEKAS, Vassilis. Introducing the concept of sono-chemical potential: A phenomenological model for ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 120, p. 191–196, 2014. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.07.031. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026087741300397X>. Acesso em: 3 jan. 2016.
- OSORIO-TOBÓN, J. Felipe; MEIRELES, M. Angela A.; OSORIO-TOBÓN, J. Felipe; MEIRELES, M. Angela A. Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. **Food and Public Health**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 289–303, 2013. DOI: 10.5923/j.fph.20130306.05.
- PADOVAN, Amanda; KESZEL, András; KÜLHEIM, Carsten; FOLEY, William J. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, [S. l.], p. 695–716, 2013. DOI: 10.1007/s11101-013-9331-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11101-013-9331-3>.
- PAPAMICHAIL, I.; LOULI, V.; MAGOULAS, K. Supercritical fluid extraction of celery seed oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 213–226, 2000. DOI: 10.1016/S0896-8446(00)00066-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844600000668>. Acesso em: 29 maio. 2019.
- PEREIRA, Marina C.; STEFFENS, Rosana S.; JABLONSKI, André; HERTZ, Plinho F.; DE O. RIOS, Alessandro; VIZZOTTO, Márcia; FLÔRES, Simone H. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 60, n. 12, p. 3061–3067, 2012. DOI: 10.1021/jf205263f.
- PERES, Marize Terezinha Lopes Pereira et al. Phytotoxic and antioxidant activity of seven native fruits of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 836–846, 2013. DOI: 10.1590/S0102-33062013000400024.

PÉRES, Valéria Flores; SAFFI, Jenifer; MELECCHI, Maria Inês S.; ABAD, Fernanda C.; DE ASSIS JACQUES, Rosângela; MARTINEZ, Migdalia M.; OLIVEIRA, Eniz Conceição; CARAMÃO, Elina B. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1105, n. 1, p. 115–118, 2006. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.07.113.

POURMORTAZAVI, Seied Mahdi; HAJIMIRSADEGHI, Seiedeh Somayyeh. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1163, n. 1–2, p. 2–24, 2007. DOI: 10.1016/J.CHROMA.2007.06.021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307010229>. Acesso em: 24 jun. 2018.

RASEIRA, M.; ANTUNES, L.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E. Espécies frutíferas nativas do Sul do Brasil. **Embrapa Clima Temperado**, [S. l.], p. 122p., 2004. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/BR/BR2012109700097.xml;BR20041744946>.

REVERCHON, E. Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil. **AIChE Journal**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 1765–1771, 1996. DOI: 10.1002/aic.690420627. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/aic.690420627>. Acesso em: 4 jun. 2018.

REVERCHON, Ernesto; MARCO, Iolanda De. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. [S. l.], v. 38, p. 146–166, 2006. DOI: 10.1016/j.supflu.2006.03.020.

RODRIGUES, Michelle F. F.; SOUSA, Ilza M. O.; VARDANEGA, Renata; NOGUEIRA, Gislaíne C.; MEIRELES, M. Angela A.; FOGLIO, Mary Ann; MARCHESE, José A. Techno-economic evaluation of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 132, p. 336–343, 2019. DOI: 10.1016/J.INDCROP.2019.02.049. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669019301505?via%3Dihub>. Acesso em: 29 abr. 2019.

RODRIGUES, Vera M.; SOUSA, Elisa M. B. D.; MONTEIRO, Alcilene R.; CHIAVONE-FILHO, Osvaldo; MARQUES, Marcia O. M.; MEIRELES, M. Angela A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: A pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 21–36, 2002. DOI: 10.1016/S0896-8446(01)00108-5.

ROSA, Paulo T. V.; MEIRELES, M. Angela A. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 67, n. 1–2, p. 235–240, 2005. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.05.064.

SANTOS, Diego T.; VEGGI, Priscilla C.; MEIRELES, M. Angela A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 108, n. 3, p. 444–452, 2012. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022>.

