



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



TESE DE DOUTORADO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS EXTRATIVOS A PARTIR DA *RUMEX ACETOSA* E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE SEUS EXTRATOS

Ênio Rafael de Medeiros Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Bittencourt Dutra de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Neves Maia de Oliveira

Natal/RN
Setembro/2017

Ênio Rafael de Medeiros Santos

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS EXTRATIVOS A
PARTIR DA *RUMEX ACETOSA* E CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA DE SEUS EXTRATOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Bittencourt Dutra de Sousa e coorientação do Prof. Dr. Humberto Neves Maia de Oliveira.

Natal/RN
Setembro/2017

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Sistema de Bibliotecas – SISBI
Catalogação da Publicação na Fonte - Biblioteca Central Zila Mamede

Santos, Ênio Rafael de Medeiros.

Desenvolvimento de processos extrativos a partir da *Rumex acetosa* e caracterização química de seus extratos / Enio Rafael de Medeiros Santos. - 2017.

141 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal, RN, 2017.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elisa Maria Bittencourt Dutra de Sousa.

Coorientador: Humberto Neves Maia de Oliveira.

1. Rumex acetosa - Tese. 2. Extração por fluidos pressurizados - Tese. 3. Trans-resveratrol - Tese. 4. Emodina - Tese. 5. Atividade antioxidante - Tese. 6. Teor de fenólicos totais - Tese. I. Sousa, Elisa Maria Bittencourt Dutra de. II. Oliveira, Humberto Neves Maia de. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 582.099

SANTOS, Ênio Rafael de Medeiros – Desenvolvimento de processos extrativos a partir da *Rumex acetosa* e caracterização química de seus extratos. Tese de Doutorado. UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia Química. Natal/RN, Brasil.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elisa Maria Bittencourt Dutra de Sousa (DEQ-UFRN)

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Neves Maia de Oliveira (DEQ-UFRN)

RESUMO: Pesquisas apresentam o excesso de radicais livres como um dos responsáveis por diversas doenças degenerativas e pelo envelhecimento. Nesse contexto, desponta a utilização de compostos fenólicos naturais por apresentarem ótima atividade antioxidante e por inibirem a formação desses radicais. Em meio aos estudos acerca desses compostos, os antioxidantes: *cis* e *trans*-resveratrol, *cis* e *trans*-piceid e emodina ganham destaque no meio científico. Trabalhos científicos comprovam a presença desses compostos fenólicos na herbácea “Azedinha” (*Rumex acetosa*), logo, os extratos de suas raízes vêm sendo cada vez mais utilizadas em aplicações farmacológicas. A partir disso, este trabalho teve por objetivo central a obtenção de extratos dessas raízes utilizando técnicas de extração com fluido supercrítico (SFE), extração com líquidos pressurizados (PLEs), extração com utilização de micro-ondas (MAE), extração com solvente a baixa pressão (LPSE) e a extração Soxhlet. Na SFE, foi avaliado o efeito das variáveis de processo (temperatura, vazão, pressão e concentração de solvente) sobre a cinética da extração, rendimento e solubilidade do extrato. Nas PLEs, tanto foram avaliadas a temperatura e a pressão, como a influência dos diferentes solventes (água, etanol, hexano, tolueno, acetonitrila e isopropanol) e seu uso sequenciado como PLE sequenciada. As curvas obtidas nas SFEs e PLEs foram ajustadas segundo os modelos: Martínez, Crank e Sovová e seus desvios médios calculados. Na extração Soxhlet foi avaliado o uso de quatro solventes (etanol, acetonitrila, isopropanol e álcool terc-butílico), enquanto que na extração LPSE e MAE foi utilizado o etanol como solvente. Também foi testada a utilização da precipitação por anti-solvente supercrítico (SAS) como forma de secagem. O teor de fenólicos totais, a capacidade antioxidante dos extratos e os principais componentes do extrato foram determinados. Os rendimentos obtidos em todas as técnicas variaram de 0,2 a 8,7%, sendo o melhor resultado obtido na extração PLE com etanol. A SFE apresentou o extrato com maior concentração de emodina (42,8 mg/g). A concentração de *trans*-resveratrol em todos os extratos variou entre 1,0 e 5,7 mg/g, a depender da técnica utilizada. A atividade antioxidante e os compostos fenólicos totais resultaram em valores compreendidos entre 3,4 e 163,4 µg/mL e 27,6 e 157,0 mg EAG/g_e, respectivamente, a depender da técnica utilizada. A MAE obteve extratos com 130,6 mg EAG/g_e, e 3,4 µg/mL em 30 minutos de operação. As extrações com fluidos pressurizados (PLEs e SFEs) demonstraram ótimos resultados, principalmente quanto à extração sequencial, na qual foi possível a separação de *trans*-resveratrol e emodina.

PALAVRAS-CHAVE:

Rumex acetosa. Extração por fluidos pressurizados. *Trans*-resveratrol. Emodina. Atividade antioxidante. Teor de fenólicos totais.

Ênio Rafael de Medeiros Santos


Desenvolvimento de processos extrativos a partir da *Rumex acetosa* e caracterização química de seus extratos

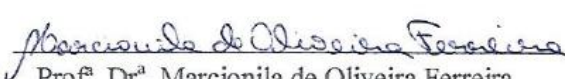
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.


Aprovado em 18 / Setembro / 2017

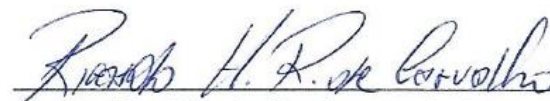

Prof.^ª Dr.^ª Elisa Maria Bittencourt Dutra
de Sousa
Orientadora – UFRN


Prof. Dr. Humberto Neves Maia de
Oliveira
Coorientador – UFRN


Prof. Dr. Bento Pereira da Costa Neto
Externo – IFRN


Prof.^ª Dr.^ª Marcionila de Oliveira Ferreira
Externo – IFRN


Prof.^ª Dr.^ª Elisângela Lopes Galvão
Externo – UFERSA


Prof. Dr. Ricardo Henrique Rocha de
Carvalho
Externo – UFERSA

Abstract

Research presents the excess of free radicals as one responsible for various degenerative diseases and aging. In this context, the use of natural phenolic compounds appears to have excellent antioxidant activity and to inhibit the formation of these radicals. In the middle of studies about these compounds, the antioxidants: *cis* and *trans*-resveratrol, *cis* and *trans*-piceid and emodin are prominent in the scientific world. Scientific works prove the presence of these phenolic compounds in the herbaceous "Azedinha" (*Rumex acetosa*), so extracts from their roots have been increasingly used in pharmacological applications. From this, the main objective of this work was to extract extracts of these roots using supercritical fluid extraction (SFE), pressurized fluid extraction (PLEs), microwave extraction (MAE), solvent extraction low pressure (LPSE) and Soxhlet extraction. In SFE, the effect of the process variables (temperature, flow, pressure and cosolvents concentration) on the kinetics of extraction, yield and solubility of the extract was evaluated. In the PLEs, both temperature and pressure and the influence of the different solvents (water, ethanol, hexane, toluene, acetonitrile and isopropanol) were evaluated and their use sequenced as PLE. The curves obtained in the SFEs and PLEs were adjusted according to the models: Martínez, Crank and Sovová and their calculated mean deviations. In the Soxhlet extraction, the use of four solvents (ethanol, acetonitrile, isopropanol and tert-butyl alcohol) was evaluated, while in the LPSE and MAE extraction ethanol was used as the solvent. The use of supercritical anti-solvent (SAS) precipitation as a drying method was also tested. The total phenolic content, the antioxidant capacity of the extracts and the main components of the extract were determined. The yields obtained in all the techniques varied from 0.2 to 8.7%, being the best result obtained in the PLE extraction with ethanol. SFE presented the extract with the highest concentration of emodin (42.8 mg/g). The concentration of *trans*-resveratrol in all extracts ranged from 1.0 to 5.7 mg/g, depending on the technique used. The antioxidant activity and the total phenolic compounds resulted in values between 3.4 and 163.4 µg/mL and 27.6 and 157.0 mg EAG/g, respectively, depending on the technique used. MAE obtained extracts with 130.6 mg EAG/g and 3.4 µg/mL in 30 minutes of operation. Extractions with pressurized fluids (PLEs and SFEs) showed excellent results, mainly regarding sequential extraction, in which the separation of *trans*-resveratrol and emodin was possible.

KEYWORDS:

Rumex acetosa. Extraction by pressurized fluids. *Trans*-resveratrol. Emodina. Antioxidant activity. Total phenolic content.

*Aos meus pais,
Elisio Etelvino dos Santos e
Elizabeth de Medeiros Santos.
A minha esposa Eucelenes Felinto Medeiros
e ao fruto do nosso amor que cresce em seu ventre*

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”**

(Madre Teresa de Calcutá)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, desejo agradecer ao bom Deus pelo dom da minha vida, por todas as providências e misericórdias da parte dEle, ao longo desses 4 anos de doutorado; pelos momentos de alegria e felicidade vividos; pelos dons da perseverança, fortaleza, paciência e resiliência diante das inúmeras dificuldades enfrentadas nesse tempo e pelos milagres e consolos de Pai nos momentos de tristeza, dor e indecisão.

Aos meus pais, Elisio e Elizabeth, pela força, oração e pelos conselhos em todos os momentos. Devo meus estudos, toda a minha vida profissional e minha formação como pessoa aos meus pais e seus ensinamentos. Também agradeço de forma especial aos meus irmãos Ezaú e Elder e aos demais familiares pelo apoio e por entenderem minhas ausências.

À minha digníssima esposa Euclenes Medeiros por todo amor, companheirismo, zelo, cuidado, oração e paciência. Pelas diversas vezes que ela me acolheu nos momentos de dificuldade. Agradeço a ela por entender todas as minhas ausências e estresses. Serei sempre eternamente grato a ela por tudo.

À minha professora, orientadora e quase segunda mãe Elisa Maria Bittencourt Dutra de Sousa por seus valiosos ensinamentos, pela paciência, carinho e dedicação. Devo toda a minha vida de pós-graduando a esta exemplar professora, com quem aprendi bastante. Exímia orientadora que sempre soube conduzir os trabalhos, que sempre soube cobrar e ter paciência nos momentos certos e de forma bastante equilibrada, serena e paciente.

Ao professor e coorientador Humberto Neves Maia de Oliveira por todo zelo, cuidado e dedicação ao trabalho. Agradeço a ele por toda a força e empenho na realização dos processos extrativos e por todas as lições de vida ensinadas durante o dia-a-dia.

Queria agradecer de forma especial a todos os meus grandes amigos e quase irmãos: André, Aldo, Anderson, Alex, Rogério, Nila, Ricardo, Adriana, Saulo e Ianny por todos os momentos de descontração, convivência e de partilha de vida que me proporcionaram. Por toda a atenção a mim dedicada, pela ajuda e empenho durante este trabalho.

Mesmo correndo o risco de esquecer algum, queria agradecer aos meus grandes e queridos bolsistas do Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Biodiesel da UFRN: Gabriel, Paulo, Felipe, Izana, Isadora, Vitor, André, João, Olívia e Jarson por toda dedicação, trabalho e zelo com a minha tese. Todos foram fundamentais na execução deste trabalho.

Gostaria de agradecer ao prof. Osvaldo Chiavone Filho e a aluna Fedra Ferreira pela disposição no empréstimo da bomba tipo seringa para a realização das extrações.

De forma especial ao prof. Claudio Dariva e toda a equipe do laboratório do NUESC do Instituto de Tecnologia e Pesquisa presente na Universidade Tiradentes em Aracaju/SE. Certamente, este trabalho não seria possível sem a valorosa contribuição de todos esses.

Ao prof. Eduardo Lins e a todos que fazem parte do Laboratório do NUPEG (Cristiane, Paulino, Thyrone, Diego, Ricardo e Itala) pela utilização do HPLC e do espectrofotômetro.

Gostaria de agradecer à professora Maria de Fátima e à técnica de laboratório Elania do IQ/UFRN por todas as medições cromatográficas em HPLC.

Também gostaria de agradecer as pessoas de Eusamar (Mazinha), Medeiros, Rafael (Rafinha) e a todos os funcionários terceirizados do Centro de Tecnologia pela valorosa contribuição que prestaram com a viabilidade deste trabalho.

Aos professores do PPGEQ e do DEQ que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização desta tese.

Ao Demys pelos importantes e valiosos conselhos e por todo acompanhamento realizado durante este doutorado.

A banca de qualificação e de defesa de doutorado pelas valiosas considerações quanto a este trabalho.

Aos meus irmãos da Comunidade Católica Shalom pelo apoio e sustento espiritual tão necessário para a conclusão deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Sumário

1. Introdução	18
2. Revisão Bibliográfica	24
2.1 – <i>Rumex acetosa</i>	24
2.2 – Antioxidantes	25
2.2.1 – Compostos fenólicos.....	27
2.3 – Métodos de extração.....	32
2.3.1 – Extrações convencionais (Soxhlet e LPSE)	32
2.3.2 – Extração supercrítica.....	33
2.3.3 – Extração por líquido pressurizado (PLE).....	40
2.3.4 – Extração assistida por micro-ondas MAE.....	41
2.3.5 – Modelagem matemática	43
2.4 – Processos de secagem de extratos	49
2.4.1 – Secagem convencional.....	49
2.4.2 – Liofilização.....	50
2.4.3 – Secagem por precipitação com anti-solvente supercrítico	50
3. Materiais e Métodos	53
3.1 – Materiais e preparação das amostras	54
3.2 – Extração com fluido supercrítico (SFE)	55
3.2.1 – Curvas cinéticas de extração e solubilidade	58
3.3 – Extrações com líquidos pressurizados (PLE)	58
3.3.1 – Extração com líquidos pressurizados de forma sequencial.....	61
3.4 – Extração com utilização de micro-ondas.....	62
3.5 – Precipitação e secagem de extratos com utilização de anti-solvente	63
3.6 – Extração Soxhlet	64
3.7 – Extração com solvente a baixa pressão (LPSE).....	65
3.8 – Determinação da atividade antioxidante dos extratos (EC ₅₀)	65
3.9 – Determinação do teor de fenólicos totais (TFT)	68
3.10 – Análises cromatográficas (HPLC).....	70
3.11 – Modelagem matemática das curvas cinéticas das SFEs e PLEs	71
4. Resultados e discussões	75
4.1 – Extração com fluido supercrítico (SFE)	75
4.1.1 – Efeito da vazão sobre os parâmetros cinéticos de extração, rendimento e solubilidade	75
4.1.2 – Efeito da concentração de etanol: cinética de extração, rendimento e solubilidade	78
4.1.3 – Isotermas de rendimento global e solubilidade	81

4.1.4 – Teor de fenólicos totais (TFT) e atividade antioxidante (EC ₅₀).....	83
4.1.5 – Composição dos extratos SFE.....	86
4.2 – Extrações com líquidos pressurizados (PLEs).....	89
4.2.1 – Extração com etanol pressurizado	89
4.2.2 – Extração PLE com solventes distintos.....	92
4.2.3 – Extração PLE sequencial	94
4.2.4 – Teor de fenólicos totais (TFT), atividade antioxidante (EC ₅₀) e composição.....	97
4.3 – Extração com utilização de micro-ondas (MAE).....	98
4.4 – Discussão sobre as técnicas de extração: SFE, PLE, Soxhlet, LPSE e com utilização de micro-ondas.....	99
4.5 – Processo de precipitação com anti-solvente supercrítico	103
4.6 – Avaliação de modelos cinéticos de extração	104
5. Conclusões	110
6. Referências	113
7. Anexos.....	136
Anexo A – Foto da unidade da extração com líquido pressurizado	136
Anexo B – Quantidade de reagente e solvente para a quantificação do teor de fenólicos totais nos extratos da <i>Rumex acetosa</i>	137
Anexo C – Dados de entrada para a modelagem utilizando o <i>software Tecanalysis</i>	138

Lista de Figuras

Figura 2.1 – <i>Rumex acetosa</i> (“Azedinha”). Disponível em: < http://www.pfaf.org/user/Default.aspx >. Acesso em: 30 de nov. 2017.....	24
Figura 2.2 – Representação das fases da peroxidação lipídica. Fonte: Santos <i>et al.</i> , 2007	26
Figura 2.3 – Fórmula estrutural dos isômeros <i>trans</i> -resveratrol (I) e <i>cis</i> -resveratrol (II). Fonte: Autoria própria (2017).....	30
Figura 2.4 – Estrutura química de isômeros do piceid. Fonte: Lamuela-Raventós <i>et al.</i> , 1999	31
Figura 2.5 – Estrutura química da emodina. Fonte: Autoria própria (2017)	31
Figura 2.6 – Representação do diagrama de fases do CO ₂ puro. Fonte: Campomanes, 2012	33
Figura 2.7 – Exemplo de curva cinética de extração, sendo: CER a etapa da taxa constante de extração, FER a etapa com taxa decrescente e DC etapa difusional). Fonte: Jesus, 2015	39
Figura 2.8 – Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético. Fonte: Sanseverino (2002).....	41
Figura 3.1 – Fluxograma referente às atividades desenvolvidas neste trabalho	53
Figura 3.2 – Raiz seca e triturada da <i>Rumex acetosa</i> . Fonte: Autoria própria (2017)	54
Figura 3.3 – Unidade de extração supercrítica (SFE-CO ₂ /Etanol), sendo: V-1, V-2, V-3, V-4: válvulas agulha macrométricas; V-5: válvula agulha micrométrica; R-1: cilindro de gás CO ₂ ; R-2: frasco com etanol; R-3: coletor de extrato; P-1: bomba seringa; P-2: bomba de cossolvente; E-1 coluna extratora; B-1 e B-2: banhos termostatizados; H-1: aquecedor; T-1: termopar; M-1: manômetro. Fonte: Autoria própria (2017).....	55
Figura 3.4 – Unidade de extração com líquido pressurizado, sendo: V-1, V-2: válvulas agulha macrométricas; V-3: válvula agulha micrométrica; R-1: frasco contendo solvente; R-2: coletor de extrato; P-1: bomba de solvente; E-1 coluna extratora; B-1: banho termostatizado; T-1: termopar; M-1: manômetro. Fonte: Autoria própria (2017)	60
Figura 3.5 – Fluxograma da PLE com solventes orgânicos de forma sequencial.....	61
Figura 3.6 – Foto do reator de micro-ondas Synthos 3000 Anton Paar; foto da base giratória e tubos de quartzo. Fonte: Silva (2010)	62
Figura 3.7 – Unidade experimental utilizada para a precipitação com anti-solvente supercrítico. Fonte: Adaptado de Junges (2016)	63
Figura 3.8 – Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH. Fonte: Adaptado de Wang <i>et al.</i> (2016)	66
Figura 3.9 – Absorbância em função do comprimento de onda antes e depois da adição de antioxidantes na solução de DPPH. Fonte: Adaptado de Boligon <i>et al.</i> (2014)	68
Figura 4.1 – Influência da vazão de solvente (CO ₂ + 15% EtOH) sobre a cinética da extração de <i>Rumex acetosa</i> a 60 °C e 20 MPa	77

Figura 4.2 – Curva total de extração com ajustes das retas da etapas CER e FER nas condições 20 MPa; 60 °C; 15% EtOH; 1 mL/min, sendo CER (etapa com taxa constante de extração) e FER (etapa com taxa decrescente de extração).....	78
Figura 4.3 – Influência da concentração de etanol na mistura solvente sobre a cinética da extração de <i>Rumex acetosa</i> nas condições T= 40 °C, P=15 MPa, Q _T =1 mL/min e 180 min.	79
Figura 4.4 – Influência da concentração de etanol na mistura solvente sobre a rendimento (R _T) e solubilidade (Y _{CER}) da extração de <i>Rumex acetosa</i> com dióxido de carbono a 40 °C e 15 MPa, empregando uma vazão total da mistura solvente de 1 mL/min.	80
Figura 4.5 – Efeitos da temperatura e pressão sobre a solubilidade e rendimento global dos extratos (SFE) da <i>Rumex acetosa</i> , nas condições C _{EtOH} = 15% e Q _T = 1mL/min.	82
Figura 4.6 – Efeito das variáveis de processo no teor de fenólicos totais (TFT) e Atividade antioxidante. (a) Efeito da vazão total de solvente: 20 Mpa, 60 °C e 15% de etanol; (b) Efeito da concentração do cossolvente na mistura solvente: 15 Mpa, 40 °C e 1 mL/min de vazão total; (c) Efeito da temperatura: 20 MPa, 1 mL/min e 15% de etanol; (d) Efeito da pressão: 40 °C, 1 mL/min e com 15% de etanol.	83
Figura 4.7 – Cromatograma típico da SFE: 15 MPa, 35% EtOH; 40 °C e 1 mL/min. (1) <i>Trans</i> -resveratrol; (2) <i>Cis</i> -resveratrol; (3) Emodina; (4) Piceid.....	86
Figura 4.8 – Efeito das variáveis de processo no teor de <i>trans</i> -resveratrol e emodina. (a) Efeito da concentração do cossolvente: 15 Mpa, 40 °C e 1 mL/min; (b) Efeito da vazão total de solvente: 20 Mpa, 60 °C e 15% de EtOH; (c) Efeito da temperatura: 20 MPa, 1 mL/min e 15% de EtOH; (d) Efeito da pressão: 40 °C, 1 mL/min e 15% de EtOH.	87
Figura 4.9 – Efeito do tempo de extração na composição dos extratos em SFE (T = 40 °C, P=15MPa, C _{EtOH} = 25% e Q _T = 1 mL/min.....	88
Figura 4.10 – Curvas cinéticas das PLEs com etanol a vazão de 1 mL/min	89
Figura 4.11 – Diagrama de Pareto para os valores dos efeitos padronizados	90
Figura 4.12 – Superfície de resposta em função do rendimento da extração, para Temperatura (°C) versus Pressão (bar)	92
Figura 4.13 – Curvas cinéticas de extração com líquidos pressurizados distintos (Tolueno, Hexano, Etanol) de forma sequenciada.....	94
Figura 4.14 – Dados de composição para cada extrato da PLE sequencial em diferentes temperaturas; a) Gráfico para concentração de <i>trans</i> -resveratrol; b) Gráfico para concentração de emodina	95
Figura 4.15 – Resultado das técnicas de extração quanto ao rendimento (%); tempo (h); g solvente total/g amostra alimentada (S/F) e g EtOH/g amostra alimentada (S(EtOH)/F)	100
Figura 4.16 – Curva de extração global das raízes da <i>Rumex acetosa</i> obtidas através de LPSE com etanol a 40 °C.....	101
Figura 4.17 – Resultados das técnicas de extração em relação a composição dos extratos, avaliação antioxidante e teor de fenólicos totais.	102