SANTOS, Flávia Almeida; FROTA, Julyanne Torres; ARRUDA, Bruno Rodrigues; DE MELO, Tiago Sousa; DA SILVA, Armenio André De Carvalho Almeida; BRITO, Gerly

- Anne De Castro; CHAVES, Mariana Helena; RAO, Vietla Satyanarayana. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 98, 2012. DOI: 10.1186/1476-511X-11-98. Disponível em: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-11-98>.
- SANTOS, Kátia Andressa; FROHLICH, Paula Cassiana; HOSCHEID, Jaqueline; TIUMAN, Tatiana Shioji; GONÇALVES, José Eduardo; CARDOZO-FILHO, Lúcio; DA SILVA, Edson Antônio. Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO₂ with ethanol and ethyl acetate cosolvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 128, p. 323–330, 2017. DOI: 10.1016/J.SUPFLU.2017.03.029. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844617300785>. Acesso em: 19 mar. 2019.
- SANTOS, Kátia Andressa; GONÇALVES, José Eduardo; CARDOZO-FILHO, Lúcio; DA SILVA, Edson Antônio. Pressurized liquid and ultrasound-assisted extraction of α -bisabolol from candeia (*Eremanthus erythropappus*) wood. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 130, p. 428–435, 2019. DOI: 10.1016/J.INDCROP.2019.01.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669019300135#sec0010>. Acesso em: 18 mar. 2019.
- SHARMA, Vipin K.; MAZUMDAR, B. Feasibility and characterization of gummy exudate of *Cochlospermum religiosum* as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 50, p. 776–786, 2013. DOI: 10.1016/J.INDCROP.2013.08.041.
- SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [S. l.], v. 53, p. 10–23, 2012. DOI: 10.1016/j.cep.2012.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>.
- SIMÃO DA SILVA, Kathryn A. B.; PASZCZUK, Ana F.; PASSOS, Giselle F.; SILVA, Eduardo S.; BENTO, Allisson Freire; MEOTTI, Flavia C.; CALIXTO, João B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α , β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **PAIN®**, [S. l.], v. 152, n. 8, p. 1872–1887, 2011. DOI: 10.1016/j.pain.2011.04.005.
- SINGH, Dharmendra; ARYA, P. V.; SHARMA, Ashutosh; DOBHALL, M. P.; GUPTA, R. S. Modulatory potential of α -amyrin against hepatic oxidative stress through antioxidant status in wistar albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 161, p. 186–193, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2014.12.025.
- SMITH, Robin. **Chemical Process: Design and Integration**. [s.l.] : Wiley, 2005.
- SOLDI, Cristian; PIZZOLATTI, Moacir Geraldo; LUIZ, Ana Paula; MARCON, Rodrigo; MEOTTI, Flavia Carla; MIOTO, Letícia Adelia; SANTOS, Adair R. S. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 3377–3386, 2008. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.12.008.
- SOMTIMUANG, Chonlatid; OLATUNJI, Opeyemi; OVATLARNPORN, Chitchamai. **Evaluation of In Vitro α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Potentials of 14 Medicinal Plants Constituted in Thai Folk Antidiabetic Formularies**. [s.l.: s.n.], v.

15 DOI: 10.1002/cbdv.201800025.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 409–414, 1994. DOI: 10.1016/0009-2509(94)87012-8.

SOVOVÁ, H. Modeling the supercritical fluid extraction of essential oils from plant materials. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1250, p. 27–33, 2012. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.05.014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312007169>. Acesso em: 11 jan. 2016.

SOVOVÁ, Helena; JEZ, Jaromír; BÁRTLOVÁ, Milena; ST'ASTOVÁ, Jitka. Supercritical carbon dioxide extraction of black pepper. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 295–301, 1995. DOI: 10.1016/0896-8446(95)90004-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0896844695900047>. Acesso em: 4 jun. 2018.

SOVOVÁ, Helena; STATEVA, Roumiana P. Supercritical fluid extraction from vegetable materials. **Reviews in Chemical Engineering**, [S. l.], v. 27, n. 3–4, p. 79–156, 2011. DOI: 10.1515/REVCE.2011.002.

STEFANELLO, Maria Élide a; WISNIEWSKI, Alberto; SIMIONATTO, Edésio L.; CERVI, Armando C. Composição química e variação sazonal dos óleos essenciais de *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 449–453, 2009.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): Avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Ecletica Quimica**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 7–13, 2009. DOI: 10.1590/S0100-46702009000300001.

SUNIL, Christudas; IRUDAYARAJ, Santiago Stephen; DURAI PANDIYAN, Veeramuthu; AL-DHABI, Naif Abdullah; AGASTIAN, Paul; IGNACIMUTHU, Savarimuthu. Antioxidant and free radical scavenging effects of β -amyrin isolated from *S. cochinchinensis* Moore. leaves. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 61, p. 510–516, 2014. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.07.005.

TAHTAH, Yousof; WUBSHET, Sileshi G.; KONGSTAD, Kenneth T.; HESKES, Allison Maree; PATERAKI, Irini; MØLLER, Birger Lindberg; JÄGER, Anna K.; STAERK, Dan. High-resolution PTP1B inhibition profiling combined with high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy: Proof-of-concept and antidiabetic constituents in crude extra. **Fitoterapia**, [S. l.], v. 110, p. 52–58, 2016. DOI: 10.1016/j.fitote.2016.02.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.02.008>.

TAKEUCHI, Thais M.; LEAL, Patrícia F.; FAVARETO, Rogério; CARDOZO-FILHO, Lúcio; CORAZZA, Marcos L.; ROSA, Paulo T. V.; MEIRELES, M. Angela A. Study of the phase equilibrium formed inside the flash tank used at the separation step of a supercritical fluid extraction unit. **Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 447–459, 2008. DOI: 10.1016/j.supflu.2007.08.002.

TAN, Chung-Sung; LIOU, Din-Chung. Modeling of desorption at supercritical conditions. **AIChE Journal**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1029–1031, 1989. DOI: 10.1002/aic.690350616. Disponível em:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.690350616/abstract>. Acesso em: 7 nov. 2016.

TCHAMGOUÉ, D. A.; KOPA, K. T.; NYUNAÏ N.; DIBOUÉ BETOTE, P. H.; NGUIMMO, M. A.; MEDOU, M. F. Carbohydrates Test and In Vitro Inhibitory Activities of Alpha-Glucosidase and Alpha-Amylase of Stem Bark Extracts of Musanga Cecropioides. **Journal of Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 4, n. 2, 2020. DOI: 10.23880/oajpr-16000202.

TEPE, Bektas; DAFERERA, Dimitra; SOKMEN, Atalay; SOKMEN, Munevver; POLISSIOU, Moschos. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 333–340, 2005. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2003.09.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603004783>. Acesso em: 11 mar. 2019.

THIMMAPPA, Ramesha; GEISLER, Katrin; LOUVEAU, Thomas; O'MAILLE, Paul; OSBOURN, Anne. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual review of plant biology**, [S. l.], v. 65, n. January, p. 225–57, 2014. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120229. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498976>.

TOMA, Maricela; VINATORU, M.; PANIWNKY, L.; MASON, T. .. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 137–142, 2001. DOI: 10.1016/S1350-4177(00)00033-X.

TURNER, C.; WALDEBÄCK, M. 2 – Principles of pressurized fluid extraction and environmental, food and agricultural applications. *In*: **Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries**. [s.l.: s.n.]. p. 39–70. DOI: 10.1533/9780857090751.1.67.

TURTON, Richard; BAILIE, Richard C.; WHITING, Wallace B.; SHAEIWITZ, Joseph A.; BHATTACHARYYA, Debangsu. **Analysis, synthesis, and design of chemical process**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998.

VAN ROMPAY, J. Purity determination and evaluation of new drug substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 725–732, 1986. DOI: 10.1016/0731-7085(86)80083-8.

VARDANEGA, Renata; CARVALHO, Pedro I. N.; ALBARELLI, Juliana Q.; SANTOS, Diego T.; MEIRELES, M. Angela A. Techno-economic evaluation of obtaining Brazilian ginseng extracts in potential production scenarios. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 101, p. 45–55, 2017. DOI: 10.1016/j.fbp.2016.10.010.

VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E.; GOMES, G. M. F.; LONGHI, L. G. S.; ATTI-SERAFINI, L.; ATTI-SANTOS, A. C. Supercritical extraction of carqueja essential oil: experiments and modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 375–382, 2006. DOI: 10.1590/S0104-66322006000300011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322006000300011&lng=en&tling=en. Acesso em: 4 jun. 2018.