Figura 4.18 – Dados de composição dos extratos secos a partir da precipitação por anti-solvente supercrítico e secagem convencional	103
Figura 4.19 – Comparação entre os dados experimentais da SFE (15 MPa, 40 °C, 35%, 1 mL/min) e os ajustes do modelos de Crank, Martínez <i>et al.</i> e Sovová.....	106
Figura 4.20 – Comparação entre os dados experimentais da SFE (20 MPa, 60 °C, 15%, 4 mL/min) e os ajustes do modelos de Crank, Martínez <i>et al.</i> e Sovová.....	107
Figura 4.21 – Comparação entre os dados experimentais da PLE (15 MPa, 80 °C, 100% EtOH, 1 mL/min) e os ajustes do modelos de Crank, Martínez <i>et al.</i> e Sovová	108
Figura 7.1 – Unidade de extração com líquido pressurizado (PLE)	136

Lista de tabelas

Tabela 2.1 – Principais classes de compostos fenólicos. Fonte: Salvador, 2011	28
Tabela 2.2 – Solventes utilizados na extração com fluidos pressurizados. Fonte: Freitas, 2007.....	36
Tabela 2.3 – Propriedades físico-químicas de uma substância genérica. Fonte: Brunner, 2005	37
Tabela 3.1 – Condições experimentais desenvolvidas para extração supercrítica.....	57
Tabela 3.2 – Níveis para os fatores e seus valores codificados para a extração com etanol pressurizado em raízes de <i>Rumex acetosa</i>	59
Tabela 3.3 – Condições operacionais da extrações utilizando diferentes solventes pressurizados.....	59
Tabela 3.4 – Quantidade de ácido ascórbico, de etanol e de solução de DPPH para a montagem da curva do padrão	67
Tabela 3.5 – Quantidade de amostra, de etanol e de solução de DPPH para a análise	67
Tabela 3.6 – Quantidade das substâncias utilizadas na curva de calibração com ácido gálico	69
Tabela 3.7 – Condições das extrações utilizadas na modelagem.....	71
Tabela 4.1 – Avaliação de parâmetro cinético na etapa CER obtido a partir da curva cinética total de extração nas condições 20 MPa; 60 °C; 15% EtOH	76
Tabela 4.2 – Avaliação do efeito da concentração de etanol sobre o rendimento total e a solubilidade (Y_{CER}) em SFEs da <i>Rumex acetosa</i> a 40 °C, 15 MPa e $Q_T = 1$ mL/min	79
Tabela 4.3 – Avaliação dos efeitos da temperatura e da pressão sobre a solubilidade (Y_{CER}) e rendimento total das SFEs em <i>Rumex acetosa</i>	81
Tabela 4.4 – Efeitos calculados no Statistica 7.0® para o planejamento experimental	90
Tabela 4.5 – Extração com líquido pressurizado utilizando solventes distintos.....	93
Tabela 4.6 – Avaliação do potencial antioxidante dos extratos (EC_{50}) e do teor de fenólicos totais dos extratos da PLE com etanol (EtOH)	97
Tabela 4.7 – Resultados encontrados para a extração assistida por micro-ondas nas condições: F/S = 6,4g/30mL; 80 °C e 30 min.....	98
Tabela 4.8 – Parâmetros dos modelos ajustados às curvas cinéticas das extrações SFE e PLE.....	105
Tabela 7.1 – Planilha contendo os volumes utilizados de cada solvente e reagente para os ensaios reacionais com os extratos da <i>Rumex acetosa</i>	137
Tabela 7.2 – Dados de entrada utilizados no ajuste das curvas cinéticas de extração referentes a SFE nas condições 20 MPa / 60 °C / 15% / 4 mL/min.....	138
Tabela 7.3 – Dados de entrada utilizados no ajuste das curvas cinéticas de extração referentes a SFE nas condições 15 MPa / 40 °C / 35% / 1 mL/min.....	138
Tabela 7.4 – Dados de entrada utilizados no ajuste das curvas cinéticas de extração referentes a PLE nas condições 15 MPa / 80 °C / EtOH / 1 mL/min	139

Nomenclatura

(% v/v) – Percentual de volume de um solvente por volume total da mistura de solventes

AARD – Desvio médio relativo total

BHA – Antioxidante sintético (butil-hidroxi-anisol)

BHT – Antioxidante sintético (butil-hidroxi-tolueno)

b_i – Parâmetro de ajuste do modelo de Martínez (2003)

CER – Etapa da extração com fluidos pressurizados na qual a taxa de extração é constante

C_{EtOH} – Concentração de etanol na extração supercrítica

D – Coeficiente de difusão do soluto na partícula, segundo modelo de Crank (1975)

D_C – Densidade crítica

DC – Etapa difusional da extração com fluidos pressurizados

DPPH – Abreviação para o reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG – Equivalente em ácido gálico

EC_{50} – Concentração necessária para capturar 50% do radical DPPH presente em solução

EtOH – Etanol

FER – Etapa da extração com fluidos pressurizados na qual a taxa de extração é decrescente

g_a – Massa da matéria-prima

g_e – Massa de extrato

g_s – Massa de solvente

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

K_{FA} – Coeficiente de transferência de massa da fase fluida, segundo Sovová (1994)

K_{SA} – Coeficiente de transferência de massa da fase sólida, segundo Sovová (1994)

LPSE – Extração com utilização de líquidos a baixas pressões (pressão atmosférica)

MAE – Extração com utilização de micro-ondas

M_{CER} – Taxa de extração do soluto durante etapa CER

Mesh – Unidade de medição de abertura de peneiras

mg EAG/ g_e – Miligramas de equivalente em ácido gálico por grama de extrato

P – Pressão

P_C – Pressão crítica

PLE – Extração com líquido pressurizado

Q_T – Vazão total de solvente

R_{CER} – Rendimento de extração na etapa CER

- R_{total} – Rendimento total de extração (% g/g_a)
- $S_{(\text{EtOH})}/F$ – Razão de massa de etanol por massa de matéria-prima
- S/F – Razão de massa de solvente por massa de matéria-prima
- SAS – Precipitação por anti-solvente supercrítico
- SC-CO₂ – Dióxido de carbono supercrítico
- SC-CO₂/EtOH – Mistura solvente do CO₂ supercrítico e etanol
- SFE – Extração com fluido supercrítico
- T – Temperatura
- TBHQ – Antioxidante sintético (terc-butil-hidroquinona)
- T_C – Temperatura crítica
- t_{CER} – Tempo de conclusão da etapa na qual a taxa de extração é constante (CER)
- t_{FER} – Tempo de conclusão da etapa na qual a taxa de extração é decrescente (FER)
- TFT – Teor de fenólicos totais
- t_{mi} – Parâmetro de ajuste do modelo de Martínez (2003)
- UV – Ultravioletas
- UV-VIS – Região do espectro luminoso compreendida entre o ultravioleta e o visível
- x_k – Concentração do soluto de difícil acesso, segundo modelo de Sovová (1994)
- Y_{CER} – Relação da taxa de extrato e de solvente (solubilidade na etapa CER)
- π – Constante matemática (pi)

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

O alto índice de doenças de difícil tratamento, somado à crescente busca por melhores padrões de vida saudável, têm motivado a comunidade científica na busca de novas formulações de fármacos, novas tecnologias de fabricação de alimentos e drogas e ao desenvolvimento de novos hábitos. Também faz parte desse contexto o consumidor final que apresenta cada vez mais preocupações com a qualidade, funcionalidade, composição e segurança dos alimentos, fármacos e cosméticos.

Dessa forma, cresce o consumo de alimentos de origem orgânica e a utilização de extratos vegetais no processamento de fármacos em detrimento a substâncias sintéticas, por vezes associadas a malefícios à saúde. Chama a atenção, por exemplo, o combate ao excesso de radicais livres a partir da utilização de substâncias antioxidantes de origem orgânica (Atoui *et al.*, 2005). Evidências têm mostrado que o excesso dos radicais livres e outros oxidantes no corpo humano são responsáveis pelo envelhecimento e por diversas enfermidades como: câncer, doenças cardiovasculares, catarata, diminuição do sistema de defesa do organismo, disfunções cerebrais e osteoporose (Atoui *et al.*, 2005; Barreiros & David, 2006; Mokrani & Madani, 2016).

Boa parte dos radicais livres presentes no organismo é controlada pelos antioxidantes, sejam eles produzidos pelo próprio corpo ou absorvidos pela dieta alimentar. Dessa forma, os compostos fenólicos são as substâncias antioxidantes que tem despertado maior interesse no meio científico, já que inibem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (Sousa *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2017; Hamilton *et al.*, 2017) e são facilmente encontrados na dieta alimentar (Scalbert *et al.*, 2005). A medicina chinesa, por exemplo, tem utilizado diversas plantas e extratos naturais no tratamento de várias doenças (Lin *et al.*, 2012).

De forma geral, os compostos fenólicos podem ser encontrados nas sementes, frutas, flores, cascas e vegetais, na forma de fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, antraquinonas, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Naczki & Shahidi, 2004, Morelli & Prado, 2012). Dentro deste contexto, em determinadas espécies de plantas ocorre a presença natural de compostos bioativos como a emodina, o resveratrol e derivados do resveratrol que apresentam um alto valor medicinal (Kovářová *et al.*, 2011).

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) faz parte do conjunto dos compostos fenólicos, caracterizado como um polifenol da classe estilbeno, apresentando-se naturalmente nas suas formas *cis* e *trans*. O mesmo apresenta alta capacidade antioxidante, destacando-se

na capacidade anti-inflamatória, analgésica e de retardar ou até mesmo inibir doenças em animais (Baur *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017; Regitz *et al.*, 2016; Shi *et al.* 2016). Dentre essas doenças, podem ser destacadas as doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Bradamante *et al.*, 2004; Iqbal & Bamezai, 2012). O resveratrol também se destaca por aumentar a resistência ao estresse e por prolongar a expectativa de vida (Baur *et al.*, 2006; Lucas-Abellán *et al.*, 2011; Ayub *et al.*, 2015). O resveratrol é produzido naturalmente por diversos tipos de plantas, frutas e ervas medicinais, como: uvas, amendoim e *Polygonum cuspidatum* (Kerem *et al.*, 2006; Frémont, 2000; Santos, 2013a).

Pode-se afirmar que o resveratrol passou a ser mais estudado a partir do conhecido “paradoxo francês” na qual foi observado que a população francesa apresentava baixa incidência de doenças cardíacas mesmo com a alta incidência de tabagismo, de alcoolismo (principalmente vinho) e de alta ingestão calórica (Renaud & Lorgeril, 1992). Este paradoxo foi explicado por vários estudiosos através da alta ingestão de vinho tinto, rico em composto fenólicos, dentre estes o resveratrol e outros antioxidantes naturais (Lange *et al.*, 2007; Cooper *et al.*, 2004; Oliveira, 2010).

O resveratrol 3-O-β-D-glucoside (piceid) apresenta-se como um derivado glicosídeo do resveratrol com propriedades medicinais semelhantes ao resveratrol (Romero-Pérez *et al.*, 1999). Este recebeu tanta atenção quanto o resveratrol já que em muitas plantas e produtos relacionados ao resveratrol, a concentração do glicosídeo mostrou-se relevante (Wang *et al.*, 2011).

A emodina (1,6,8-trihidroxi-3-metilntraquinona) apresenta-se como o principal componente ativo em extratos de plantas medicinais utilizadas para tratamento médico em alguns países asiáticos. Lin *et al.* (2012) citam que testes demonstram o poder anti-inflamatório, anti-diabético, anti-viral e proteção cardiovascular da emodina.

Pesquisas brasileiras atestaram recentemente a presença de grande quantidade de resveratrol, piceid e emodina numa hortaliça popularmente conhecida como “azedinha”, de nome científico *Rumex Acetosa L.* (Souto, 2010). Essa herbácea perene (da família das *Poligonaceas*) pode ser encontrada em regiões de clima ameno e sua utilização, na cultura popular está associada ao tratamento contra infecções, escorbuto e hemorragias, ainda atua como laxante e diurético. De acordo com Souto (2010) apresenta quantidades consideráveis de compostos fenólicos em sua raiz.

Diversas são as técnicas utilizadas em processos de extração de polifenóis (Andreo & Jorge, 2006). No entanto, as técnicas convencionais que utilizam solventes orgânicos podem apresentar diversas desvantagens, como: alto consumo de solventes e/ou reagentes, grande

desperdício de material, alto risco de contaminação e degradação térmica, dispendioso processo de purificação do extrato e elevado tempo de operação (Benová *et al.*, 2010). Nesse contexto, novas tecnologias como a extração com líquido pressurizado (PLE), a extração com fluido supercrítico (SFE) e a extração com utilização de micro-ondas (MAE) tem sido avaliadas visando à obtenção de melhores resultados, tanto na esfera econômica, quanto na científica. (Cavalcanti, 2013).

No caso das extrações com líquido pressurizado (PLE), aplica-se pressão a determinados processos extrativos com o intuito de aumentar a eficiência e a rapidez do processo, tendo em vista a maior penetrabilidade na matriz sólida e a maior transferência de massa a partir do controle da temperatura (Machado, 2014). As elevadas pressões garantem que o solvente mantenha-se líquido durante todo o processo (Machado, 2014). Para os processos extrativos que utilizam raios micro-ondas, as perspectivas são bastante otimistas. Essa extração tem sido aplicada com sucesso na extração de antioxidantes a partir de produtos naturais e apresenta significativa rapidez e baixo consumo de solventes orgânicos, demonstrando-se como uma técnica ambientalmente amigável (Mazzutti, 2016).

A extração utilizando fluido supercrítico (SFE) desponta como uma técnica bastante promissora, que pode dirimir as limitações da extração tradicional. Esta técnica caracteriza-se pela utilização do solvente em temperatura e pressão acima dos seus valores críticos, podendo proporcionar diversas combinações das propriedades extrativas (Benová *et al.*, 2010; Casas, *et al.*, 2008; Brunner, 2010).

O CO₂ apresenta-se como uma das principais substâncias utilizadas em extrações que envolvem fluidos supercríticos, em função de suas atrativas propriedades. No entanto, quando se objetiva a obtenção de extratos com alto conteúdo de compostos polares de elevado peso molecular, é frequente a necessidade de adição de cossolventes com a finalidade de se modificar as propriedades físico-químicas do solvente extrator. Ao alterar-se a razão molar de um cossolvente na mistura, as propriedades da mistura solvente podem ser facilmente manipuladas, podendo aumentar significativamente a eficiência extrativa. Metanol, acetona, acetonitrila e, principalmente, o etanol, são amplamente utilizados como cossolvente (Lang & Wai, 2001; Modey *et al.*, 1996).

Existem diversos estudos utilizando a SFE em plantas e produtos naturais (Lang & Wai, 2001; Fariás-Campomanes *et al.*, 2013; Jesus, 2015). A extração supercrítica já foi aplicada para a extração de *trans*-resveratrol e demais fenólicos do extrato de *Japanese knotweed* (família *Poligonaceae*) (Benová *et al.*, 2010), além de ter sido aplicada como forma de isolamento de compostos fenólicos a partir da uva (Pascual-Martí *et al.*, 2001). No entanto,

mesmo com a comprovada presença de compostos fenólicos na raiz da *Rumex acetosa* (Souto, 2010), percebe-se uma ausência de dados acerca de SFE nessa matriz vegetal. Souto (2010) extraiu e isolou *trans*-resveratrol e a emodina em raízes da *Rumex acetosa* e da *Polygonum cuspidatum* utilizando a extração Soxhlet, a partir da utilização sequencial de solventes orgânicos (tolueno, hexano e éter dietílico) e obteve extratos com alto valor antioxidante e anti-inflamatório.

Apesar das vantagens apontadas, pode-se afirmar que não existem dados na literatura acerca do aumento de escala e estimativa com custos de produção para aplicações industriais para o caso das SFEs e PLEs a partir das raízes da *Rumex acetosa*. Dessa forma, fazem-se necessárias modelagens com estimativa de parâmetros para embasar esses processos de *scale-up* (Cavalcanti, 2013).

Diante do exposto, o presente trabalho visa avaliar o processo de extração de compostos bioativos da raiz da *Rumex acetosa* com a utilização de fluido pressurizado supercrítico (SFE) e de líquido pressurizado (extração sequencial e contínua), além do estudo cinético da extração e a comparação com técnicas de extração como Soxhlet, LPSE e micro-ondas. A modelagem matemática das curvas cinéticas de extração utilizando modelos reconhecidos na literatura também é objetivo desse trabalho.

O presente trabalho é disposto em capítulos, no qual, tem-se como Capítulo 1 a apresentação da introdução, abordando considerações iniciais sobre o tema abordado e delimita os objetivos do trabalho. Esse visa introduzir o leitor na temática da extração e consequente utilização dos compostos fenólicos em aplicações medicinais, bem como apresenta diversas técnicas para tal fim.

O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica acerca de todos os aspectos que envolvem o presente trabalho. Nesse capítulo são abordadas as características da *Rumex acetosa*, juntamente com os diversos tipos de compostos fenólicos, as extrações convencionais, as extrações com fluidos sub e supercríticos e a com utilização de micro-ondas. Também são apresentados os modelos para extração com fluidos supercríticos nesse capítulo.

No Capítulo 3 estão descritas todas as metodologias utilizadas em cada etapa do trabalho, como: preparação da matéria-prima, o detalhamento da extração supercrítica (SFE) e demais extrações realizadas (PLE, MAE e convencionais), os métodos aplicados para a avaliação da solubilidade e estudo das curvas cinéticas em SFEs, a descrição das análises de composição, atividade antioxidante e teor de fenólicos por HPLC e por espectrofotometria,

respectivamente, e a metodologia do emprego de modelos para SFE no ajuste de curvas cinéticas de extração dos respectivos extratos.

O Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos e suas discussões sobre os efeitos da pressão, temperatura, vazão total de solvente e concentração de cossolvente em SFEs. Também apresenta e discute os resultados sobre as extrações com utilização de micro-ondas, com líquidos pressurizados utilizando diversos solventes, de forma individual e sequencial, apresenta toda a discussão acerca da composição dos extratos obtidos pelas diferentes técnicas utilizadas, bem como suas respectivas atividades antioxidantes e teor de fenólicos. Também apresenta e discute os resultados da aplicação de diversos modelos matemáticos consolidados na literatura para extração com fluidos pressurizados e supercríticos.

No Capítulo 5 são apresentadas as conclusões gerais acerca de todos os aspectos abordados no trabalho. Por fim, os Capítulos 6 e 7 apresentam, respectivamente, as referências bibliográficas utilizadas como fundamento para o desenvolvimento e escrita do trabalho e os anexos necessários para o bom entendimento do trabalho.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo, será apresentada uma breve revisão bibliográfica acerca dos temas pertinentes ao trabalho realizado.

2.1 – *Rumex acetosa*

Herbácea pertencente à família *Polygonaceae* e cultivada em regiões de clima ameno como, por exemplo, a região compreendida entre Rio Grande do Sul e Minas Gerais. Popularmente, é conhecida por “azedinha” (Figura 2.1) e sua cultura é pouco conhecida nos grandes centros, no entanto é muito comum em hortas familiares do interior (Franzener *et al.*, 2013). Não se sabe ao certo a sua origem, no entanto pode ser encontrada em regiões da Europa e da Ásia. O consumo de suas folhas pode ser *in natura* ou cozidas, embora apresente alto teor de sais de cálcio, limitando seu consumo por quem apresenta problemas renais (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2010).



Figura 2.1 – *Rumex acetosa* (“Azedinha”). Disponível em: <<http://www.pfaf.org/user/Default.aspx>>. Acesso em: 30 de nov. 2017.