VÁZQUEZ, Liliana Hernández; PALAZON, Javier; NAVARRO-OCANÁ, Arturo. The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. *In*: **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. [s.l.] : InTech, 2012. p. 487–502. DOI: 10.5772/27253. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role->

in-nutrition-and-health/the-pentacyclic-triterpenes-amyrins-a-review-of-sources-and-biological-activities.

VÁZQUEZ, Liliana Hernández; PALAZON, Javier; NAVARRO-OCAÑA, Arturo; METROPOLITANA, Autónoma; XOCHIMILCO, Unidad; BIOLÓGICOS, Depto Sistemas. The Pentacyclic Triterpenes α,β -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, [S. l.], v. 426, p. 478–502, 2011. DOI: 10.5772/27253.

VIEIRA JÚNIOR, Gerardo Magela; SOUZA, Cleide Maria Leite De; CHAVES, Mariana Helena. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 183–187 (In Portuguese), 2005. DOI: 10.1590/S0100-40422005000200003.

VILKHU, Kamaljit; MAWSON, Raymond; SIMONS, Lloyd; BATES, Darren. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 161–169, 2008. DOI: 10.1016/j.ifset.2007.04.014.

WAGH, S. J.; GUJAR, J. G.; GAIKAR, V. G. Experimental and modeling studies on extraction of amyrins from latex of mandar (*Calotropis gigantea*). **INDIAN JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY**, DR K S KRISHNAN MARG, PUSA CAMPUS, NEW DELHI 110 012, INDIA, v. 19, n. 6, p. 427–433, 2012.

ZABOT, Giovani L.; MORAES, Moyses N.; PETENATE, Ademir J.; MEIRELES, M. Angela A. Influence of the bed geometry on the kinetics of the extraction of clove bud oil with supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 93, p. 56–66, 2014. DOI: 10.1016/j.supflu.2013.10.001.

ZHAO, Yong; KONGSTAD, Kenneth Thermann; JÄGER, Anna Katharina; NIELSEN, John; STAERK, Dan. Quadruple high-resolution α -glucosidase/ α -amylase/PTP1B/radical scavenging profiling combined with high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry–solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance spectroscopy for identification o. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1556, p. 55–63, 2018. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.04.041. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.041>.

APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS COM OS PADRÕES ANALÍTICOS DE α -AMIRINA E β -AMIRINA

Figura A.1 - Curva de calibração de α -amirina.

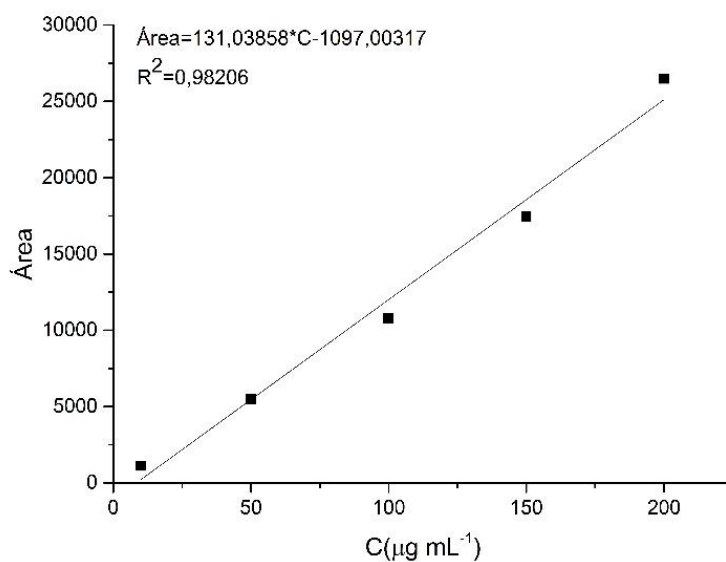
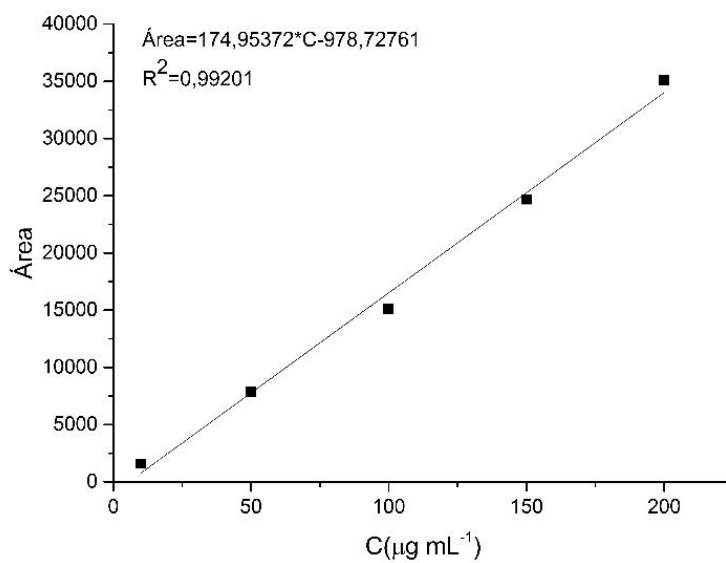


Figura A.2 - Curva de calibração de β -amirina.



**APÊNDICE B – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE
AMIRINAS NOS EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO
SUPERCRÍTICO**

Tabela B.1 - Teor de amirinas (α e β) presentes no extrato supercrítico de uvaia (% m/m) obtidos por EFS

Condição Experimental	Densidade CO₂ (kg/m³)	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (% m/m)
150 bar e 60 °C	604,61	12,94	38,92	51,86
150 bar e 80 °C	427,52	11,65	38,50	50,15
200 bar e 60 °C	724,11	13,74	49,75	63,49
200 bar e 80 °C	594,31	13,50	50,85	64,85
175 bar e 70 °C	598,56	12,84	40,64	53,48
175 bar e 70 °C	598,56	12,21	41,57	53,78
175 bar e 70 °C	598,56	13,07	40,08	53,15

Tabela B.2 - Quantificação de amirinas (α e β) em relação à massa de folhas de uvaia nos extratos obtidos por EFS (g kg⁻¹)

Condição Experimental	Densidade CO₂ (kg/m³)	α-amirina*	β-amirina*	Total*
150 bar e 60 °C	604,61	1,21	3,65	4,86
150 bar e 80 °C	427,52	0,38	1,26	1,64
200 bar e 60 °C	724,11	2,27	8,22	10,50
200 bar e 80 °C	594,31	1,97	7,42	9,39
175 bar e 70 °C	598,56	1,21	3,82	5,03
175 bar e 70 °C	598,56	1,12	3,83	4,95
175 bar e 70 °C	598,56	1,26	3,86	5,12

*Os resultados são expressos em relação à massa de folhas secas.

Tabela B.3 - Teor de amirinas (α e β) presentes no extrato supercrítico de uvaia (% m/m) obtidos por EFS nos testes com diferentes vazões e tamanhos de partículas

Condição Experimental	α -amirina (% m/m)	β -amirina (% m/m)	Total (% m/m)	α -amirina (g/kg)	β -amirina (g/kg)	Total (g/kg)
$1,5 \times 10^{-3}$ kg min ⁻¹	14,72	48,21	62,93	2,38	7,79	10,17
$2,0 \times 10^{-3}$ kg min ⁻¹	13,74	49,75	63,49	2,27	8,22	10,50
$2,5 \times 10^{-3}$ kg min ⁻¹	14,56	48,22	62,78	2,41	7,99	10,40
0,725 mm	13,26	43,28	56,93	1,78	5,86	7,64
0,602 mm	13,74	49,75	63,49	2,27	8,22	10,50
0,362 mm	14,12	49,02	63,15	2,47	8,58	11,05

Tabela B.4 – Resultados de concentração e rendimento de amirinas nos extratos obtidos por EFS usando diferentes pressões a 60 °C