O cultivo dessa planta pode ser realizado o ano inteiro, em regiões tropicais e de clima ameno. Geralmente o seu plantio é realizado entre os meses de março e julho. Chega a produzir cerca de 2 a 3 maços (100g cada) por semana por m² e a partir do segundo mês cerca de 6 maços. Assim, obtém-se produtividade de 4 kg/m² ou o equivalente a 40 ton/ha,

lembrando que normalmente a azedinha é plantada em pequenas hortas (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2010).

Em sua constituição bioquímica, a mesma apresenta oxalatos, taninos, derivados do antraceno, quinoides, flavonoides e fenilpropanóides (Kemper, 1999). Existem aplicações medicinais relacionadas ao teor de fenólicos presente no combate ao tratamento de diarreia, infecções virais, Herpes, Influenza vírus, irritações na pele e no tratamento de infecções agudas e crônicas do sistema respiratório superior (Bicker *et al.*, 2009; Schmuch *et al.*, 2015).

No entanto, basicamente, todas essas aplicações são referentes às partes aéreas da *Rumex acetosa* L (Schmuch *et al.*, 2015) e pouco se sabe sobre as aplicações medicinais e nutricionais dos extratos oriundos de sua raiz (Franzener *et al.*, 2013; Souto, 2010; Santos (2013a). Quanto ao processo extrativo, existem poucos trabalhos na literatura, basicamente percebem-se apenas estudos na área de ecologia (Franzener *et al.*, 2013). Salvo os estudos realizados por Souto (2010) e Santos (2013a) que realizaram estudos utilizando processos extrativos na raiz da mesma.

2.2 – Antioxidantes

O estudo dos processos oxidativos é de suma importância para a saúde humana, tendo em vista a alta capacidade de reação do oxigênio com a maioria das substâncias orgânicas. Pode-se definir um antioxidante como uma substância capaz de diminuir ou prevenir a oxidação de um substrato, quando presente em menor concentração que este. (Cavalcanti, 2013; Oldoni, 2010). Quanto ao mecanismo de atuação, basicamente, os antioxidantes reagem com o radicais livres, formando um novo radical estável (Cavalcanti, 2013).

Os radicais livres são moléculas ou fragmento de moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados, portanto são compostos bastante instáveis e com alta reatividade. Esta valência livre é responsável por tornar a molécula extremamente reativa e paramagnética (Wojtowicz *et al.*, 2017). Os radicais livres do oxigênio (radical superóxido O_2^- e o radical hidroxila OH) exercem papel fundamental nas reações fisiológicas/bioquímicas do corpo humano, no entanto quando acontece uma produção excessiva destes radicais durante processos patofisiológicos ou fatores adversos, e culminando com a não existência de antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer grandes danos nos tecidos e células humanas, como por exemplo: o desenvolvimento de células cancerígenas e/ou o aceleração do envelhecimento (Oliveira, 2010).

O processo de formação dos radicais livres envolve, em parte, os mecanismos de oxidação de lipídios como, por exemplo, a peroxidação lipídica. Essa peroxidação acontece quando um lipídio sofre alteração de sua estrutura molecular por ter sido atacado por um oxigênio, podendo gerar problemas na conservação de alimentos ricos nesses compostos (Santos, 2013b). O mecanismo básico desse processo pode ser dividido em 3 etapas: iniciação, propagação e terminação, conforme Figura 2.2 (Santos, 2013b).

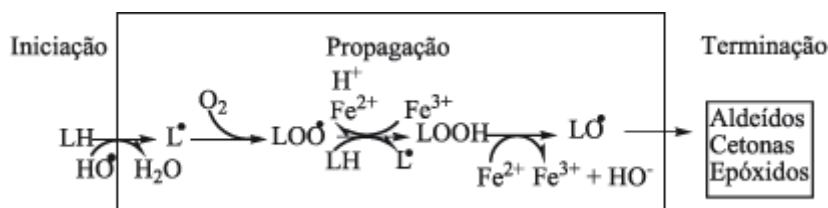


Figura 2.2 – Representação das fases da peroxidação lipídica. Fonte: Santos *et al.*, 2007

Na etapa inicial, existe a perda de um hidrogênio do lipídio insaturado (LH) mediante a ação de luz, calor e presença de metais. O radical lipídico (L^\bullet) formado é instável e apresenta elétrons desemparelhados (Santos, 2013b). Na propagação, existe a formação de radicais peróxidos lipídicos (LOO^\bullet) que podem reagir novamente com o lipídio insaturado, formando mais radicais livres (L^\bullet e LO^\bullet). Esses radicais podem promover reações secundárias a partir da formação de aldeídos, cetonas e epóxidos responsáveis pela rancidez dos alimentos e doenças (Santos, 2013b). Dessa forma, os antioxidantes também podem ser definidos como qualquer composto capaz de inibir esse processo de peroxidação lipídica (Santos, 2013b).

Partindo desse ponto de vista, os antioxidantes podem ser considerados como a primeira defesa do organismo, visto a sua capacidade de doar elétrons, funcionando como verdadeiros “sequestradores” de radicais livres, agindo em diversas fases no processo oxidativo, inibindo ou retardando a oxidação de outras moléculas, ou a propagação de reações oxidativas em cadeia (Oliveira, 2010; Oldoni, 2010).

Os antioxidantes podem ser divididos quanto a sua atuação em processos oxidativos (primários e secundários) e quanto a sua origem (sintéticos e naturais). Os primários são capazes de interromper a cadeia de radicais através da doação de um elétron a um radical lipídico livre, assumindo a condição estável. Estão incluídos nesse grupo os compostos fenólicos, que apresentam grupos doadores nas posições orto e para de sua cadeia cíclica. Os antioxidantes secundários reduzem o processo inicial de formação do radical livre, utilizando agentes quelantes de metais, tendo como exemplo o ácido cítrico (Oliveira, 2010; Oldoni, 2010).

Os sintéticos são produzidos industrialmente e amplamente aplicados na indústria alimentícia com o intuito de aumentar o tempo de vida útil dos produtos (Cavalcanti, 2013; Barreiros & David, 2006). Apresentam na sua cadeia uma estrutura fenólica com diferentes graus de substituição do radical alquila, no entanto, a sua utilização está sendo associado a diversos malefícios a saúde (Svilaas *et al.*, 2004; Cavalcanti, 2013). Essa associação tem aumentado a procura por antioxidantes de origem natural, como por exemplo: compostos fenólicos, carotenóides ou compostos nitrogenados, como a vitamina C e E (Oliveira, 2010; Cavalcanti, 2013).

Existem regulamentações em diversos lugares do mundo que limitam a utilização dos antioxidantes sintéticos como: BHA, BHT e TBHQ, enquanto que os antioxidantes naturais são considerados seguros, requisitando poucos testes de segurança. Esses compostos encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal e fazem parte da dieta alimentar de forma significativa (Santos, 2013b). Em alguns casos, podem até serem consumidos com o intuito profilático (Paes, 2016).

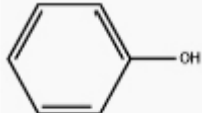

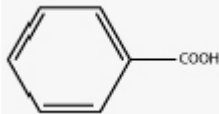
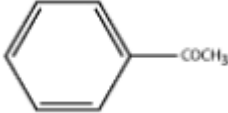
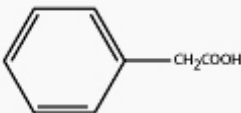
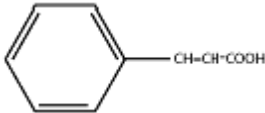
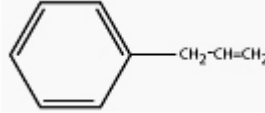
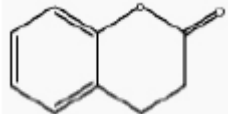
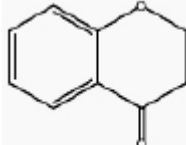
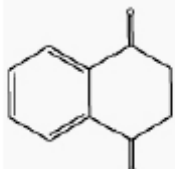
2.2.1 – Compostos fenólicos

De forma geral, as plantas sintetizam uma infinidade de compostos responsáveis pela manutenção de seu metabolismo e sua reprodução. Dentre esses, existem diversos fitoquímicos, responsáveis pelo metabolismo secundário das mesmas. Os compostos fenólicos fazem parte desse grande grupo dos fitoquímicos, responsáveis pelo seu crescimento, reprodução e defesa (infecções, radiações UV, ferimentos e agressões externas). Muitos desses compostos são fenólicos, envolvem desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (Oliveira, 2010; Oldoni, 2010).

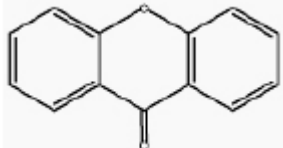
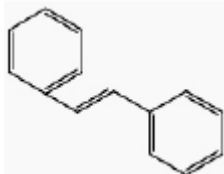
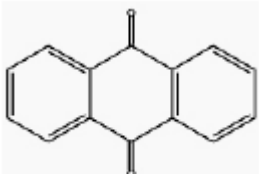
Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos: flavonoides e não flavonoides (demais compostos fenólicos) (Paes, 2016). No entanto, existem classificações mais específicas (ponto de vista molecular) como: ácidos fenólicos (cinâmico e derivados ácidos benzoico), fenóis simples, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e lignina (Naczek & Shahidi, 2004).

A Tabela 2.1 apresenta os principais compostos fenólicos encontrados em plantas (Salvador, 2011).

Tabela 2.1 – Principais classes de compostos fenólicos. Fonte: Salvador, 2011

<i>Classe</i>	<i>Esqueleto Carbônico</i>	<i>Estrutura Básica</i>
Fenólicos Simples	C_6	
Benzoquinonas	C_6	
Ácidos Fenólicos	$C_6 - C_1$	
Acetofenonas	$C_6 - C_2$	
Ácidos fenilacéticos	$C_6 - C_2$	
Ácidos hidroxicinâmicos	$C_6 - C_3$	
Fenilpropanona	$C_6 - C_3$	
Cumarinas, isoumarinas	$C_6 - C_3$	
Cromonas	$C_6 - C_3$	
Naftoquinonas	$C_6 - C_4$	

(Continuação da Tabela 2.1)

Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$	
Estilbenos	$C_6 - C_2 - C_6$	
Antraquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$	
Flavonoides	$C_6 - C_3 - C_6$	
Lignananas, neolignananas	$(C_6 - C_3)_2$	
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$	

2.2.1.1 – Flavonoides

Os flavonoides representam o maior grupo de compostos fenólicos presentes em plantas e alimentos. São oriundos do metabolismo secundário das plantas e quando ingeridos podem apresentar diversas atividades biológicas benéficas à saúde (Paes, 2016).

Apresentam grande diversidade de estrutura, são responsáveis pelas cores dos frutos e das flores e são constituídos pelo núcleo flavano (15 átomos de carbono) como estrutura básica (Oldoni, 2010). As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e vermelho que aparecem em frutos, flores, folhas, caules e raízes. Dessa forma, pode-se afirmar que as antocianinas são os flavonoides mais largamente distribuídos presentes na natureza. (Oliveira, 2010).

2.2.1.2 – Estilbenos

Grande parte dos estilbenos naturais possuem ligações duplas conjugadas e são derivados da unidade básica *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno). Pertencentes ao grupo dos fenilpropanóides, os estilbenos apresentam forte atividade antioxidante, com alta possibilidade de aplicação medicinal (Chong *et al.*, 2009). Os estilbenos mais conhecidos são:

trans e cis-resveratrol e trans e cis-piceid, no entanto os compostos isolados nos extratos de plantas são em sua maioria na forma *trans* (Santana, 2011).

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) apresenta dois anéis aromáticos unidos por uma espécie de "ponte eteno" (Rabesiaka *et al*, 2011). Encontra-se presente em grande quantidade na casca de diversos tipos de uvas (Pandey & Rizvi, 2010); produzida naturalmente por várias plantas como: amendoim, eucalipto, amoras, framboesas, pinheiro, membros da família polygonaceae, entre outras (Rabesiaka *et al*, 2011; Sautter *et al*, 2005; Kerem *et al.*, 2006).

A Figura 2.3 apresenta o resveratrol sob a forma de seus dois isômeros: o *trans*-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), (I) e (II) respectivamente.

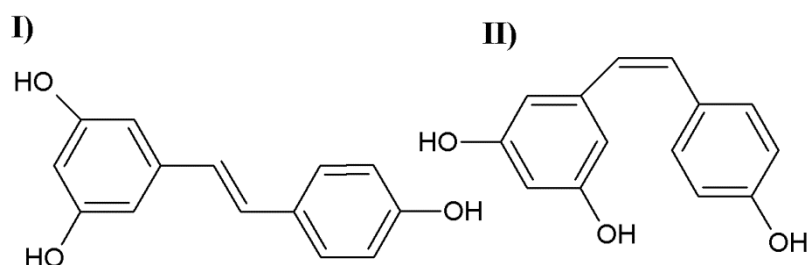


Figura 2.3 – Fórmula estrutural dos isômeros *trans*-resveratrol (I) e *cis*-resveratrol (II). Fonte: Autoria própria (2017)

O *trans*-resveratrol é fotossensível, ou seja, pode ser convertido para a sua forma cis na presença de luz visível. Este apresenta propriedades terapêuticas como: anticâncer, antiviral, anti-inflamatório, neuroprotetor, entre outros (Lee *et al*, 2009; Han *et al*, 2009; Docherty *et al*, 2005).

O resveratrol 3-O- β -D-glicosídeo (piceid), como o nome sugere, apresenta-se como um derivado glicosídeo do resveratrol. É amplamente encontrado nas raízes da *Polygonum cuspidatum*, em vinhos (principalmente o tinto) e sucos de uva (Lamuela-Raventós *et al.*, 1999). A Figura 2.4 apresenta os isômeros do piceid.

2.3 – Métodos de extração

Os métodos de extração são de importância vital nos estudos de composição e qualidade dos extratos. No entanto, também é importante a escolha do solvente a ser utilizado. Nesse contexto, o estudo detalhado da afinidade química, polaridade, solubilidade de cada solvente e/ou cossolvente adquire extrema relevância nesse processo (Oliveira, 2010).

2.3.1 – Extrações convencionais (Soxhlet e LPSE)

A extração Soxhlet, basicamente é utilizada em escala de laboratorial, principalmente em extrações de matrizes sólidas, como é o caso das extrações de substâncias em plantas no geral. É um técnica de extração antiga, mas que permanece como referência com a qual os novos métodos são comparados (Freitas, 2007).

A extração Soxhlet acontece por batelada, no entanto, o solvente é sempre recuperado e posto em contato com a amostra continuamente. Primeiramente, as plantas são imersas no solvente, em seguida existe um equipamento que fornece calor para o sistema até que a solução atinja o ponto de ebulição a uma pressão reduzida (também pode acontecer à pressão atmosférica). O solvente extrai o material orgânico presente na mistura de acordo com a sua afinidade e polaridade. No entanto, o extrato é separado do solvente que é evaporado e novamente posto em contato com a matriz sólida (Galvão, 2009).

Esse processo pode apresentar altos rendimentos extrativos, já que existe uma renovação do solvente em contato com a matéria prima (processo interno cíclico de evaporação e condensação do solvente) e ocorre em temperaturas relativamente altas (Santos, 2013a). No entanto, um dos problemas desse tipo de extração reside na última etapa do processo, em que o solvente precisa ser separado do soluto, requerendo para isso grande quantidade de energia e/ou temperatura (Santos, 2013a).

Mesmo com a evaporação dos solventes, podem restar resíduos do mesmo, inviabilizando alguns processos para indústria de fármacos. Outra desvantagem associada poderia ser a alteração das características químicas e físicas das substâncias presentes na matéria-prima devido às temperaturas relativamente altas (Santos, 2013a).

A extração LPSE (Extração a Baixa Pressão) também é utilizada, de forma geral, em escala de laboratório e pequenos projetos. Inicialmente, a matriz sólida entra em contato com o solvente, sofrendo o processo de solubilização a pressões e temperaturas reduzidas sob agitação, já que o mesmo não utiliza a temperatura de ebulição do líquido e sim baixas temperaturas controladas. Dessa forma, as variáveis mais importantes dessa técnica são a

razão de massa de solvente por massa de matéria-prima (S/F), a temperatura, a agitação e o tempo de extração. O extrato também é separado a partir da evaporação do extrato (Moura *et al.*, 2012).

2.3.2 – Extração supercrítica

De forma geral, a extração supercrítica pode ser resumida como o emprego de fluidos supercríticos com o intuito de extrair analitos de uma matriz sólida. Essa técnica extrativa utiliza, durante o processo extrativo, fluidos a temperaturas e pressões acima de seus respectivos valores críticos. Nesse processo, ocorre transferência de massa da matriz sólida para o fluido ou mistura de fluidos na região crítica. A temperatura crítica do gás, como exemplificado com o gás carbônico (Figura 2.6), é a temperatura mínima na qual os processos com elevação de pressão não conseguem liquefazer o gás (Freitas, 2007).

Na região crítica do gás ou das misturas de fluidos (Figura 2.6) as forças de solubilização são mais intensas, comparando-se a um gás convencional (Freitas, 2007). Dessa forma, cresce o número de estudos que utilizam essa tecnologia na extração de compostos ativos de plantas (Oliveira, 2010).

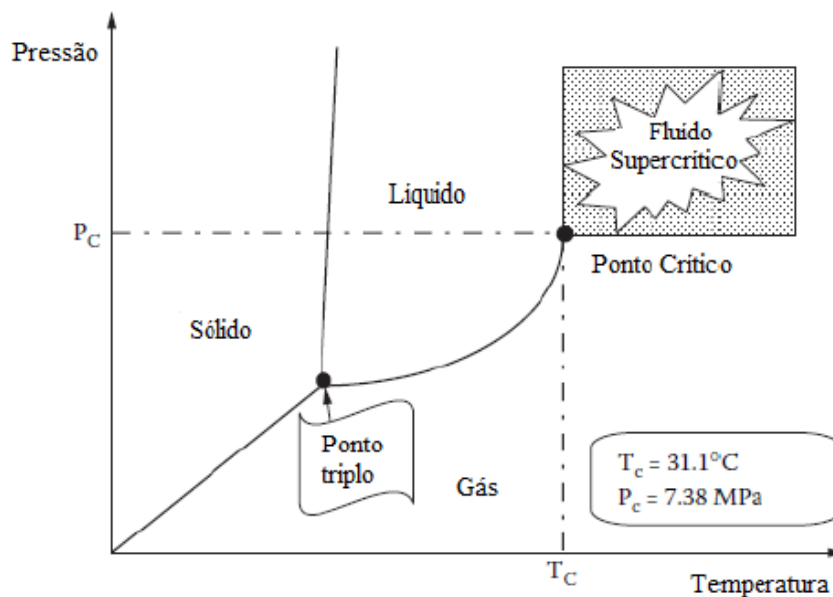


Figura 2.6 – Representação do diagrama de fases do CO₂ puro. Fonte: Campomanes, 2012

Devido as suas características, em diversos casos, a SFE (extração com fluido supercrítico) apresenta extratos com melhor qualidade, que sofreram menos degradação pela temperatura e pela presença de luz, já que as condições de operação são brandas e o processo de extração acontece na ausência de luz, evitando as reações de oxidação dos elementos

fotossensíveis, constituindo grande vantagem para a extração de antioxidantes, haja vista suas propriedades biológicas. (Oliveira, 2010).

Tendo em vista as dificuldades de operação (altas pressões e temperaturas), o uso de fluidos supercríticos era bastante limitado anteriormente. No entanto, a cerca de 3 décadas, percebe-se um contínuo crescimento dessa tecnologia, especialmente nas áreas de extração de óleos essenciais, na extração de compostos bioativos a partir de plantas medicinais, na indústria do café, entre outros (Brunner, 2005; Brunner, 2010).

No processo de extração supercrítica (SFE), o fluido supercrítico (fase solvente) escoia através de um leito fixo formado pela matriz sólida (raízes de planta, folhas, entre outros) solubilizando os solutos presentes nesta matriz. À medida que esse fluido desloca-se ao longo do leito fixo, o processo de transferência de massa ocorre e, conseqüentemente, o esgotamento da matéria-prima acontece na mesma direção do aumento da concentração de extrato na fase solvente (Paes, 2016). O processo extrativo é facilitado por algumas características próprias dos fluidos em seu estado supercrítico como o seu alto valor de difusividade, sua alta densidade e sua baixa viscosidade (Brunner, 2005).

Santos (2013a) obteve extratos ricos em compostos fenólicos a partir da raiz da *Rumex acetosa* utilizando gás carbônico supercrítico com etanol. As extrações foram realizadas nas temperaturas de 50 °C, 70 °C e 90 °C e a pressões de 15, 20 e 25 MPa. No entanto, o autor não conseguiu identificar todos os compostos extraídos, mas apenas o *trans*-resveratrol. O autor ainda concluiu que a utilização de etanol como cossolvente demonstrou ser imprescindível para a extração de boa parte dos compostos fenólicos presentes na raiz da planta.