Pressão (Bar)	Concentração (g 100 g ⁻¹ extrato)			Rendimento (mg g ⁻¹ MP)		
	α -amirina	β -amirina	Total	α -amirina	β -amirina	Total
150	7,1 ± 0,6 ^a	47 ± 3 ^b	54 ± 3 ^a	0,8 ± 0,1 ^c	5,1 ± 0,3 ^b	5,9 ± 0,3 ^a
200	6,8 ± 0,6 ^a	50 ± 3 ^{a,b}	57 ± 3 ^{a,b}	1,2 ± 0,1 ^b	8,7 ± 0,5 ^a	9,9 ± 0,6 ^b
250	6,7 ± 0,3 ^a	52,9 ± 0,7 ^a	60 ± 1 ^b	1,1 ± 0,1 ^{a,b}	8,6 ± 0,2 ^a	9,7 ± 0,2 ^{b,c}
300	5,0 ± 0,2 ^b	38,5 ± 0,7 ^c	43,5 ± 0,8 ^c	1,02 ± 0,04 ^a	7,8 ± 0,1 ^a	9,0 ± 0,2 ^c

Resultados são apresentados como média ± desvio padrão e as letras sobrescritas indicam se há diferença estatística a 5% de confiança.

Tabela B.5 - Resultados de concentração e rendimento de amirinas nos extratos obtidos por EFS usando diferentes cossolventes

Cossolvente	Concentração (g 100 g ⁻¹ extrato)			Rendimento (mg g ⁻¹ MP)		
	α -amirina	β -amirina	Total	α -amirina	β -amirina	Total
CO ₂ puro	6,8 ± 0,6 ^a	50 ± 3 ^{a,b}	57 ± 3 ^{a,b}	1,2 ± 0,1 ^b	8,7 ± 0,5 ^c	9,9 ± 0,6 ^c
5% AcEt	6,6 ± 0,5 ^{a,b}	52 ± 3 ^a	59 ± 4 ^a	1,58 ± 0,07 ^a	12,4 ± 0,4 ^b	13,00 ± 0,5 ^b
15% AcEt	5,7 ± 0,2 ^c	45,7 ± 0,5 ^b	51,4 ± 0,6 ^b	1,6 ± 0,1 ^a	12,5 ± 0,5 ^b	14,1 ± 0,6 ^b
5% EtOH	6,0 ± 0,1 ^{b,c}	45,8 ± 0,7 ^b	51,8 ± 0,8 ^b	1,63 ± 0,05 ^a	12,5 ± 0,2 ^b	14,1 ± 0,3 ^b
15% EtOH	4,4 ± 0,4 ^d	37 ± 3 ^c	41 ± 4 ^c	1,7 ± 0,1 ^a	14,4 ± 0,8 ^a	16,1 ± 0,9 ^a

Resultados são apresentados como média ± desvio padrão e as letras sobrescritas indicam se há diferença estatística a 5% de confiança.

APÊNDICE C – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE AMIRINAS UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES

Tabela C.1 - Quantificação de amirinas (α e β) presentes nos extratos obtidos com ultrassom utilizando diferentes solventes

Solvente	Rendimento global (% m/m)	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (% m/m)
Metanol	13,97	1,47	6,33	7,79
Etanol	5,63	6,51	17,57	24,08
Acetato de Etila	2,62	10,40	41,21	51,61
Hexano	1,62	15,03	57,97	73,01

Tabela C.2 - Quantificação de amirinas (α e β) em relação à massa de folhas de uvaia (g kg^{-1}) nos extratos obtidos com ultrassom utilizando diferentes solventes

Solvente	α-amirina*	β-amirina*	Total*
Metanol	2,05	8,84	10,89
Etanol	3,66	9,88	13,54
Acetato de Etila	2,73	10,82	13,55
Hexano	2,44	9,42	11,86

Tabela C.3- Quantificação de amirinas (α e β) presentes nos extratos obtidos com líquido pressurizado utilizando diferentes solventes

Solvente	Rendimento global (% m/m)	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (% m/m)
Metanol	20,30	1,28	4,40	5,68
Etanol	11,85	5,46	11,58	17,03
Acetato de Etila	3,74	8,71	26,64	35,35
Hexano	2,85	10,89	39,62	50,51

Tabela C.4 - Quantificação de amirinas (α e β) em relação à massa de folhas de uvaia (g kg^{-1}) nos extratos obtidos com líquido pressurizado utilizando diferentes solventes

Solvente	α-amirina*	β-amirina*	Total*
Metanol	2,61	8,94	11,55
Etanol	6,47	13,72	20,19
Acetato de Etila	3,26	9,97	13,23
Hexano	3,10	11,29	14,39

*Os resultados são expressos em relação à massa de folhas secas.