Existem diversos trabalhos mostrando que a extração supercrítica com adição de cossolvente, geralmente etanol, desponta como a técnica mais adequada para a recuperação de compostos fenólicos. Campomanes (2012) extraiu compostos fenólicos do pisco (bagaço da uva e borra) utilizando extração supercrítica, alcançando valores de rendimento da ordem de 5% para o bagaço da uva e de 10% para a borra, sendo a condição mais favorável a que utilizou 20 MPa e 40 °C.

Santos *et al.* (2017) mostraram que a SFE aplicada em raízes da *Rumex acetosa* demonstrou ser mais seletiva que as extrações convencionais para importantes compostos fenólicos como emodina e *trans*-resveratrol.

A extração supercrítica também mostra-se flexível para adequações de projeto e acoplamento em linha com outros tipos de extração, como mostrado por Viganó *et al.* (2017). Os autores fazem a avaliação econômica e de sensibilidade da aplicação da SFE juntamente

com a técnica de extração de líquidos pressurizados (PLE) perante o bagaço de maracujá e obtém resultados promissores, considerando o preço atual do mercado.

2.3.2.1 – Fluidos supercríticos

Na natureza, os compostos puros apresentam-se em três estados físicos distintos e bem definidos (sólido, líquido e gasoso), onde grandezas termodinâmicas como: pressão, temperatura e volume determinam esses estados. No entanto, quando estas substâncias são submetidas à altíssimas temperaturas e pressões, estas apresentam características próprias que poderiam definir um “quarto estado físico da matéria” (fluido supercrítico). Na verdade, não se trata, precisamente, de um “quarto estado”, mas sim de um estado intermediário entre o líquido e o gasoso (Santos, 2013a).

Um fluido supercrítico é definido por Smith *et al.* (2007) como a substância que se encontra a uma pressão e temperatura acima de suas respectivas condições críticas. Por exemplo, para o caso do dióxido de carbono, sua temperatura e pressão críticas são 31,1 °C e 73,8 bar, respectivamente.

O processo de extração supercrítica é baseado principalmente na solubilização do soluto de interesse em solventes no estado supercrítico. Assim, a solubilidade do produto desejado em solventes supercríticos é um dado de fundamental importância para a escolha do solvente, determinação dos rendimentos, dimensionamento e otimização do processo de extração. Os fluidos utilizados na extração supercrítica devem apresentar alguns requisitos como: boa solubilidade no soluto a ser extraído, ser inerte, ser de fácil separação do produto e ter baixo custo (Brunner, 1994).

Segundo Jesus (2015), além das vantagens inerentes ao processo tais como a redução do tempo de extração e diminuição ou isenção de solventes no produto final, a extração com fluidos supercríticos demonstrou ser altamente seletiva na extração de compostos diferenciados, como carotenoides por exemplo.

Uma inspeção na literatura revela que é relativamente abundante a variedade de compostos que podem ser usados como fluidos supercríticos. Na Tabela 2.2 são apresentados alguns fluidos que podem ser utilizados, juntamente com os parâmetros de pressão crítica (P_c), temperatura crítica (T_c) e densidade crítica (D_c).

Tabela 2.2 – Solventes utilizados na extração com fluidos pressurizados. Fonte: Freitas, 2007

<i>Substância</i>	<i>T_c</i> (°C)	<i>P_c</i> (atm)	<i>D_c</i> (g/cm ³)
CO ₂	31	72,85	0,469
NH ₃	133	111,54	0,236
Água	374	217,17	0,326
N ₂ O	36	71,5	0,452
Metano	-82	45,41	0,169
Etano	32	48,17	0,203
Propano	97	41,85	0,217
Pentano	197	33,26	0,237
Etileno	9	49,65	0,218
Tolueno	319	40,57	0,292
Metanol	240	79,86	0,272
Etanol	241	60,61	0,276
Acetona	235	46,39	0,279
Éter Etilico	194	35,93	0,265

De todos os fluidos possíveis utilizados na extração supercrítica, o dióxido de carbono é o mais utilizado devido a algumas vantagens que fazem do mesmo o solvente mais pesquisado no que concerne à extração supercrítica, como: condições críticas amenas (31,1°C e 72,85 bar), diminuindo, assim, custos com compressão, facilita a separação após a extração, alta volatilidade e difusividade e baixa viscosidade, facilitando a penetração em matrizes sólidas. Ainda podem ser mencionadas sua grande disponibilidade, sua atoxicidade e baixa reatividade (Brunner, 1994).

Outros gases que também apresentam, em seu estado supercrítico, interessantes propriedades solventes são utilizados para a extração de plantas e outros materiais. Entretanto, por razões de custo, perigo de explosão, toxicidade, inflamabilidade e propriedades físicas adversas, poucos deles são usados comercialmente (Freitas, 2007).

2.3.2.2 – Propriedades físico-químicas dos gases comprimidos

As características apresentadas pelos fluidos na região supercrítica devem-se, basicamente, às propriedades físico-químicas desses serem intermediárias entre as dos gases e

líquidos. Conforme se pode observar na Tabela 2.3, os fluidos supercríticos apresentam altos valores de difusividade, quando comparados aos líquidos, aumentando o poder de penetração em matriz sólida. Também apresentam altas densidades e baixas viscosidades quando comparados com gases e líquidos respectivamente, conferindo ao mesmo boas propriedades de solvatação (Brunner, 2005).

Tabela 2.3 – Propriedades físico-químicas de uma substância genérica. Fonte: Brunner, 2005

<i>Estado do fluido</i>	<i>Densidade</i> (g/cm ³)	<i>Difusividade</i> (cm ² /s)	<i>Viscosidade</i> (g/cm.s)
<i>Gás</i> P=1 atm, T=15-30 °C	(0,6–2,0).10 ⁻³	0,1–0,4	(0,6–2,0). 10 ⁻⁴
<i>Líquido</i> P=1 atm, T=15-30 °C	0,6–1,6	(0,2–2,0). 10 ⁻⁵	(0,2–3,0). 10 ⁻²
<i>Fluido Supercrítico</i>			
P = Pc; T ≈ Tc	0,2–0,5	0,7. 10 ⁻³	(1–3). 10 ⁻⁴
P = 4Pc; T ≈ Tc	0,4–0,9	0,2. 10 ⁻³	(3–9). 10 ⁻⁴

Para a avaliação dos processos extrativos, que envolvem transferência de massa, é de suma importância o conhecimento do coeficiente de difusão, da viscosidade e da densidade, bem como o conhecimento da seletividade do solvente e o seu poder de solvatação no soluto avaliado. As alterações de pressão e temperatura podem ocasionar mudanças acentuadas nessas variáveis (Brunner, 2005).

2.3.2.3 – Utilização de cossolventes

Como o CO₂ é um gás predominantemente apolar, devido a sua geometria molecular, em determinadas extrações de compostos polares faz-se necessária a adição de cossolventes. Esses, geralmente, são líquidos à temperatura ambiente e são responsáveis por alterar as propriedades de solvatação do fluido supercrítico (Galvão, 2009).

No caso da solubilidade dos compostos fenólicos, a utilização de cossolventes contribui significativamente para o aumento do rendimento extrativo desses compostos, principalmente devido à formação de polaridades moderadas a partir da mistura de solventes polares e apolares (Mokrani & Madani, 2016). Esse comportamento pode ser explicado pelo princípio do "like dissolves like" ou ainda "polarity versus polarity" (Mokrani & Madani, 2016), na

qual os solutos polares tendem a serem solubilizados em solventes polares e os solutos apolares em solventes apolares. Dessa forma, as interações entre a mistura de solventes e o soluto são formadas a partir das forças intermoleculares presentes, responsáveis pela maior ou menor solubilidade do soluto na mistura solvente, variando de acordo com a polaridade média da mistura solvente e a polaridade dos solutos (Galvão, 2009; Santos, 2013a).

Diversos trabalhos na literatura relatam a adição de cossolventes como, por exemplo, Santos (2013a) que relata a importância fundamental da adição de etanol em processos de extração de compostos fenólicos utilizando fluidos supercríticos a partir da raiz da *Rumex Acetosa L.* Sharif *et al.* (2015) atestaram o aumento da eficiência na extração de compostos antioxidantes da *Pereskia bleo* a partir da adição de cossolventes.

Benová *et al.* (2010) avaliaram os rendimentos de extração supercrítica (pressão: 40 MPa, temperatura: 100 °C, tempo: 30min.) do *trans*-resveratrol, piceid e emodina das raízes da *Japanese knotweed* utilizando os cossolventes: etanol, acetonitrila e metanol. Neste estudo, a acetonitrila demonstrou ser o melhor cossolvente nas condições de operação acima descritas, já que conseguiu um rendimento maior de extração das substâncias descritas acima.

Casas *et al.* (2010) realizaram extrações supercríticas em uvas *Palomino fino*. O objetivo do trabalho foi a extração do *trans*-resveratrol presente nas uvas e a consequente avaliação das condições ótimas de extração. Os melhores resultados do trabalho foram os experimentos realizados em alta pressão e baixa temperatura utilizando 5% de etanol (v/v) como um cossolvente. A utilização do cossolvente demonstrou ser muito importante no aumento do rendimento de extração.

Paula *et al.* (2013) utilizou a SFE na extração de compostos fenólicos a partir da *Arrabidaea chica*, chegando a conclusão de que as maiores concentrações de composto fenólicos extraídos foram obtidos quando se utilizou etanol como cossolvente na SFE. Esse comportamento foi explicado pelos autores a partir da mudança de polaridade ocasionada no solvente a partir da adição do etanol.

2.3.2.4 – Curva cinética de extração

De forma básica, pode-se resumir o conceito da curva cinética de extração como o gráfico da massa acumulada de extrato seco *versus* tempo de extração ou massa de solvente acumulado. Esse gráfico (Figura 2.7) apresenta todas as etapas de um processo de extração supercrítica.

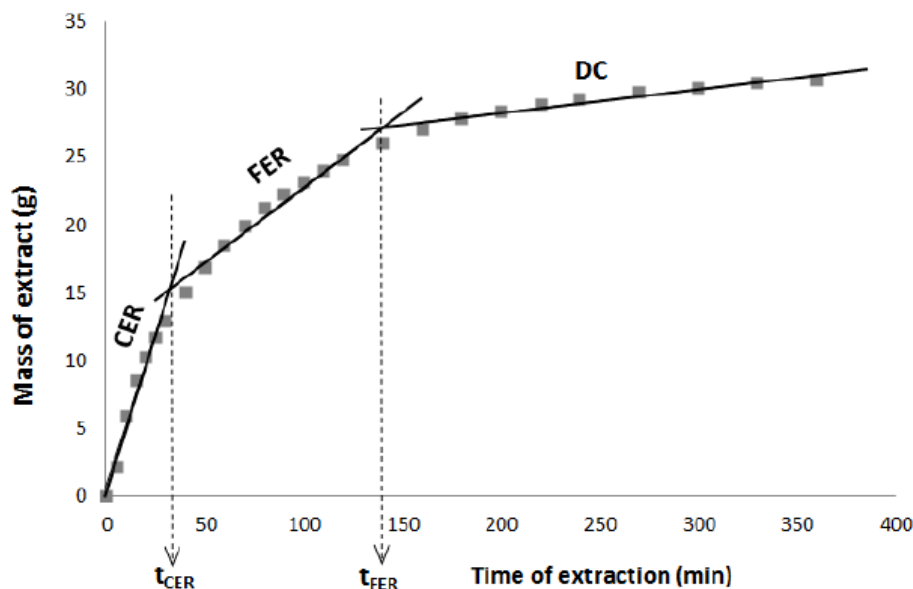


Figura 2.7 – Exemplo de curva cinética de extração, sendo: CER a etapa da taxa constante de extração, FER a etapa com taxa decrescente e DC etapa difusional). Fonte: Jesus, 2015

O formato dessa curva sofre influência direta dos parâmetros envolvidos no processo extrativo, tendo em vista os fenômenos presentes na extração supercrítica. Geralmente, estas curvas são utilizadas no fornecimento de informações importantes para a definição de parâmetros dos processos extrativos como: volume do extrator, vazão de solvente, solubilidade e constantes de transferência de massa, parâmetros utilizados tanto no dimensionamento em escala laboratorial quanto no *scale-up* desses processos (Farias-Campomanes *et al.*, 2013; Santos, 2012; Jesus *et al.*, 2013).

Conforme observado na Figura 2.7, a curva cinética de extração pode ser dividida nas etapas CER, FER e DC (Martínez, 2005).

Na etapa de taxa constante de extração CER (Taxa de extração constante) o mecanismo de transferência de massa dominante é a convecção (fase fluida). É caracterizada pela disponibilidade de extrato na interface sólido/fluido (superfície externa das partículas), no entanto o valor máximo da concentração do extrato no solvente supercrítico é dada pela solubilidade de equilíbrio, podendo corresponder à cerca de 50% do rendimento de extração (Oliveira, 2010, Santos, 2012).

A etapa FER (Taxa decrescente de extração) apresenta-se como a segunda etapa do processo extrativo na qual a taxa de extração é decrescente, já que existe o efeito convectivo na fase fluida somado com o efeito difusional na fase sólida, ocasionando, desta forma, o aumento da resistência à transferência de massa. Este efeito difusional da fase sólida acontece devido, principalmente, ao esgotamento do extrato em sua superfície, sendo a quantidade de

extrato no solvente supercrítico menor que a concentração de equilíbrio. Geralmente, até o fim desta etapa, a extração atinge mais de 70 % do rendimento total de extração (Oliveira, 2010).

Por fim, a terceira e última etapa, definida como etapa difusional (DC) ou etapa de extração nula, apresenta como principal efeito de resistência à transferência de massa o fenômeno difusivo no interior das partículas. Dessa forma, a resistência à transferência de massa é bastante alta, ocasionando esse comportamento (Campomanes, 2012; Oliveira, 2010).

As curvas cinéticas de extração são amplamente utilizadas na caracterização do processo extrativo e dos parâmetros cinéticos de extração e na determinação da solubilidade do soluto no fluido supercrítico, de forma dinâmica. Todos os possíveis processos de ampliação de escala, modelagem e confecção de projetos precisam levar em consideração esses gráficos (Farias-Campomanes *et al.*, 2013).

2.3.3 – Extração por líquido pressurizado (PLE)

A extração utilizando líquido pressurizado também pode ser conhecida como extração por fluido pressurizado, extração por fluido acelerado, extração por solvente em altas pressões, entre outros (Nieto *et al.*, 2010). Pode-se afirmar que a PLE utiliza altas pressões e temperaturas, no entanto ambas não podem atingir as condições críticas de P_C e T_C (Nieto *et al.*, 2010). Dessa forma, mesmo trabalhando em regiões acima da temperatura de ebulição, o líquido não apresenta mudança de fase, tendo em vista as altas pressões.

Com a elevação da temperatura, geralmente ocorre um aumento na solubilização dos solutos e conseqüente aumento na transferência de massa e diminuição da viscosidade e tensão superficial, conseqüentemente aumentando a eficiência extrativa (Nieto *et al.*, 2010).

Diversos são os trabalhos que utilizam essa técnica como processo extrativo de compostos fenólicos (Oliveira, 2014). Cavalcanti (2013) percebeu que a extração PLE demonstrou bastante eficácia na extração de compostos, principalmente das antocianinas. Utilizando líquido pressurizado, Rodríguez-Pérez *et al.* (2016) extraíram compostos fenólicos presentes na folha da *Moringa oleífera*, alcançando rendimentos da ordem de 56%, EC_{50} da ordem de 21 $\mu\text{g/mL}$ e teor de fenólicos de 59 mg EAG/g utilizando etanol em condições otimizadas.

Wang *et al.* (2012) utilizaram etanol pressurizado a 1500 psi e 120°C na extração de compostos bioativos a partir da *Cynanchum bungei* utilizando planejamento experimental e alcançando rendimentos superiores ao da extração Soxhlet.

No meio científico também existem trabalhos que utilizaram vários solventes na extração com líquido pressurizado. Basicamente, de forma sequenciada, cada solvente participa do processo extrativo gerando extratos com composições distintas. A partir dessa técnica de extração sequencial com líquidos pressurizados é possível o fracionamento dos compostos presentes em determinadas matrizes sólidas (Poerschmann *et al.*, 2006).

Machado (2014) extraiu compostos fenólicos do bagaço da amora preta utilizando extrações com líquidos pressurizados (água e etanol) em sequência obtendo resultados promissores. A PLE utilizando diversos solventes de forma sequencial também foi aplicada na obtenção de di e trissacarídeos a partir do mel utilizando misturas de etanol/água em diferentes proporções em dois estágios (Ruiz-Matute *et al.*, 2008).

2.3.4 – Extração assistida por micro-ondas MAE

A extração assistida com micro-ondas (MAE) apresenta-se como uma tecnologia bastante promissora na obtenção de compostos bioativos naturais, já que propõe alternativas para os problemas das demais extrações como, por exemplo, os tempos elevados de extração, o alto consumo de solvente e a sustentabilidade (Mazzutti, 2016). Esse tipo de extração utiliza a energia das ondas eletromagnéticas no auxílio à extração dos analitos presentes na matriz sólida (Oliveira, 2014). As micro-ondas possuem frequência que varia entre 300 MHz e 300GHz (Figura 2.8) e são compostas por campos elétricos e magnéticos perpendiculares que produzem aquecimento e aumento da pressão interna através do impacto direto em materiais polares. Atribui-se, como principal vantagem da utilização desse tipo de extração, a possibilidade de extração com diversas amostras simultaneamente e a consequente diminuição do tempo de extração, se comparado ao Soxhlet (Oliveira, 2014).

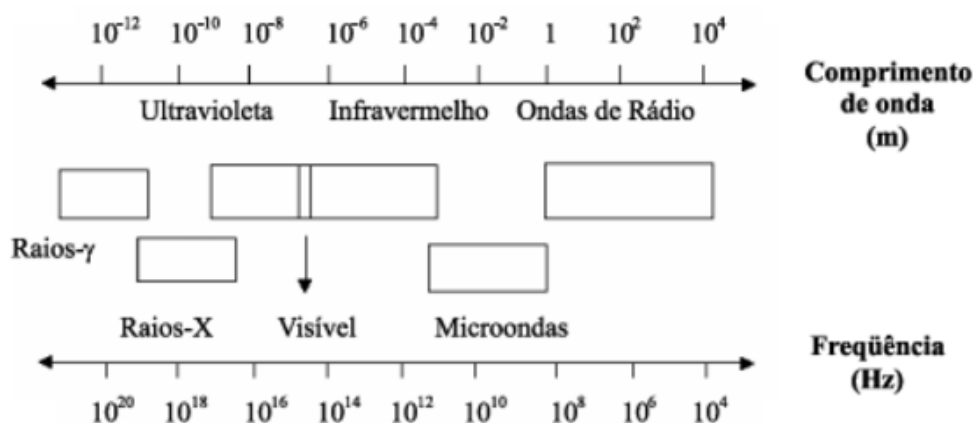


Figura 2.8 – Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético. Fonte: Sanseverino (2002)

Esse aquecimento gerado pelo uso de micro-ondas pode ser obtido a partir da polarização dipolar e da condução iônica (Mazzutti, 2016). De forma geral, no caso do mecanismo de polarização dipolar, inicialmente os dipolos das moléculas do solvente são alinhados a partir da presença do campo elétrico aplicado e na sequência quando o campo é removido, as mesmas dissipam o calor para o meio. Nos líquidos, a capacidade de alinhamento das moléculas varia com a viscosidade do mesmo, podendo diminuir a eficiência do processo (Flórez *et al.*, 2015). Sob a ação de um campo eletromagnético, o aquecimento do mecanismo de condução iônica, ocorre pela fricção ocasionada a partir da migração dos íons dissolvidos (Flórez *et al.*, 2015; Mazzutti, 2016).

No entanto, a absorção das micro-ondas pelo solvente depende de propriedades dielétricas dos mesmos. Dessa forma, os solventes polares absorvem mais as micro-ondas do que os solventes apolares, possivelmente por esses apresentarem baixas propriedades dielétricas. Consequentemente, os solventes polares são amplamente utilizados nesse tipo de extração (Mazzutti, 2016).

Essa técnica tem sido utilizada no desenvolvimento de novos métodos aplicados a extração de compostos fenólicos a partir de solos, sementes, sedimentos e alimentos. De forma geral, existem estudos que mostram que a eficiência da extração dos compostos fenólicos aumentou, se comparado a técnicas convencionais (Liazid *et al.*, 2007).

Pérez-Serradilla & Castro (2011) estudaram a possibilidade de aplicação industrial da utilização dos resíduos do vinho como fonte de compostos fenólicos utilizando micro-ondas, gerando bons resultados, já que o tempo de extração caiu de 24 h para 17 minutos, em relação ao Soxhlet. Diversas matérias-primas já foram utilizadas nesse tipo de extração, no entanto tem ganhado especial atenção a extração de fenólicos devido a sua velocidade e eficiência extrativa (Taamalli *et al.*, 2012).

Tendo em vista as diversas variáveis que influenciam nessas extrações, alguns autores tem se preocupado em otimizar os parâmetros do processo, como na otimização da potência, temperatura, solvente e tempo na extração de fenólicos dos grãos de arroz (Setyaningsih *et al.*, 2015) e de folhas de oliva (Taamalli *et al.*, 2012).

Ballard *et al.* (2010) avaliaram e otimizaram os parâmetros da aplicação de extração com micro-ondas em peles de amendoim, alcançando resultados de 143,6 mg de equivalente em ácido gálico/1,5g. Também existem relatos na literatura da utilização dessa técnica em conjunto com extrações utilizando ultrassom (Alonso-Carrillo *et al.*, 2017).

2.3.5 – Modelagem matemática

Existem trabalhos na literatura que realizam modelagens matemáticas de extrações supercríticas utilizando cossolventes. Yesil-celiktas & Pilavtepe (2013) chegaram a conclusão que a extração supercrítica utiliza bem menos solvente que as extrações convencionais de resíduos de *P. Oceanica*, desta forma demonstrando possibilidades de futuras ampliações de escala; para esta proposta foi realizada uma modelagem matemática e o modelo gerado demonstrou ser bem ajustado.

Nascimento *et al.* (2016) utilizaram os modelos matemáticos propostos por Crank (1975), Martínez *et al.* (2003), Esquível *et al.* (1999) e Tan & Liou (1989) para a investigação da extração de óleos essenciais a partir da *Acrocomia intumescens* (“macaúba”) com fluidos supercríticos.

Liu *et al.* (2014) avaliaram a modelagem matemática das curvas cinéticas de extração da obtenção de flavonoides a partir das folhas da *Calycopteris floribunda*, utilizando SFE com cossolvente. Para essa investigação, esses autores utilizaram os modelos de Crank (1975), Sovová (1994) e Martínez *et al.* (2003). Pode-se observar também que Condoret *et al.* (2013) avaliaram os compostos fenólicos existentes nos extratos das folhas da *T. articulata* e utilizaram o modelo matemático de Reis-Vasco’s possibilitando a extrapolação do processo extrativo.

Moura *et al.* (2012) também estudaram a aplicação dos modelos de Crank (1975), Sovová (1994) e Martínez *et al.* (2003) em extrações utilizando fluido supercrítico e cossolvente. Dentre outros modelos, Melo *et al.* (2016) utilizaram os modelos de Crank (1975) e Sovová (1994) na modelagem matemática das curvas cinéticas de extração das SFES da *Eichhornia crassipes*.

Existem diversos modelos que são utilizados na descrição das curvas cinéticas de extração. A seguir são apresentados alguns modelos utilizados neste trabalho de forma sucinta, escolhidos por sua grande simplicidade de aplicação e por seu uso recorrente na literatura.

2.3.3.1 – Modelo de Crank (1975)

O modelo de Crank parte do princípio de que o soluto a ser extraído da matriz sólida encontra-se distribuído de forma uniforme. Inicialmente, o modelo surgiu a partir de um anterior proposto para a transferência de calor numa partícula esférica em um meio uniforme. Dessa forma, o mesmo foi adaptado para extração com fluidos supercríticos considerando-se a partícula esférica e o solvente como meio (Crank, 1975; Galvão, 2009).

Ao aplicar-se a segunda lei de Fick para a difusão e um balanço de massa na superfície interna da partícula, chega-se a conclusão da seguinte Equação (1), segundo Crank (1975):

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

Em que:

X (concentração de soluto remanescente no sólido);

X_0 (concentração inicial de soluto a ser extraído);

r (raio da partícula sólida);

t (tempo de extração);

D (coeficiente de difusão do soluto na partícula).

A Equação (2) expressa a massa de soluto extraída em função do tempo:

$$m(h = H, t) = \left(1 - \frac{X}{X_0}\right) X_0 \cdot m_t \quad (2)$$

Em que:

m_t (massa total de matéria prima utilizada);

h (coordenada axial do extrator);

H (altura total do extrator).

Esse modelo também é conhecido como modelo de difusão, por considerar que as resistências à transferência de massa em um processo de extração supercrítica se resumem apenas a difusão sólida, sem a presença do termo correspondente a convecção (Crank, 1975; Jesus, 2015).

Nesse modelo apenas os termos de acumulação e difusão são levados em consideração. Desse modo, sua aplicação é bastante restrita a poucos sistemas, já que na maioria dos casos apresenta ajuste ruim, tendo em vista que nos processos de SFE, inicialmente, existe a convecção (Crank, 1975; Jesus, 2015).

Portanto, o modelo de Crank limita-se a aplicar o balanço de massa no processo de SFE na fase sólida, considerando apenas a difusão no meio sólido, enquanto que a fase fluida encontra-se totalmente negligenciada pelo modelo (Jesus, 2015).

2.3.3.2 – Modelo de Sovová (1994)

De forma geral, o modelo proposto por Sovová (1994) apresenta uma série de balanços de massa a partir de diversas considerações como: o leito fixo de seção transversal cilíndrica, na entrada o solvente esta livre do soluto, a temperatura e pressão de operação são constantes, o tamanho e distribuição das partículas de forma homogênea e que o soluto encontra-se no interior e fora da partícula devido à quebra da mesma (Martínez, 2005).

Dessa forma, o modelo propôs que existe soluto em duas frações no leito como o soluto facilmente acessível (X_p) e o soluto de difícil acesso (X_k). Essa consideração baseia-se na consideração de que o soluto presente encontra-se no interior das células da matriz sólida protegidas por uma parede celular. Nesse caso, o processo de moagem da matéria prima expõe parte desse soluto, constituindo o soluto de fácil acesso (Martínez, 2005; Galvão, 2009).

O modelo utiliza o coeficiente de transferência de massa na fase fluida para descrever a etapa CER, considerando nessa primeira etapa a solubilização do soluto de fácil acesso; durante a segunda etapa (FER) existe uma competição entre o soluto de fácil acesso (esgotando-se aos poucos) e o soluto de difícil acesso, ocasionando transferência de massa por difusão interna e por solubilização externa; por fim a etapa difusional em que apenas o soluto de difícil acesso encontra-se presente e por isso a predominância da resistência difusional, conforme anteriormente ilustrado na Figura 2.7 (Martínez, 2005).

O modelo de Sovová (1994) simplifica a solução analítica das equações de balanço de massa e fornece uma boa descrição física dos fenômenos de transferência de massa envolvidos no processo de extração com fluido supercrítico, demonstrando ser uma boa opção quando a finalidade for a aplicação em projetos de investigação de escala (Jesus, 2015; Galvão, 2009). A partir das considerações comentadas, são apresentadas as Equações (3) e (4) do modelo de Sovová:

Para a fase sólida:

$$-\rho_S(1 - \varepsilon) \frac{\partial X}{\partial t} = J(X, Y) \quad (3)$$

Para a fase fluida:

$$-\rho_F U_S \frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad (4)$$

Em que:

Y e X (razão mássica de soluto para as fases fluida e sólida, respectivamente);

U_S (velocidade superficial do solvente);

ε (porosidade do leito);

h (coordenada axial);

ρ_S (densidade da fase sólida);

ρ_F (densidade da fase fluida);

$J(X,Y)$ (fluxo de transferência de massa interfacial);

t (tempo).

A solução para o sistema de equações citados anteriormente utilizando o modelo de Sovová pode ser descrito pelas equações a seguir:

A Equação (5) representa o balanço para a etapa CER, em que $t < t_{CER}$.

$$m(h = H, t) = Y^*[1 - \exp(-Z)]Q_F \cdot t \quad (5)$$

Para a etapa FER, segue a Equação (6), para $t_{CER} \leq t < t_{FER}$:

$$m(h = H, t) = Y^*[t - t_{CER} \cdot \exp(z_W - Z)]Q_F \quad (6)$$

Para a etapa difusional, segue a Equação (7), na qual $t \geq t_{FER}$:

$$m(h = H, t) = N \left\{ X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left[1 + \left(\exp\left(\frac{WX_0}{Y^*}\right) - 1 \right) \exp\left(\left(\frac{W \cdot Q_F}{N}\right)(t_{CER} - t)\right) \frac{X_P}{X_0} \right] \right\} \quad (7)$$

Em que:

$$Z = \frac{N \cdot k_{Ya} \cdot \rho_F}{Q_F \cdot (1 - \varepsilon) \rho_S} \quad (8)$$

$$t_{CER} = \frac{N \cdot X_P}{Z \cdot Y^* \cdot Q_F} \quad (9)$$

$$W = \frac{N \cdot k_{Xa}}{Q_F \cdot (1 - \varepsilon)} \quad (10)$$

$$\frac{z_W}{Z} = \frac{Y^*}{W \cdot X_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \cdot \exp\left[\left(\frac{W \cdot Q_F}{N}\right) \cdot (t - t_{CER})\right] - X_k}{X_0 - X_k} \right\} \quad (11)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{W \cdot Q_F} \cdot \ln \left[\frac{X_k + (X_0 - X_k) \cdot \exp\left(\frac{WX_0}{Y^*}\right)}{X_0} \right]$$

Em que:

m (massa de extrato);

N (massa de sólidos livre de soluto);

Y^* (solubilidade operacional);

t_{CER} (tempo relativo ao final da etapa CER);

t_{FER} (tempo relativo ao final da etapa FER);

X_0 (rendimento global);

X_P (razão mássica de soluto de fácil acesso);

X_k (razão mássica de soluto de difícil acesso).

Q_F (vazão total do fluido)

De acordo com Jesus (2015), a aplicação do modelo desenvolvido por Sovová, geralmente resulta em bons ajustes com os dados experimentais em diversas matérias primas diferentes. Ainda sobre o modelo de Sovová (1994), anos depois do seu surgimento, foi apresentado um novo modelo, partindo das mesmas considerações iniciais acerca das etapas de extração, no entanto, essas mudanças tornaram complexos os resultados oriundos do modelo, culminando com a necessidade de resolução numérica do modelo ao invés da resolução analítica (Sovová, 2005).

2.3.3.3 – Modelo de Martínez *et al.* (2003)

Geralmente, os extratos oriundos de extrações supercríticas em produtos naturais apresentam diversos componentes, ou ainda grupos de componentes, como: compostos fenólicos em que existem os flavonoides, estilbenos, ácidos fenólicos, terpenos, fenóis, entre outros. Há casos em que pretende-se obter apenas um deles. Dessa forma, é importante considerar as variações de concentração do soluto ao longo do tempo, com o intuito de ampliar e otimizar a obtenção dos compostos de interesse (Martínez, 2005).

O modelo proposto por Martínez *et al.* (2003) apresenta essa consideração de sistemas multicomponentes, em que o extrato pode ser considerado um pseudocomponente da mistura. O mesmo despreza o acúmulo e a dispersão na fase fluida (Martínez, 2005).

Essa variação da composição do extrato ao longo do processo de extração supercrítica foi descrita por Martínez *et al.* (2003) a partir de uma equação logística, equação essa que também define o modelo, tipicamente aplicada ao modelo de crescimento populacional (Martínez *et al.*, 2003; Jesus, 2015). O modelo parte do princípio da simplificação do balanço de massa diferencial na fase fluida, considerando para essa apenas os termos de convecção e transferência de massa interfacial, negligenciando, dessa forma a dispersão e a acumulação. Conseqüentemente, uma das soluções da equação logística foi introduzida no termo de transferência de massa interfacial (Martínez *et al.*, 2003; Jesus, 2015).

É importante ressaltar que o modelo logístico utilizado por Martínez *et al.* (2003) é tratado como modelo empírico, já que não existe conexão entre a equação logística utilizada pelo autor e a descrição do fenômeno de transferência de massa da SFE consequentemente, não existindo significado físico para os dois parâmetros ajustáveis (t_{mi} e b_i) (Martínez, 2005).

No entanto, existem trabalhos que consideram o t_{mi} como o instante em que a taxa de extração é máxima, devido ao comportamento gráfico do modelo. Dessa forma, os valores para t_{mi} não necessariamente devem ser positivos, já que em determinados casos, o instante em que a taxa de extração, ajustada a partir do modelo, é máxima, encontra-se anterior ao ponto zero do próprio modelo, ratificando a ausência de sentido físico nas variáveis ajustáveis desse modelo.

Neste modelo, as equações de balanço encontram-se da seguinte forma:

Para a fase fluida:

$$\frac{\partial Y}{\partial t} + u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{aY} \frac{\partial Y}{\partial h} \right) + \frac{J(X, Y)}{\varepsilon} \quad (12)$$

Para a fase sólida:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{aX} \frac{\partial X}{\partial h} \right) - \frac{J(X, Y) \rho_F}{(1 - \varepsilon) \rho_S} \quad (13)$$

Aplicando a consideração de estado estacionário e de não dispersão axial tem-se:

$$u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X, Y)}{\varepsilon} \quad (14)$$

Em que:

X (razão mássica de soluto na fase sólida);

Y (razão mássica do soluto na fase fluida);

u (velocidade intersticial do solvente no leito de extração);

h (coordenada axial do leito de extração);

D_{aY} (coeficiente de dispersão axial na fase fluida);

D_{aX} (coeficiente de dispersão axial na fase sólida);

ρ_F (densidade do fluido solvente);

ρ_S (densidade do sólido);

ε (porosidade do leito);

$J(X, Y)$ (fluxo de transferência de massa interfacial).

Partindo da Equação (14), o termo $J(X,Y)$ é descrito pelo modelo como uma função dependente da composição do extrato ao longo do processo extrativo, de forma que é possível obter a integração da equação para a resolução do balanço mássico do extrato na fase fluida (Galvão, 2009).

$$Y(h = H, t) = \frac{H}{u\varepsilon} \sum_{i=1}^n S_i \quad (15)$$

Considerando H como o comprimento total do leito de extração.

$$m_i(h = H, t) = \frac{Q_F \cdot H A_i}{u\varepsilon} \left[\frac{1}{1 + \exp(b_i(t_{mi} - t))} - \frac{1}{1 + \exp(b_i t_{mi})} \right] \quad (16)$$

Ao considerar a condição de tempo tendendo ao infinito na Equação 16, o valor numérico referente à massa de soluto extraída tende a um valor fixo, também denominado de “ m_{ii} ” (quantidade máxima de soluto extraída). Ao rearranjar a Equação 16, obtêm-se a Equação 17, apresentando como parâmetros ajustáveis apenas as variáveis b_i e t_{mi} (Galvão, 2009).

$$m_i(h = H, t) = \frac{m_{ti}}{\exp(b_i t_{mi})} \left[\frac{1 + \exp(b_i t_{mi})}{1 + \exp(b_i(t_{mi} - t))} - 1 \right] \quad (17)$$

Considerações importantes do modelo:

H >>> Diâmetro do leito;

Solvente escoar com velocidade u na direção axial;

Matéria prima e porosidade uniformes.

2.4 – Processos de secagem de extratos

Diversos são os tipos de secagem de extratos. Como são de origem natural, os processos de secagem de extratos de produtos naturais podem ser classificados em diversos tipos como, secagem convencional (convecção, condução, utilização de vapor), liofilização, secagem por precipitação com anti-solvente supercrítico, leito de jorro, entre outros (Pachú, 2007).

2.4.1 – Secagem convencional

O processo de secagem, de forma simples, pode ser definido como a retirada do solvente, geralmente a água, de um determinado material ou extrato (Park *et al.*, 2001). O

processo de secagem de extratos convencional, geralmente, é associado aos métodos diretos de secagem, os quais o solvente é retirado a partir de um processo de aquecimento enquanto que o teor de solvente diminui com o tempo (Alves, 2014).

Segundo Alves (2014), o método direto que pode ser considerado mais utilizado é o da estufa por convecção forçada ou natural. Nesse caso, dependendo da finalidade do produto final, o tempo e a temperatura de secagem podem variar. De forma geral, o processo de secagem com a utilização da estufa prolonga-se até o alcance do peso constante do produto final ou extrato, entre duas ou mais sucessivas pesagens (Alves, 2014). No entanto, processos de secagem que utilizam altas temperaturas podem provocar alterações nas características do extrato ou do material que se está secando (Agra, 2006).

Sharif *et al.* (2015) secou extratos ricos em compostos fenólicos de extrações supercríticas com a aplicação do gás inerte N₂ para evaporação do cossolvente. Santos (2013a) utilizou a estufa com circulação e renovação de ar a 30 °C para a retirada do cossolvente (etanol) presente nos extratos da *Rumex acetosa*. Basicamente, o processo de secagem ocorre até a massa de extrato cessar o decaimento e passar a ser constante ao longo do tempo.

2.4.2 – Liofilização

Também conhecida como *freeze-drying*, a liofilização promove a desidratação de materiais sólidos, principalmente produtos naturais ou extratos, a partir do processo de sublimação da água. Para que o processo aconteça de forma efetiva, a desidratação por liofilização precisa acontecer a baixas temperaturas e pressões (vácuo). Formam-se poros microscópicos resultantes dos cristais de gelo anteriormente presentes (Oikonomopoulou *et al.*, 2011).

Pode-se afirmar que a liofilização é bastante importante na secagem de produtos com alto valor agregado e que apresentem sensibilidade ao calor, como por exemplo, sucos, frutas, ervas, temperos, fármacos, extratos fitoterápicos, entre outros, já que trata-se de um processo de secagem bastante oneroso (Araújo, 2014; Ratti, 2001).

2.4.3 – Secagem por precipitação com anti-solvente supercrítico

Partindo do princípio de que diversos solutos são insolúveis em gases apolares, como o CO₂, soluções desses solutos podem ser precipitadas ou secas utilizando esses gases (Brun, 2012). Ao considerar que esses gases estão em condições acima das críticas, pode-se

classificá-los como gases anti-solventes supercríticos, ou simplesmente anti-solventes supercríticos (Brun, 2012).

O processo ocorre na medida em que o anti-solvente supercrítico difunde no extrato, o poder de solvatação do solvente convencional (nesse caso, o líquido polar) é reduzida a partir da saturação com o fluido supercrítico causando o processo de precipitação (Brun, 2012). Esse fenômeno explica o motivo pela qual essas substâncias são chamadas de anti-solventes.

Dessa forma, o processo de secagem (ou precipitação, nesse caso) utilizando anti-solvente supercrítico pode proporcionar uma menor degradação térmica (por usar baixas temperaturas), mecânica (por evitar os choques mecânicos) e/ou pela presença de luz (processo ocorre na ausência de luz) em seus extratos, proporcionando uma vasta aplicação na área de formação de nanopartículas, fármacos, proteínas, enzimas, polímeros e biopolímeros (Brun, 2012).

No entanto, vale salientar que o processo de precipitação utilizando anti-solvente supercrítico deve ser recomendado para extratos que não contenham solutos que apresentem afinidade química com o anti-solvente, pois do contrário, o processo de precipitação irá proporcionar o carreamento desses solutos, já que o fluido supercrítico é separado da solução inicial devido ao abaixamento de pressão ao qual é submetido. Por exemplo: se o seu extrato apresenta substâncias voláteis ou que sejam apolares, existe a possibilidade dessas substâncias serem carreadas pelo CO₂ (anti-solvente supercrítico) e não precipitarem juntamente com as demais substâncias polares presentes no extrato (Brun, 2012).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

O resumo de todo o desenvolvimento experimental realizado no trabalho segue presente na Figura 3.1.