Tabela C.5 - Quantificação de amirinas (α e β) presentes nos extratos obtidos por maceração utilizando diferentes solventes

Solvente	Rendimento global (% m/m)	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (% m/m)
Metanol	17,49	4,94	6,81	11,75
Etanol	6,60	8,49	17,57	26,06
Acetato de Etila	2,78	10,25	41,08	51,33
Hexano	1,94	13,97	55,47	69,44

Tabela C.6 - Quantificação de amirinas (α e β) em relação à massa de folhas de uvaia (g kg^{-1}) nos extratos obtidos por maceração utilizando diferentes solventes

Solvente	α-amirina*	β-amirina*	Total*
Metanol	8,65	11,91	20,55
Etanol	5,61	11,61	17,22
Acetato de Etila	2,84	11,40	14,25
Hexano	2,71	10,74	13,45

*Os resultados são expressos em relação à massa de folhas secas.

**APÊNDICE D – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE
AMIRINAS NOS EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR
ULTRASSOM**

Tabela D.1 - Teor de amirinas (α e β) presentes no extrato obtidos com EAU com diferentes tempos de extração

Tempo (min)	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (% m/m)	α-amirina (g/kg)	β-amirina (g/kg)	Total (g/kg)
1	15,05	63,50	78,55	2,42	10,19	12,60
2	14,96	62,56	77,52	2,52	10,52	13,04
3	14,44	59,95	74,39	2,53	10,50	13,03
5	14,14	56,19	70,33	2,60	10,35	12,95
10	13,70	53,91	67,62	2,62	10,30	12,92
20	13,78	50,83	64,61	2,80	10,32	13,12
30	13,32	49,56	62,88	2,77	10,30	13,07
40	13,19	48,46	61,65	2,79	10,26	13,05
50	12,77	48,13	60,91	2,74	10,31	13,05

Tabela D.2 - Quantificação de amirinas (α e β) em relação à massa de folhas de uvaia nos extratos obtidos por EAU (g kg^{-1})

Condição Experimental			α-amirina *	β-amirina *	Total *
W/L	°C	g:mL			
200	50	1:15	2,19	8,93	11,12
300	50	1:15	2,09	8,50	10,60
200	60	1:15	2,20	8,87	11,08
300	60	1:15	2,40	10,06	12,46
200	50	1:25	2,32	10,10	12,41
300	50	1:25	2,41	9,88	12,28
200	60	1:25	2,53	10,58	13,11
300	60	1:25	2,40	9,72	12,12
250	55	1:20	2,39	10,13	12,53
250	55	1:20	2,52	10,01	12,52
250	55	1:20	2,47	10,28	12,75

*Os resultados são expressos em relação à massa de folhas secas.

Tabela D.3 - Avaliação do modo pulsar na extração assistida por ultrassom

Configuração dos pulsos (lig/desi)	Tempo total de sonicação	α- amirina (% m/m)	β- amirina (% m/m)	Total (% m/m)	α- amirina (g/kg)	β- amirina (g/kg)	Total (g/kg)
1 s / 5 s	10 s	15,60	64,74	80,34	2,36	9,78	12,14
1 s / 1 s	30 s	15,46	65,96	81,42	2,39	10,18	12,57
5 s / 5 s	30 s	15,37	64,96	80,33	2,38	10,06	12,44
5 s / 1 s	50 s	15,57	65,98	81,55	2,46	10,41	12,87
60 s	60 s	15,75	65,80	81,56	2,53	10,58	13,11

**APÊNDICE E – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE
AMIRINAS NOS EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO
PRESSURIZADO**

Tabela E.1 - Teor de amirinas (α e β) presentes no extrato obtidos com ELP com diferentes temperaturas e pressões.