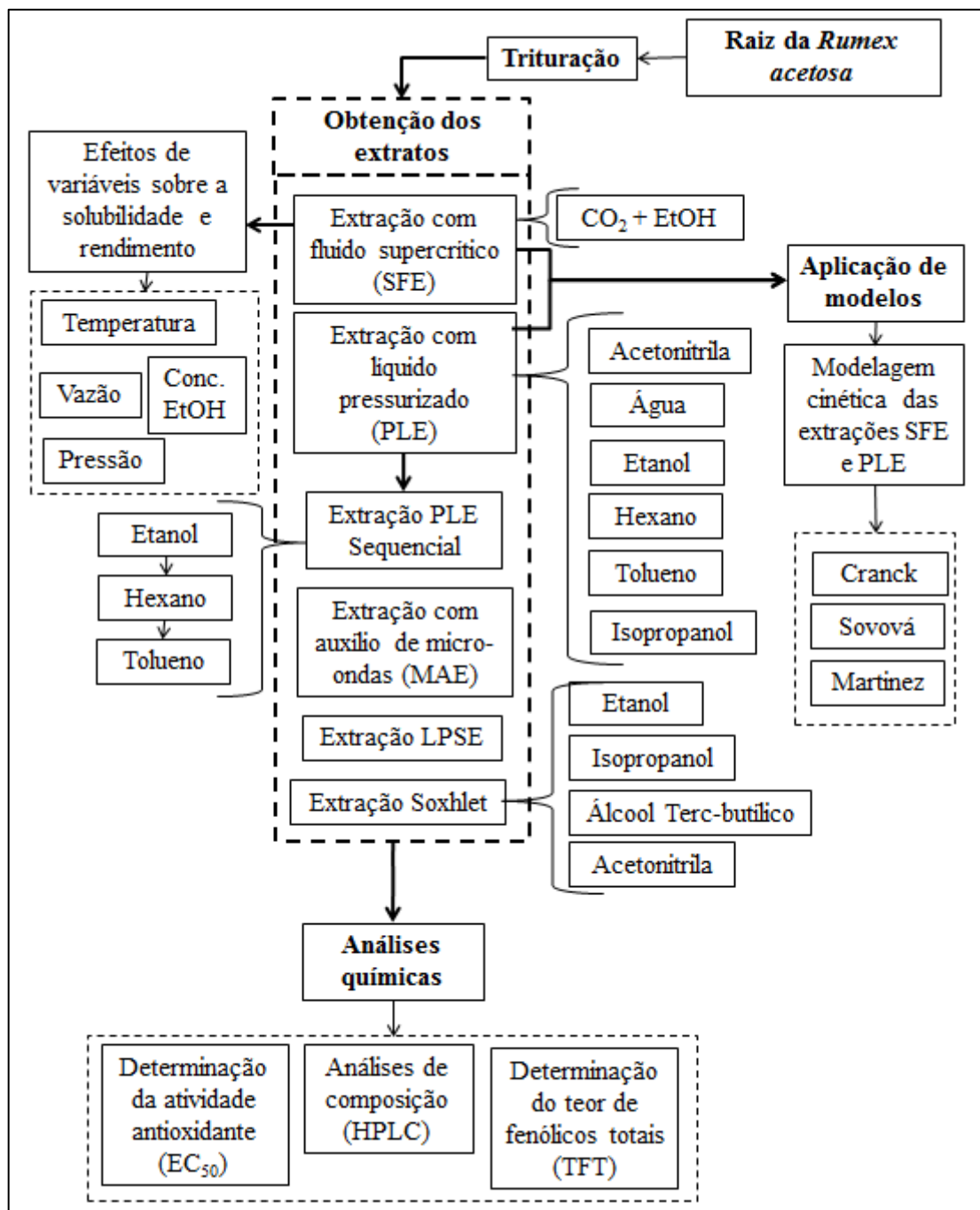


Figura 3.1 – Fluxograma referente às atividades desenvolvidas neste trabalho

3.1 – Materiais e preparação das amostras

A matéria-prima utilizada nos experimentos foi a raiz da *Rumex acetosa*, pertencente a família das *Polygonaceae* (ordem das *Caryophyllales*, classe *Magnoliopsida*). As amostras foram colhidas em 2015 (maio – agosto), secas ao abrigo do sol e com o auxílio de estufa a gás, pela empresa Trisãmya Produtos Naturais e Ervas Medicinais do Estado de Santa Catarina, Brasil. As amostras pertenceram a um único lote plantado da erva.

As raízes foram submetidas à trituração em liquidificador doméstico (Arno, modelo MPAC, Brasil). Em seguida, as partículas foram classificadas quanto ao tamanho, por peneiramento em um sistema vibratório (Bertel, model 1868, Caieiras, SP, Brazil) durante 15 minutos. O diâmetro médio das partículas selecionadas foi de 1,42 mm, já que a fração referente às peneiras de -10/+20 Mesh (Série Tyler, Wheeling, USA) apresentou o maior rendimento pós-trituração. As amostras (Figura 3.2) foram armazenadas em ambiente fechado (sacos plásticos) e livre de umidade.



Figura 3.2 – Raiz seca e triturada da *Rumex acetosa*. Fonte: Autoria própria (2017)

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. O Gás carbônico seco (99,9%) foi adquirido na White Martins (Natal, Brasil). Emodina (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), piceid (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) trans-resveratrol (99,9% de pureza, Cayman Chemical, Michigan, EUA), cis-resveratrol (99,9% de pureza, Cayman Chemical, Michigan, EUA), acetonitrila (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), reagente Folin & Ciocalteu's (2 N, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), DPPH (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e ácido gálico (99,9% de pureza, Sigma-

Aldrich, St. Louis, EUA). Ainda foram utilizados o tolueno, hexano, etanol, álcool terc-butílico e isopropanol, todos com 99,5% de pureza, (Synth, Diadema, SP, Brasil).

3.2 – Extração com fluido supercrítico (SFE)

As extrações com fluido supercrítico foram realizadas utilizando CO_2 + cossolvente, já que a SFE com cossolvente apresenta-se como uma das mais adequadas para extração de compostos fenólicos (Campomanes, 2012). O etanol foi escolhido como cossolvente devido aos resultados obtidos por Santos (2013a) na SFE da *Rumex acetosa* e por ser um solvente barato, polar e com alta afinidade com compostos fenólicos (Campomanes, 2012).

A Figura 3.3 apresenta o aparato experimental, que consiste de uma bomba de CO_2 P-1 (Syringe pump 260D, Teledyne, USA); um banho de arrefecimento B-1 (Tecnal, TE- 184, São Paulo, Brasil); uma bomba isocrática de deslocamento positivo P-2 (Serie III, LabAlliance, USA); uma coluna extratora com volume de 145 cm^3 E-1 (comprimento de 30,7 cm e diâmetro interno de 2,45 cm) com temperatura controlada por banho termostático B-2 (Marconi, MA-184, Piracicaba, Brasil). Válvulas, termopares, manômetros e indicadores de pressão e temperatura também compõem a unidade experimental.

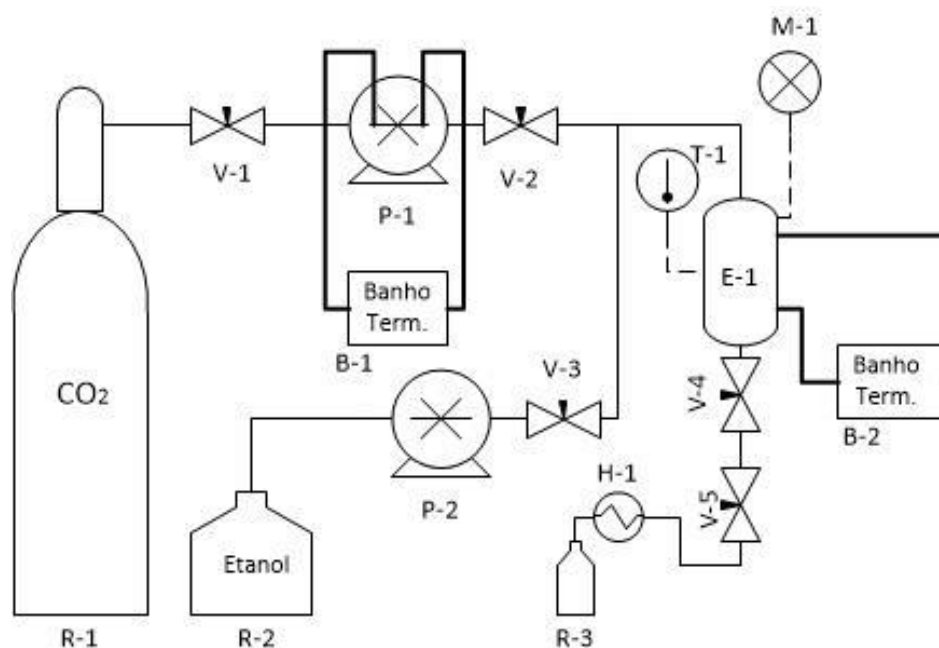


Figura 3.3 – Unidade de extração supercrítica (SFE- CO_2 /Etanol), sendo: V-1, V-2, V-3, V-4: válvulas agulha macrométricas; V-5: válvula agulha micrométrica; R-1: cilindro de gás CO_2 ; R-2: frasco com etanol; R-3: coletor de extrato; P-1: bomba seringa; P-2: bomba de cossolvente; E-1 coluna extratora; B-1 e B-2: banhos termostatizados; H-1: aquecedor; T-1: termopar; M-1: manômetro. Fonte: Autoria própria (2017)

O procedimento experimental iniciou-se com o preenchimento parcial da coluna extratora (E-1) com cerca de $30,0 \pm 0,1$ g de matéria prima (raiz da *Rumex acetosa*) com tamanho definido conforme descrito na Seção 3.1. Em seguida, totalizou-se o preenchimento com esferas de vidro de 4 mm. Essas etapas compreendem o “empacotamento manual” que visa garantir a boa compactação da amostra e o máximo de uniformidade na porosidade da leito, evitando futuros caminhos preferenciais do solvente. Para tal etapa, utilizam-se telas de proteção (abertura de 200 Mesh) nas extremidades da coluna.

Após o posicionamento correto da coluna E-1 na unidade, inicia-se o processo de preenchimento desta com a mistura solvente de forma controlada e respeitando a proporção de CO₂ e etanol até as condições pré-estabelecidas de temperatura e pressão da unidade, aferidos a partir dos termômetros T-1 e manômetro M-1. Esse preenchimento é promovido pela bomba seringa P-1, para o caso do CO₂, e pela bomba P-2, para o cossolvente etanol, de forma coordenada, com proporção de cossolvente calculada sob o fluxo volumétrico total da mistura de solventes. Para tal processo, a válvula V-1 é fechada a fim de evitar a pressurização do cilindro R-1 e as válvulas V-2 e V-3 são abertas permitindo o fluxo dos solventes até a coluna extratora E-1.

Antes do início da parte dinâmica da extração, a matéria prima e a mistura solvente ficaram em contato durante 30 minutos para a estabilização dos parâmetros de extração. Em seguida, o processo dinâmico segue com a abertura das válvulas V-4 e V-5 de forma controlada objetivando o controle da pressão do sistema, já que as bombas P-1 e P-2 trabalharam no modo vazão constante. Logo após as válvulas, o extrato passa pelo aquecedor H-1 (visa combater o congelamento da linha) e em seguida é coletado pelo frasco âmbar R-3, enquanto que o CO₂ é separado por estar nas condições ambientais. Em todas as extrações, essa coleta do extrato foi realizada por amostragem em intervalos de tempo da extração, objetivando o estudo cinético do processo, de acordo com a frequência: 1° frasco (0-10min); 2° (10-25min); 3° (25-40min); 4° (40-60min); 5° (60-80min); 6° (80-100min); 7° (100-120min); 8° (120-140min); 9° (140-160min); 10° (160-180min). Por fim, o extrato foi submetido à secagem em estufa de circulação de ar a 40 °C e abrigo de luminosidade.

Numa primeira etapa deste trabalho, foram realizados experimentos com o objetivo de avaliar a influência da vazão de solvente sobre o rendimento e curvas cinéticas de extração, bem como para a determinação de solubilidade. Os experimentos foram conduzidos a 20 MPa, 60 °C e adição de 15% de etanol (v/v), conforme Tabela 3.1 (experimentos de 1 a 5). A faixa de vazão total (CO₂ + etanol) investigada foi de 1-4 mL/min e o tempo de extração foi de 180 minutos, sendo a faixa de vazão e o tempo de extração escolhidos mediante limitações

da unidade de extração. No entanto, as faixas de temperatura, pressão e concentração de cossolvente para essa etapa foram baseadas nas condições centrais das faixas utilizadas por Santos (2013a), trabalho em que foram realizadas SFEs na raiz da *Rumex acetosa*, e em testes preliminares.

Numa segunda etapa, os experimentos de 6 a 10 foram realizados a 15 MPa, 40 °C, 180 minutos e 1mL/min (vazão de solvente escolhida em função da etapa anterior) e objetivaram avaliar a influência da concentração de etanol na mistura solvente (CO₂-Etanol) sobre o rendimento, cinética de extração e solubilidade. A faixa de concentração de etanol investigada foi de 5-45% e foi baseada inicialmente no trabalho de Santos (2013a) que avaliou a influência até 15%. No entanto, trabalhos como o de Sharif *et al.* (2015) que também extraíram compostos antioxidantes da *Pereskia bleo* por SFE com faixa entre 0-90% de etanol, foram motivadores para a ampliação da concentração de etanol até 45%. Quanto aos valores fixos de temperatura e pressão, esses foram baseados nos valores mínimos do trabalho de Santos (2013a), com o intuito de diminuir ao máximo o efeito da temperatura e pressão, ressaltando o efeito da concentração de etanol.

Tabela 3.1 – Condições experimentais desenvolvidas para extração supercrítica.

<i>Experimento</i>	<i>Pressão</i> (MPa)	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Conc. Cossolvente</i> (% v/v)	<i>Vazão total</i> (mL/min)
1	20	60	15	1,00
2	20	60	15	1,50
3	20	60	15	2,00
4	20	60	15	3,00
5	20	60	15	4,00
6	15	40	5	1,00
7	15	40	15	1,00
8	15	40	25	1,00
9	15	40	35	1,00
10	15	40	45	1,00
11	20	40	15	1,00
12	25	40	15	1,00
13	15	60	15	1,00
14	25	60	15	1,00

As extrações subsequentes (de 11 a 14) complementaram a avaliação das variáveis temperatura e pressão do sistema sobre o rendimento de extração e solubilidade do soluto na mistura solvente. Nessa etapa, a faixa de pressão avaliada foi de 15-25 MPa, nas temperaturas de 40 e 60 °C, conforme Tabela 3.1, utilizando a mesma abordagem utilizada por Moura *et al.* (2012). Os demais parâmetros foram fixos (vazão total de 1 mL/min e 15% de concentração de etanol). Nessa etapa, a concentração de etanol escolhida foi de 15%, a segunda menor concentração, em virtude de testes preliminares que atestaram o baixíssimo rendimento a 5%, inviabilizando a utilização dessa concentração para essa análise. As baixas concentrações de etanol visaram ressaltar o comportamento da pressão e da temperatura.

Esses procedimentos das SFEs foram realizados no laboratório de Tecnologia Supercrítica e Biodiesel da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) em Natal/RN.

3.2.1 – Curvas cinéticas de extração e solubilidade

Durante os processos de SFEs, geralmente a taxa de extração de soluto é muitas vezes limitada pela solubilidade do soluto (compostos de interesse) no solvente, que neste trabalho foi a mistura CO₂ + etanol em condições pré-estabelecidas (20 MPa, 60 °C e 15% de etanol) (Danlami, *et al.*, 2015). Dessa forma, o cálculo da solubilidade é imprescindível na otimização dos processos de separação e obtenção dos solutos; e na viabilidade econômica e otimização dos rendimentos extrativos (Bitencourt *et al.*, 2016).

As curvas cinéticas de extração global foram obtidas a partir da coleta da massa de extrato em função do tempo utilizando o método dinâmico (Ferreira *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2002), no qual o solvente é saturado pelo soluto à medida que o mesmo flui através do leito sólido com vazão constante e previamente definida. Em seguida, as curvas foram ajustadas em três retas que representam, respectivamente, a etapa CER (taxa de extração constante), a etapa FER (taxa de extração decrescente) e a etapa DC (taxa controlada pela difusão), conforme descrito na literatura (Sousa *et al.*, 2002; Meireles, 2007). A partir da regressão linear que delimita a etapa CER, foi estimada a solubilidade do soluto no solvente com o coeficiente angular (Sousa *et al.*, 2002; Sovová, 2005; Zuknik *et al.*, 2016).

3.3 – Extrações com líquidos pressurizados (PLE)

O processo de extração com líquido pressurizado utilizando apenas um solvente foi realizado de duas formas distintas. Inicialmente, apenas o etanol foi utilizado como solvente

em um planejamento experimental 2^2 fatorial. Para esse planejamento, foram escolhidas as variáveis: pressão e temperatura de operação. Foram realizados 6 experimentos, variando-se a pressão em 15 MPa, 20 MPa e 25 MPa e a temperatura em 40°C, 60°C e 80°C. Dentre os 6 experimentos, 2 foram nas condições: 20 MPa e 60°C. A Tabela 3.2 apresenta os níveis das variáveis envolvidas no processo nas suas formas codificadas e não codificadas.

Tabela 3.2 – Níveis para os fatores e seus valores codificados para a extração com etanol pressurizado em raízes de *Rumex acetosa*

<i>Nível/Fator</i>	<i>Pressão</i> (MPa)	<i>Temperatura</i> (°C)
-1	15	40
0	20	60
+1	25	80

Na segunda etapa da extração com líquido pressurizado, foram realizadas extrações com solventes distintos, com o objetivo de formular a sequência de solventes a ser aplicada na extração pressurizada de forma sequenciada (etapa seguinte). Tendo em vista os trabalhos de Souto (2010), Benová *et al.* (2010), Machado (2014) e Santos (2013a), foram escolhidos os solventes: água, acetonitrila, álcool isopropílico, etanol, hexano e tolueno. As condições, nas quais os experimentos foram realizados, estão dispostas na Tabela 3.3. Essas foram escolhidas devido a resultados preliminares que atestaram o alto rendimento extrativo em altas temperaturas e a menor influência da pressão.

Tabela 3.3 – Condições operacionais da extrações utilizando diferentes solventes pressurizados

<i>Exp</i>	<i>Solvente</i>	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Pressão</i> (MPa)	<i>Vazão total</i> (mL/min)
1	Água	80	20	1,00
2	Acetonitrila	80	20	1,00
3	Isopropanol	80	20	1,00
4	Etanol	80	20	1,00
5	Hexano	80	20	1,00
6	Tolueno	80	20	1,00

Todos os experimentos com líquidos pressurizados utilizaram o aparato experimental esquematizado na Figura 3.4. Uma foto do aparato pode ser vista no Anexo A. Essa unidade consiste de um banho de arrefecimento (Tecnal, TE- 184, São Paulo, Brasil); uma bomba de isocrática de deslocamento positivo (Serie III, LabAlliance, USA); uma coluna extratora com volume de 145 cm³ (comprimento de 30,7 cm e diâmetro interno de 2,45 cm) com temperatura controlada por banho termostático (Marconi, MA-184, Piracicaba, Brasil). Válvulas, termopares, manômetros e indicadores de pressão e temperatura também compõem a unidade experimental.

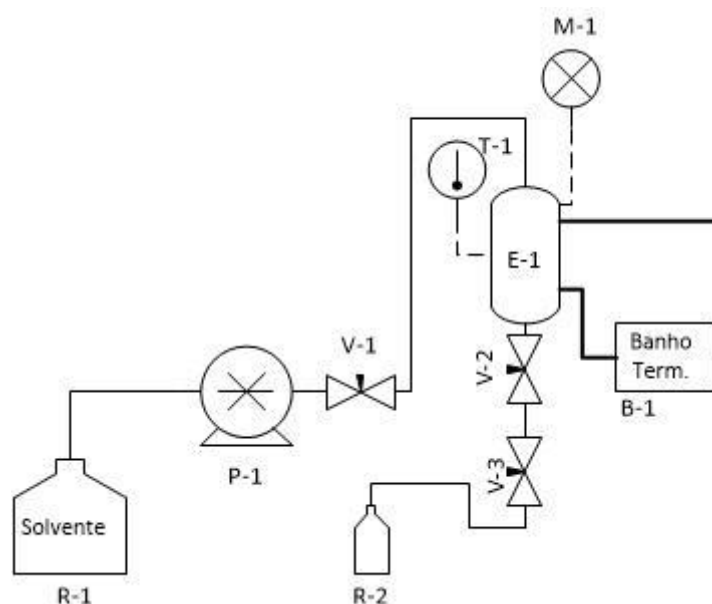


Figura 3.4 – Unidade de extração com líquido pressurizado, sendo: V-1, V-2: válvulas agulha macrométricas; V-3: válvula agulha micrométrica; R-1: frasco contendo solvente; R-2: coletor de extrato; P-1: bomba de solvente; E-1 coluna extratora; B-1: banho termostatizado; T-1: termopar; M-1: manômetro. Fonte: Autoria própria (2017)

O processo de “empacotamento manual” das raízes da *Rumex acetosa* ocorreu de forma análoga ao descrito para a extração supercrítica na Seção 3.2 deste trabalho. No entanto, apenas a válvula V-1 (Figura 3.4) foi acionada para o preenchimento da coluna E-1 com solvente. Quando as condições de trabalho foram alcançadas, aguardou-se 30 minutos com o intuito da estabilização da pressão e temperatura de operação.

A bomba P-1 trabalhou em regime de vazão constante, conseqüentemente o controle da pressão de operação no regime dinâmico de extração aconteceu a partir das válvulas V-2 e V-3. O extrato foi recolhido no frasco âmbar R-2 e em seguida posto para secagem em estufa de circulação de ar a 40 °C e ao abrigo de luminosidade até peso constante. De forma análoga ao descrito na Seção 3.2 deste trabalho, amostragens do extrato em instantes de tempo distintos foram coletadas a fim de que as curvas cinéticas fossem observadas, alcançando um tempo

total de extração de 180 minutos. Os procedimentos referentes às PLEs e à extração sequencial da seção 3.3.1 foram realizados no laboratório de Tecnologia Supercrítica e Biodiesel da UFRN em Natal/RN.

3.3.1 – Extração com líquidos pressurizados de forma sequencial

Com o intuito de melhorar o processo de separação dos compostos presentes nos extratos da *Rumex acetosa*, baseado em resultados preliminares (avaliação das extrações com diversos solventes apresentada na Seção 3.3) e na literatura (Souto, 2010; Benová *et al.*, 2010 e Machado, 2014), optou-se por utilizar os solventes tolueno, hexano e etanol, nessa ordem, para a extração com utilização de solventes pressurizados líquidos de forma sequencial. As extrações seguiram o fluxograma ilustrado na Figura 3.5:

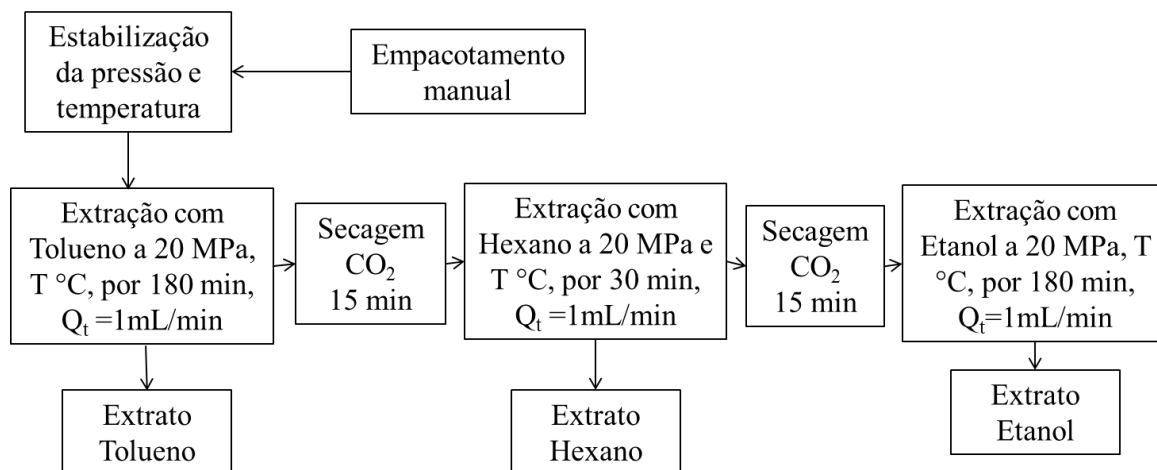


Figura 3.5 – Fluxograma da PLE com solventes orgânicos de forma sequencial

O procedimento operacional da extração para cada etapa ocorreu de forma análoga ao descrito na Seção 3.3, referente à extração com líquido pressurizado. No entanto, foram utilizadas as temperaturas de 40 °C, 60 °C e 80 °C para cada extração sequencial. É importante ressaltar que a temperatura de operação manteve-se constante durante todo o processo. A escolha dos parâmetros utilizados nessa extração tiveram por base o trabalho de Santos (2013a) e as limitações da própria unidade extratora. Também foram levantadas as curvas cinéticas de extração para cada temperatura, conforme descrito na Seção 3.3 deste trabalho.

3.4 – Extração com utilização de micro-ondas

Para esse tipo de extração, foi utilizada a metodologia abordada por Silva (2010) com modificações. Basicamente, esse processo de extração consistiu na colocação da matéria-prima juntamente com o solvente a ser utilizado, no reator de micro-ondas (Figura 3.6; Synthos 3000 da Anton Paar) e acionamento do aparelho com a programação correta dos parâmetros a serem controlados pelo mesmo. Esse equipamento apresenta 2 magnétrons responsáveis por gerar radiações a uma frequência de 2,45 GHz, alcançando uma potência máxima de 1400 W e apresenta rotação de 3 rpm. O mesmo possui um agitador magnético para cada frasco de quartzo, que pode alcançar 600 rpm (Silva, 2010).

Para o processo extrativo, foram utilizadas 6,4 g de raiz de *Rumex acetosa*, para cada 30 mL de etanol em cada um dos 4 tubos de quartzo utilizados. A temperatura utilizada foi de 80 °C por um tempo de extração de 30 minutos. A escolha da temperatura deu-se a partir da necessidade dessa ser próxima a do Soxhlet (~78 °C) e PLE (80 °C), enquanto que o tempo foi baseado em trabalhos da literatura, como Silva (2010) e Mazzutti, (2016).

Foram utilizados 4 frascos com o intuito de 2 deles serem separados para a avaliação da secagem com precipitação por anti-solvente, a ser descrita na Seção 3.5, enquanto que os demais para secagem convencional em estufa com circulação de ar (Marconi, MA 035, Piracicaba, SP, Brasil) a 40 °C durante 72 horas, para promover a completa evaporação do solvente (até peso constante).



Figura 3.6 – Foto do reator de micro-ondas Synthos 3000 Anton Paar; foto da base giratória e tubos de quartzo. Fonte: Silva (2010)

Esse procedimento da extração com utilização de micro-ondas foi realizado no laboratório do NUESC (Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa localizado na Universidade Tiradentes em Aracaju/SE.

3.5 – Precipitação e secagem de extratos com utilização de anti-solvente

De forma geral, o processo de secagem e precipitação foi realizado segundo a metodologia descrita por Franceschi *et al.* (2008) com modificações próprias e outras apresentadas por Junges (2016). A técnica de precipitação empregada neste trabalho baseou-se na dispersão da solução contendo os extratos por fluidos supercríticos, conforme ilustrado na Figura 3.7. Esses procedimentos foram realizados no laboratório do NUESC (Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa presente na Universidade Tiradentes em Aracaju/SE.

A princípio, apenas as soluções oriundas da extração PLE nas condições: 20 MPa, 60 °C, 1 mL/min e da extração MAE foram escolhidas para a avaliação do processo de secagem com anti-solvente supercrítico.

A unidade de precipitação e secagem (Figura 3.7) é composta por uma bomba seringa (3) (Teledyne ISCO, modelo 1000D) para o deslocamento do CO₂ supercrítico e uma bomba de isocrática de deslocamento positivo (7) (Scientific Systems, modelo Série III) para o deslocamento de líquido (extrato), as quais operando no modo pressão constante e vazão constante, respectivamente. As bombas conduzem os fluidos a uma câmara de precipitação em aço inox (7,70 cm de diâmetro interno e 13,64 cm de comprimento) com camisa para controle de temperatura.

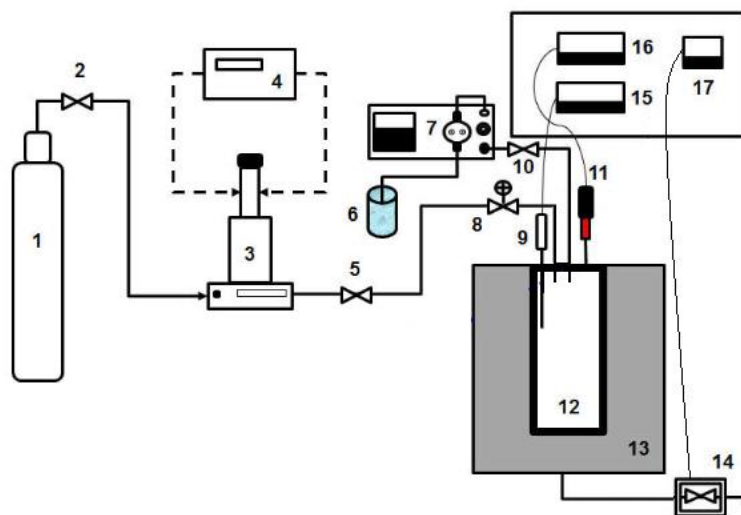


Figura 3.7 – Unidade experimental utilizada para a precipitação com anti-solvente supercrítico. Fonte: Adaptado de Junges (2016)

Sendo: cilindro de dióxido de carbono (1), válvula agulha para alimentação do gás na bomba (2), bomba de líquido a alta pressão (3), unidade de refrigeração (4), válvula esfera para liberação do gás da bomba (5), solução de extrato (6), bomba de deslocamento positivo

(7), válvula agulha para alimentação do gás na câmara de precipitação (8), termopar (9), válvula back pressure (10), transdutor (11), câmara de precipitação (12), sistema de controle de temperatura da câmara (13), válvula agulha e manta de aquecimento para despressurização (14), indicador de temperatura (15), indicador de pressão (16), unidade de controle de temperatura da manta de aquecimento (17).

Inicialmente, o CO₂ supercrítico foi bombeado para o interior da câmara de precipitação (12) utilizando a bomba seringa (3) até a pressão de 80 bar e temperatura de 40 °C. Em seguida, uma vazão de 20 mL/min de CO₂ foi aplicada juntamente com a vazão de 1 mL/min do extrato. Ao longo do tempo, os sensores 9 e 11 permitiram o controle da temperatura e pressão respectivamente. Ao final do processo de secagem, as partículas precipitadas e secas, ao longo do processo, ficaram aderidas às paredes da câmara de precipitação.

3.6 – Extração Soxhlet

Na extração com Soxhlet, o método utilizado foi semelhante ao descrito por Galvão (2004), podendo ser dividido em três etapas distintas: incubação da amostra, filtração à vácuo e evaporação do solvente. Foram utilizados 4 solventes distintos: etanol, acetonitrila, isopropanol e álcool terc-butílico, com base no trabalho de Benová *et al.* (2010) e na importância de se estudar o comportamento de outros álcoois diferentes do etanol.

Os experimentos foram realizados em duplicata para cada solvente num extrator de óleos e gorduras (Marconi, MA 491, Piracicaba, SP, Brasil). Nesse extrator, aproximadamente 16 gramas da amostra triturada (-10/+20 Mesh) de *Rumex acetosa* foram colocadas em uma espécie de “cartucho” feito com papel filtro, que em seguida é imerso em cerca de 80 mL do solvente no próprio equipamento.

O processo de extração Soxhlet durou 8 horas. Este tempo de 8 horas permaneceu constante para todos os ensaios deste tipo. Com a parte líquida resultante do processo extrativo, uma filtração a vácuo foi realizada e o filtrado seguiu para um placa de petri que foi colocada em uma estufa com circulação de ar com controle de temperatura (Marconi, MA 035, Piracicaba, SP, Brasil). A placa de petri aberta permaneceu na estufa a 40 °C durante 72 horas, para promover a evaporação do solvente (até peso constante). Por fim, o rendimento do processo foi realizado por meio da estimativa da razão (massa total do extrato no filtrado/massa de *Rumex acetosa* triturada).

3.7 – Extração com solvente a baixa pressão (LPSE)

Para o processo de extração com LPSE, foram utilizadas aproximadamente 15 gramas da raiz da *Rumex acetosa* triturada (-10/+20 Mesh). A matéria-prima foi colocada em um erlenmeyer de 250 mL juntamente com 150 mL de etanol. Esse erlenmeyer foi inserido num shaker (Tecnal, TE- 422, São Paulo, Brasil) e o processo de extração ocorreu durante 8 h sob agitação de 170 rpm. Como se fazia necessário o acompanhamento da cinética de extração, foram preparados 8 erlenmeyers (conforme descrito acima), para que, ao longo do processo de extração, fossem removidos a cada hora de extração. Dessa forma, na primeira hora de extração calculou-se o rendimento a partir do 1º erlenmeyer, na segunda hora de extração calculou-se o rendimento a partir do 2º erlenmeyer e assim sucessivamente até a 8ª hora em que restou apenas um erlenmeyer e se encerrou a extração.

A cada interrupção de erlenmeyer, a mistura era filtrada à vácuo e o extrato obtido seguia para o processo de secagem em placa de petri aberta (a 40 °C durante 72 horas) numa estufa com circulação de ar e controle de temperatura (Marconi, MA 035, Piracicaba, SP, Brasil), para promover a completa evaporação do solvente (até peso constante).

3.8 – Determinação da atividade antioxidante dos extratos (EC₅₀)

A atividade antioxidante foi determinada a partir da atividade sequestradora de radicais livres dos extratos com a utilização de DPPH* (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Dentro desse contexto, o DPPH (molécula C₁₈H₁₂N₅O₆) apresenta-se como um importante radical livre (por apresentar deslocalização do elétron desemparelhado) indicador do poder antioxidante em virtude de sua razoável estabilidade a temperatura ambiente. Descoberto por Goldschmidt e Renn em 1922, esse composto é amplamente utilizado em pesquisas que utilizam reações com radicais livres, sendo sua principal aplicação como reagente colorimétrico em testes para quantificação da atividade antioxidante ou ainda como testes de captura do DPPH (Bozzi, 2011). As formas do DPPH podem ser observadas na Figura 3.8.

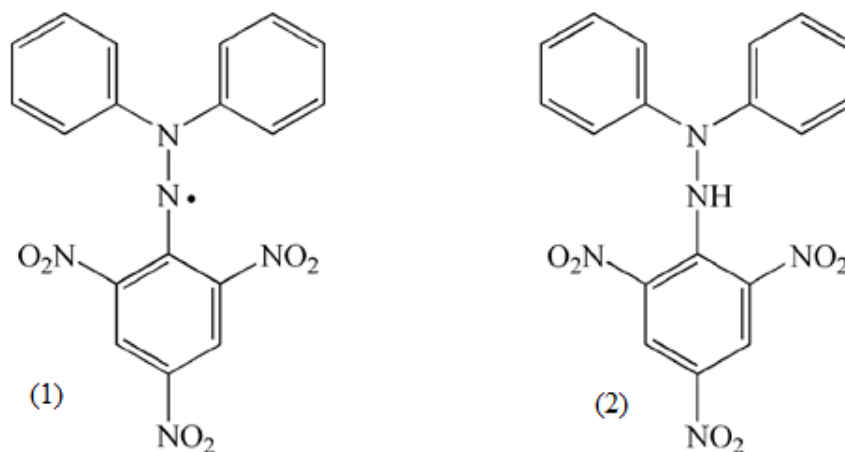


Figura 3.8 – Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH. Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (2016)

Conforme Figura 3.8, a estabilidade do DPPH pode ser explicada a partir de suas ligações duplas alternadas nos anéis benzênicos, que sofrem ressonância capaz de estabilizar a carga eletrônica por dispersá-la por toda molécula (Bozzi, 2011). Tanto o DPPH sólido, quanto a solução contendo DPPH apresentam coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm (Q.Alves *et al.*, 2010).

Tendo em vista essas características do DPPH, esse método de sequestro tem por objetivo estimar o quanto será formado da forma não radicalar do DPPH quando os extratos forem expostos às soluções iniciais de DPPH radicalar, conforme descrito na metodologia utilizada por Lucena *et al.* (2010). No entanto, esse método foi aplicado com algumas modificações próprias necessárias para a adequação aos extratos obtidos neste trabalho, logo seguiu-se o passo-a-passo descrito por Santos (2013a).

De forma prática, o método consiste na preparação de três soluções: solução de DPPH, solução alcoólica de ácido ascórbico e soluções alcoólicas diluídas do extrato seco. Primeiramente, uma solução de DPPH com concentração de 23,6 µg/mL foi preparada a partir de 11,80 mg do mesmo diluídos em 500 mL de etanol. A solução formada foi homogeneizada e transferida para um frasco âmbar envolvido com papel laminado, para o abrigo total da luz. É importante frisar que foi preparada uma solução para cada dia de análise.

Para o preparo da solução de controle positivo (ácido ascórbico) foram diluídas 10,0 mg do mesmo em 100 mL de etanol, gerando uma solução com concentração final de 0,1 mg/mL. Para a curva de ácido ascórbico foi utilizada a Tabela 3.4 na preparação das diluições.

Tabela 3.4 – Quantidade de ácido ascórbico, de etanol e de solução de DPPH para a montagem da curva do padrão

<i>Concentração final das soluções de Ác. Ascórbico</i>	<i>Volume de solução de Ác. Ascórbico a 0,1mg/mL</i>	<i>Volume de etanol PA</i>	<i>Volume de solução do reagente DPPH</i>
0,5 µg/mL	30 µL	570 µL	5400 µL
1,0 µg/mL	60 µL	540 µL	5400 µL
2,0 µg/mL	120 µL	480 µL	5400 µL
3,0 µg/mL	180 µL	420 µL	5400 µL
4,0 µg/mL	240 µL	360 µL	5400 µL

Logo após a preparação das três soluções, essas foram colocadas para reagir e levadas para um ambiente ausente de luminosidade, com temperatura ambiente e sem agitação pelo tempo de 30 minutos. Em seguida, a absorbância da mistura resultante foi lida em um espectrofotômetro (VARIAN modelo 50 conc), no $\lambda = 517$ nm (região UV-visível), em duplicata. Como o etanol apresenta-se em grande quantidade no processo, o mesmo foi utilizado como branco. É importante ressaltar que a concentração final das soluções dos extratos está descrito na Tabela 3.5, partindo de uma solução com concentração inicial de aproximadamente 1,0 mg/mL.

Tabela 3.5 – Quantidade de amostra, de etanol e de solução de DPPH para a análise

<i>Concentração final das soluções amostra</i>	<i>Volume de solução de amostra a 1,0 mg/mL</i>	<i>Volume de etanol PA</i>	<i>Volume de solução do reagente DPPH</i>
1,7 µg/mL	10 µL	590 µL	5400 µL
3,3 µg/mL	20 µL	580 µL	5400 µL
5,0 µg/mL	30 µL	570 µL	5400 µL
10,0 µg/mL	60 µL	540 µL	5400 µL
50,0 µg/mL*	300 µL	300 µL	5400 µL
100,0 µg/mL*	600 µL	0 µL	5400 µL

*Para a definição da faixa de concentração final dos extratos, às vezes, fez-se necessária a utilização de concentrações mais altas de extrato.

O cálculo da percentagem de captura do radical DPPH (AS%) foi realizado conforme a Equação 18, na qual a $ABS_{Controle}$ representa a absorbância da solução controle (solução contendo apenas DPPH e etanol P.A., antes da reação ocorrer) e a $ABS_{Amostra}$ representa a absorbância do meio reacional após a reação entre o controle (DPPH etanólico) e a amostra.

$$AS (\%) = 100 \left(\frac{ABS_{Controle} - ABS_{Amostra}}{ABS_{Controle}} \right) \quad (18)$$

A Figura 3.9 ilustra o princípio da atividade sequestradora do DPPH e a consequente queda no valor da absorbância. A linha rósea indica a solução controle de DPPH antes da reação e a amarela após.

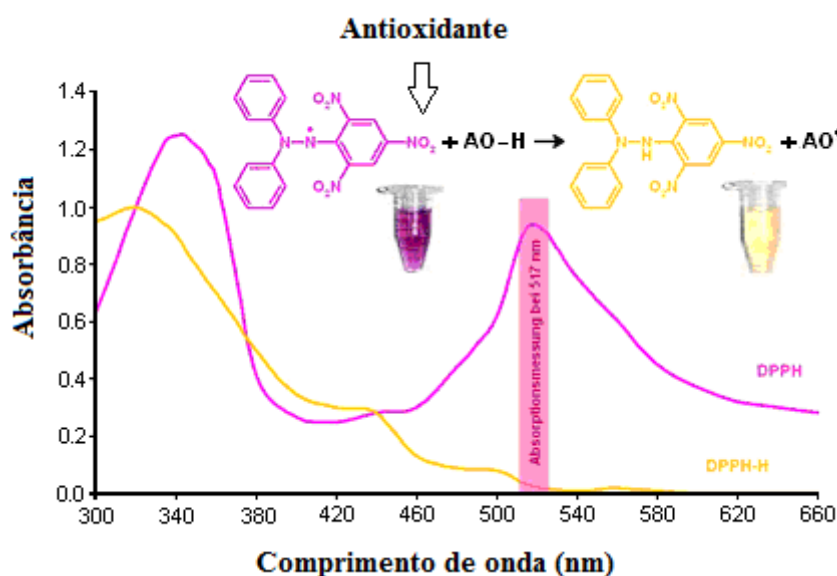


Figura 3.9 – Absorbância em função do comprimento de onda antes e depois da adição de antioxidantes na solução de DPPH. Fonte: Adaptado de Boligon *et al.* (2014)

Os valores de EC_{50} para os extratos foram obtidos por regressão linear da % AS em função da concentração e comparados com o padrão de controle (Ácido ascórbico). O EC_{50} denota a concentração da amostra necessária para reduzir a absorbância a 517 nm em 50%, dessa forma, baixos valores de EC_{50} implicam em altos valores de atividade antioxidante.

3.9 – Determinação do teor de fenólicos totais (TFT)

O teor de fenólicos totais em extratos da *Rumex acetosa* foi determinado aplicando o método de Folin-Ciocalteu, utilizando-se o ácido gálico como padrão e também segundo Lucena *et al.* (2010) com modificações, seguindo as etapas apresentadas por Santos (2013a).

Esse método é espectrofotométrico e foi descrito por Singleton e Rossi em 1965. O mesmo é baseado em uma reação dos compostos a serem analisados com o reagente Folin-Ciocalteu (mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico). Já que, em meio alcalino os compostos fenólicos presentes na amostra reduzem a mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul (média do estado de oxidação dos metais: 5 e 6). Conseqüentemente, seguindo algumas leis da espectrometria e obedecendo limites de absorvância, é possível que a intensidade de absorção da luz na região do visível seja proporcional à concentração de compostos fenólicos (Haminiuk *et al.*, 2012).

Da mesma forma como foi descrito o método anterior, este método, basicamente, também apresenta a preparação de três tipos de soluções principais e a conseqüente reação química desses que apresenta mudança de coloração. As três soluções foram: uma solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15% massa; uma solução de ácido gálico a 0,5 mg/mL e as soluções das amostras dos extratos com concentração de aproximadamente 1 mg/mL.