Condição experimental	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (% m/m)	α-amirina (g/kg)	β-amirina (g/kg)	Total (g/kg)
40 °C / 50 bar	12,29	53,94	66,22	2,60	11,39	13,99
40 °C / 100 bar	12,87	58,10	70,97	2,58	11,64	14,22
40 °C / 150 bar	12,70	57,76	70,47	2,42	11,00	13,42
70 °C / 50 bar	7,39	32,63	40,02	2,06	9,09	11,15
70 °C / 100 bar	7,63	32,83	40,46	2,15	9,25	11,39
70 °C / 150 bar	8,15	35,86	44,00	2,34	10,30	12,64
100 °C / 50 bar	7,04	30,63	37,68	2,40	10,46	12,86
100 °C / 100 bar	7,36	31,55	38,91	2,56	10,98	13,55
100 °C / 150 bar	7,30	32,56	39,86	2,60	11,60	14,21

Tabela E.2 - Teor de amirinas (α e β) presentes no extrato obtidos com ELP com diferentes tempos de extração.

Tempo (min)	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (% m/m)	α-amirina (g/kg)	β-amirina (g/kg)	Total (g/kg)
0,5	14,77	61,83	76,61	1,74	7,26	9,00
1	14,27	61,92	76,19	2,33	10,11	12,44
3	13,85	60,42	74,26	2,67	11,65	14,32
5	13,65	59,26	72,91	2,71	11,75	14,45
7	13,52	58,53	72,06	2,72	11,78	14,50
10	13,26	57,17	70,42	2,74	11,81	14,55

Tabela E.3 - Teor de amirinas (α e β) presentes nos extratos de uvaia (% m/m) obtidos por ELP no planejamento experimental.

Condição Experimental		α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (% m/m)
Temperatura (°C)	Pressão			
30	120	13,45	58,41	71,86
50	120	12,38	53,10	65,49
30	180	13,14	60,37	73,51
50	180	11,57	50,72	62,28
40	150	13,02	58,24	71,26
40	150	12,66	56,62	69,28
40	150	12,95	56,27	69,22

Tabela E.4 - Avaliação do tamanho de partícula e da vazão de solvente na ELP.

Condição Experimental	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (% m/m)	α-amirina (g/kg)	β-amirina (g/kg)	Total (g/kg)
3 ml min ⁻¹	13,07	57,71	70,78	2,49	10,99	13,48
5 ml min ⁻¹	13,14	60,37	73,51	2,73	12,52	15,25
7 ml min ⁻¹	13,70	60,94	74,64	2,89	12,85	15,74
0,512 mm	12,97	58,55	71,53	2,27	10,27	12,54
0,362 mm	13,17	59,13	72,30	2,49	11,20	13,69
0,275 mm	13,14	60,37	73,51	2,73	12,52	15,25

APÊNDICE F – DADOS COMPLEMENTARES DE QUANTIFICAÇÃO DE AMIRINAS NOS EXTRATOS OBTIDOS POR MACERAÇÃO

Tabela F.1 - Teor de amirinas (α e β) presentes no extrato obtidos por maceração com diferentes tempos de extração

Tempo (min)	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (%) m/m)	α-amirina (g/kg)	β-amirina (g/kg)	Total (g/kg)
1	16,29	67,29	83,57	2,07	8,54	10,61
3	15,86	64,90	80,76	2,15	8,80	10,95
5	15,72	64,60	80,32	2,15	8,83	10,97
10	15,24	60,63	75,87	2,25	8,93	11,18
20	14,66	58,87	73,53	2,41	9,69	12,10
30	14,53	56,69	71,22	2,52	9,82	12,33
60	13,45	52,04	65,49	2,52	9,74	12,26
120	13,10	49,97	63,07	2,51	9,57	12,08
180	12,89	49,94	62,83	2,51	9,72	12,23

Tabela F.2 - Efeito da temperatura sobre a quantidade de amirinas obtidas na extração por maceração

Temperatura	α-amirina (% m/m)	β-amirina (% m/m)	Total (%) m/m)	α-amirina (g/kg)	β-amirina (g/kg)	Total (g/kg)
50	15,02	59,97	75,00	2,42	9,65	12,07
55	14,66	58,87	73,53	2,41	9,69	12,10
60	15,04	57,40	72,44	2,56	9,78	12,34