A primeira solução a ser preparada foi a de Na_2CO_3 , a qual consistiu na diluição de 3,75 g do carbonato de sódio em 25 mL de água destilada. No caso da solução aquosa de ácido gálico, 10 mg do ácido foram diluídas em 10 mL de água destilada, originando uma solução inicial de ácido gálico com concentração de 1,0 mg/mL. No entanto, essa solução foi diluída para 0,5 mg/mL por questões de adequação à metodologia. As diluições que originaram a curva de calibração em ácido gálico estão apresentadas na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Quantidade das substâncias utilizadas na curva de calibração com ácido gálico

<i>Concentração final das soluções de Ác. Gálico</i>	<i>Volume de solução de Ác. Gálico a 0,5mg/mL</i>	<i>Volume de água destilada</i>	<i>Volume do reagente Folin-Ciocalteu</i>	<i>Volume de solução de Na_2CO_3 a 15%</i>
1,0 µg/mL	20 µL	9180 µL	200 µL	600 µL
2,5 µg/mL	50 µL	9150 µL	200 µL	600 µL
5,0 µg/mL	100 µL	9100 µL	200 µL	600 µL
7,5 µg/mL	150 µL	9050 µL	200 µL	600 µL
10,0 µg/mL	200 µL	9000 µL	200 µL	600 µL
12,5 µg/mL	250 µL	8950 µL	200 µL	600 µL
15,0 µg/mL	300 µL	8900 µL	200 µL	600 µL
20,0 µg/mL	400 µL	8800 µL	200 µL	600 µL

Logo após a preparação das três soluções, essas foram colocadas para reagir e levadas para um ambiente ausente de luminosidade, com temperatura ambiente e sem agitação pelo tempo de 2 horas. Em seguida, a absorbância da mistura resultante foi lida em um espectrofotômetro (VARIAN modelo 50 conc), no $\lambda = 760$ nm (região UV-visível), em duplicata.

Por estar em maior quantidade no meio reacional, a água destilada foi utilizada como branco em todas as medições e a curva padrão de concentração de ácido gálico por absorbância foi construída a partir de cada diluição apresentada na Tabela 3.6. De forma análoga, as análises foram realizadas para os extratos da *Rumex acetosa*, no entanto a tabela com as diluições relativas a esses encontra-se disposta no Anexo B deste trabalho.

Dessa forma, o gráfico da absorbância *versus* concentração de ácido gálico funciona como um referencial (curva de calibração) para os extratos da raiz. Esse gráfico apresenta também uma regressão linear, a qual os valores de absorbância obtidos para cada extrato podem ser aplicados nessa regressão gerando o teor de fenólicos totais (TFT) em equivalente de ácido gálico (*mg EAG/L*). Esse valor de concentração pode ser convertido em uma razão de massa de equivalente de ácido gálico por grama de extrato a partir da Equação 19.

$$TFT \left(\frac{mg \ EAG}{g_{Extrato}} \right) = \left[\frac{1000 * EAG(mg/L)}{C_{Amostra}(mg/L)} \right] = \left[\frac{1000 * EAG(\mu g/mL)}{C_{Amostra}(\mu g/mL)} \right] \quad (19)$$

Em que: EAG é o equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão e $C_{Amostra}$ representa a concentração das amostras.

3.10 – Análises cromatográficas (HPLC)

A composição dos extratos em termos de *trans*-resveratrol e *cis*-resveratrol, emodina e piceid foram estimadas a partir da utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Essa cromatografia tem por objetivo a separação e identificação dos compostos presentes em uma mistura líquida a partir de uma fase estacionária fixa e uma fase móvel líquida. Nesse processo, a mistura é solubilizada na fase móvel que percola a fase estacionária porosa de baixa permeabilidade sob pressão visando a eluição dos compostos (Santos, 2013a).

A separação ocorre à medida que a fase móvel percola a estacionária e os diversos compostos sofrem maior ou menor atração por esta, alterando os tempos de residência das substâncias. Dessa forma, os compostos são particionados e identificados posteriormente por detectores em tempos de retenção distintos (Santos, 2013a).

As análises HPLC-UV dos extratos obtidos foram realizadas no Instituto de Química da UFRN, seguindo a metodologia de Benová *et al.* (2010). Para essa metodologia foi utilizado um cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-20A Prominence) dotado de um detector UV-VIS e um arranjo fotodiodo (DAD) equipado com auto-amostrador e duas bombas próprias do equipamento.

A partir do sinal analítico monitorado via computador, a área dos picos presentes no cromatograma foi calculada utilizando o software LabSolutions LC disponibilizado no sistema. A fase móvel é composta por uma fase “A” (água ultra pura) e por uma fase “B” (acetoneitrila). A eluição ocorreu de forma gradiente e com vazão total de 0,5 mL/min, apresentando a seguinte orientação: 0-10 min, 10% de B; 10-20 min, 10-40% de B; 20-25 min, 40-80% de B; 25-35 min, 80-100% de B.

Para o processo de separação, foi utilizada a coluna Phenomenex® C8 (125 milímetros × 4mm x 5µm), conectada a uma pré-coluna, também C8, com o intuito de proteger a coluna. As amostras foram filtradas com membranas de 0,45 µm e todos os solventes foram previamente desgaseificados a fim de tornar mais precisas as medições.

As injeções no sistema cromatográfico foram de 20 µL de extrato por corrida, com coluna a temperatura controlada de 35 °C e detecção com comprimento de onda de 306 nm. Os compostos individuais foram identificados por comparação dos tempos de retenção de seus padrões e suas concentrações foram determinadas a partir de curvas de calibração.

3.11 – Modelagem matemática das curvas cinéticas das SFEs e PLEs

A partir dos dados experimentais obtidos nas condições descritas na Tabela 3.7, foram realizados ajustes dos parâmetros do processo com a utilização de modelos reconhecidos na literatura, como Crank (1975), Martínez *et al.* (2003) e Sovová (1994).

Tabela 3.7 – Condições das extrações utilizadas na modelagem

<i>Extração</i>	<i>Pressão</i> (MPa)	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Cossolvente</i> (% v/v)	<i>Vazão total</i> (mL/min)
SFE	20	60	15	1
SFE	20	60	15	4
SFE	15	40	35	1
PLE	25	40	100	1
PLE	15	80	100	1

Para o ajuste das curvas cinéticas foi utilizado o *software Tecanalysis* (Martínez *et al.*, 2003). Além dos ajustes das curvas, os modelos estimam parâmetros como:

- Modelo de Crank: D , coeficiente de difusão do soluto na partícula;
- Modelo de Sovová: t_{CER} e k_{YA} , em que t_{CER} é o tempo de duração da etapa de extração constante em SFE e k_{YA} é o coeficiente de transferência de massa na fase fluida;
- Modelo de Martínez *et al.*: t_{mi} e bi , em que t_{mi} é o instante em que a taxa de extração alcança o seu valor máximo e enquanto bi está relacionado à taxa de extração (Galvão, 2009).

Os dados de entrada que alimentaram o software para o ajuste das curvas são: temperatura, porosidade do leito, rendimento (massa de extrato / matéria-prima), densidade do sólido (real) e do solvente, vazão do solvente, altura do leito, diâmetro da partícula, massa alimentada de matéria-prima, solubilidade na etapa CER (g/g; usado apenas para Sovová) e viscosidade. A temperatura, vazão de solvente, massa alimentada de matéria-prima, altura do leito e viscosidade são parâmetros de indicação direta do processo, sem necessidade de metodologia de medição. No Anexo C encontram-se tabelas com os dados de entrada para as modelagens realizadas neste trabalho.

A metodologia para a determinação da densidade real do sólido foi adaptada de Galvão (2009). Esse método foi proposto por Buczer e Geldart (1986) e baseia-se na picnometria. Para isso, inicialmente, um picnômetro de 50 mL foi limpo e seco e preenchido com uma espécie de “fluido” picnométrico constituído de microesferas homogêneas de aproximadamente 0,2 mm. Dessa forma, foi possível o cálculo da densidade desse “fluido”.

No passo seguinte, pesou-se cerca de 3 gramas da amostra e em seguida o picnômetro vazio e seco foi pesado novamente. O próximo passo foi acondicionar a matéria-prima no interior do picnômetro, juntamente com o “fluido” picnométrico. O acondicionamento foi realizado de forma pausada e lenta, com o intuito de obter a ocupação máxima do picnômetro.

Por fim, a partir do balanço de massa do picnômetro com a matéria prima e da densidade estimada do “fluido” picnométrico é possível o cálculo da densidade real. A densidade aparente foi estimada a partir da razão entre massa de matéria prima e volume total ocupado pela mesma (Galvão, 2009). Para o cálculo da porosidade utilizou-se a Equação (20).

$$\varepsilon = 1 - (\rho_a / \rho_r) \quad (20)$$

Em que: ε representa a porosidade, ρ_a representa a densidade aparente e ρ_r representa a densidade real (Galvão, 2009).

O rendimento em massa foi obtido a partir da razão entre a massa total de extrato obtido e a massa de matéria-prima alimentada ao extrator. A densidade e a viscosidade do solvente foram encontradas a partir dos trabalhos de Poehler & Kiran (1997) e Fields *et al.* (2011) que estimam esses parâmetros para misturas CO₂/etanol.

O diâmetro de partícula utilizado em todos os cálculos foi de 1,42 mm, valor referente ao diâmetro médio das partículas que passaram na peneira de 10 Mesh e ficaram retidas na peneira de 20 Mesh (-10/+20 Mesh) conforme processo de peneiramento descrito na Seção 3.1. A solubilidade é calculada seguindo a metodologia descrita na Seção 3.2.1 deste trabalho.

Capítulo 4

Resultados e discussões

4. Resultados e discussões

Os resultados experimentais estão apresentados da seguinte forma: primeiramente, aborda-se a apresentação e discussão dos resultados da extração supercrítica (SFE), avaliando-se o efeito da vazão perante a solubilidade e o rendimento de extração; em seguida, avalia-se a concentração de solvente e como essa atua no rendimento, parâmetros cinéticos e solubilidade. Na sequência, apresentam-se as isotermas do rendimento global e os métodos de análise de teor e composição dos extratos SFE. A próxima técnica de extração a ser apresentada é a extração com líquidos pressurizados (PLE). Com relação a essa técnica, são discutidos diversos aspectos, tais como: os efeitos das variáveis no processo extrativo, o comportamento do rendimento e composição perante a utilização de apenas um solvente ou de múltiplos solventes de forma sequencial. Em seguida, apresenta-se uma ampla discussão sobre diversos aspectos das extrações SFE, PLE, Micro-ondas e técnicas convencionais. Por fim, apresenta-se um estudo acerca da aplicação de modelos da literatura nas curvas de extração SFE e PLE.

4.1 – Extração com fluido supercrítico (SFE)

4.1.1 – Efeito da vazão sobre os parâmetros cinéticos de extração, rendimento e solubilidade

Antes de iniciar a discussão dos efeitos dessas variáveis, é importante mensurar-se o efeito da vazão sobre a solubilidade na etapa CER. Geralmente, a etapa CER responde por boa parte do extrato total obtido em SFEs (França *et al.*, 1999), já que é durante essa etapa que grande parte do soluto de fácil acesso deve ser solubilizado, segundo Sovová, *et al.* (2001) e Ferreira *et al.* (1993). Como as SFEs operam com leitos fixos dinâmicos, esse processo de solubilização pode ser afetado significativamente pela vazão, já que em baixas vazões totais ocorre o efeito de dispersão axial que interfere no processo, enquanto que em altas vazões o tempo de contato entre solvente e soluto é curto e pode não ser suficiente para a saturação (Sousa, *et al.*, 2000; Rodrigues, *et al.*, 2002).

Devido a tal fenômeno, optou-se por, nesse primeiro momento, avaliar a influência da vazão da mistura solvente sobre o rendimento da extração e as curvas cinéticas de extração, bem como determinar a solubilidade na etapa CER. Os procedimentos e os limites adotados foram esclarecidos no Capítulo 3, Seção 3.2. A Tabela 4.1 apresenta os resultados da

avaliação realizada a 20 MPa, 60 °C e 15% de etanol (v/v), conforme Tabela 3.1, com faixa de vazão total (CO₂ + etanol) compreendida entre 1-4 mL/min.

Tabela 4.1 – Avaliação de parâmetro cinético na etapa CER obtido a partir da curva cinética total de extração nas condições 20 MPa; 60 °C; 15% EtOH

<i>P</i> (MPa)	<i>T</i> (°C)	<i>C</i> _{EtOH} (% v/v)	<i>Q</i> _T (mL/min)	<i>R</i> _{total} (%)	<i>M</i> _{CER} (g _e /min)	<i>Y</i> _{CER} (g _e /g _s)	<i>R</i> _{CER} (%)
20	60	15	1,0	0,44	1,29E-03	1,33E-03	0,23
20	60	15	1,5	0,53	1,50E-03	1,03E-03	0,34
20	60	15	2,0	0,61	2,04E-03	1,05E-03	0,34
20	60	15	3,0	0,70	3,09E-03	1,07E-03	0,47
20	60	15	4,0	0,78	4,35E-03	1,12E-03	0,48

P= Pressão total do extrator; *T*=Temperatura do extrator; *C*_{EtOH}= Concentração de cossolvente; *Q*_T= Vazão total de solvente; *R*_{total} = Rendimento total de extração (% g_e/g_a); *R*_{CER}= Rendimento de extração na etapa CER(% g_e/g_a); *Y*_{CER}= Relação da taxa de extrato e de solvente; *M*_{CER}=Taxa de extração durante etapa CER extrato, g_a gramas de amostra e g_s gramas de solvente.

A partir da Tabela 4.1, observa-se que o rendimento total de extração (*R*_{total}) variou de 0,44 a 0,78%, indicando que o aumento da vazão total da mistura solvente favoreceu o processo. Fato possivelmente explicado a partir de uma maior extração de soluto promovida pelo aumento da interação solvente-soluto. Nesse caso, a razão da quantidade de solvente por massa de matéria-prima é aumentada, gerando um maior contato entre os solutos presentes no sólido e a mistura solvente, justificando os maiores rendimentos. No entanto, esse comportamento deve ser restrito a uma determinada faixa de vazão, já que vazões muito altas podem apresentar um comportamento inverso ao reduzirem o tempo de solubilização, ocasionando baixo rendimento por tempo, conforme abordado na literatura (Ferreira *et al.*, 1993; França *et al.*, 1999).

A Figura 4.1 ratifica esse comportamento, já que a mesma apresenta o gráfico da influência da vazão sobre o rendimento extrativo (nesse caso, tendo por ordenada o rendimento e por abscissa a massa acumulada da mistura solvente: 85% CO₂ e 15% de etanol). Comportamento semelhante foi observado no trabalho de Zuknik *et al.* (2016), no qual os autores estudaram diversas vazões em SFEs com o intuito de obter a solubilidade dos óleos essenciais do coco virgem no solvente e por Jesus *et al.* (2013), quando obtiveram óleo de palma a partir da utilização de extração supercrítica (SFE).

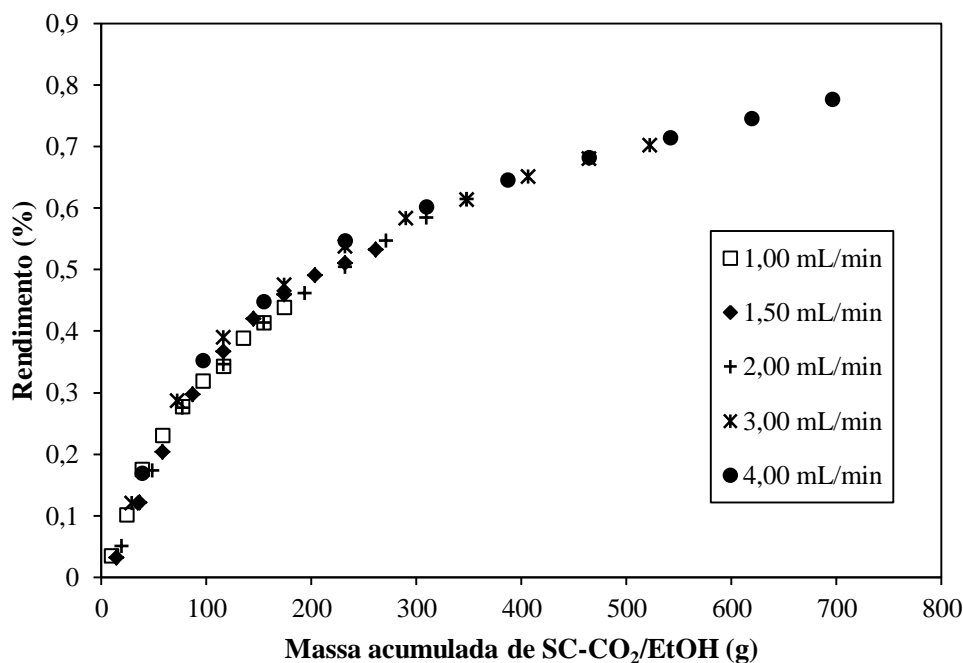


Figura 4.1 – Influência da vazão de solvente (CO₂ + 15% EtOH) sobre a cinética da extração de *Rumex acetosa* a 60 °C e 20 MPa

Ainda em relação à Tabela 4.1 e em complemento com a Figura 4.2 (curva SFE nas condições 20 MPa; 60 °C; 15% EtOH; 1 mL/min com ajustes das retas CER e FER), calculou-se a razão soluto/solvente durante a etapa CER, denominada de solubilidade, obtendo-se valores entre $1,33 \times 10^{-3}$ (g_e/g_s) e $1,12 \times 10^{-3}$ (g_e/g_s) com a variação de vazão total. Essa pequena variação de solubilidade para a faixa de vazão compreendida entre 1 mL/min e 4 mL/min pode indicar uma baixa dependência da solubilidade perante a variação da vazão total, ou ainda uma independência, indicando a saturação do extrato de *Rumex acetosa* em SC-CO₂/EtOH para esse limites, conforme observado por outros autores como: Zuknik *et al.* (2016) para extração de óleo de coco virgem e Sousa *et al.* (2000) na extração de óleo essencial de alecrim.

Pode-se afirmar que esses resultados confirmam que os experimentos foram conduzidos no limite onde existe equilíbrio entre soluto e mistura solvente, fazendo com que exista a saturação do soluto na mistura solvente (França *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2013). Diante dessas observações e resultados obtidos nessa primeira etapa, adotou-se a vazão de 1 mL/min para as etapas seguintes deste trabalho.

A Figura 4.2 também ilustra a estimativa do t_{CER} , para a condição de vazão de 1 mL/min, a partir dos cruzamentos da retas das etapas CER e FER e a fração recuperada de soluto por toda a extração. Tendo em vista essa figura e considerando que a comparação entre os valores de $R_{CER}(\%)$ e $R_{total}(\%)$ presentes na Tabela 4.1 variam proporcionalmente com

ordem de no mínimo 1,5 e no máximo 1,9, aproximadamente. Pode-se afirmar que a etapa CER é responsável por extrair, em média, aproximadamente 60% do soluto coletado para o tempo total de extração deste trabalho. Esse resultado é corroborado pela literatura, visto que, de 50% a 90% do soluto extraível é em geral obtido na etapa CER (Moura *et al.*, 2012).

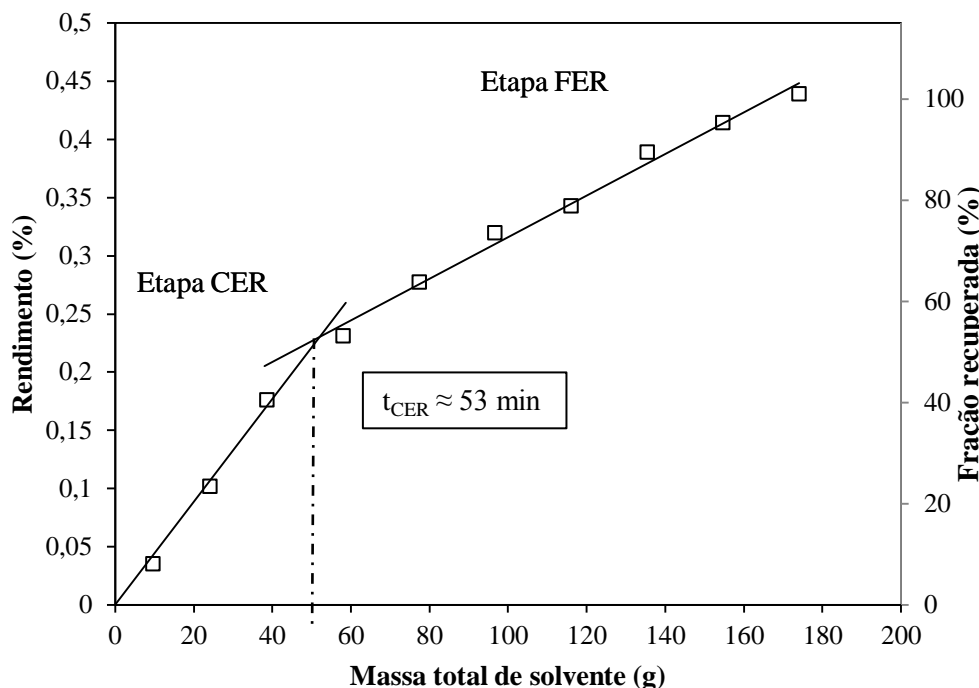


Figura 4.2 – Curva total de extração com ajustes das retas da etapas CER e FER nas condições 20 MPa; 60 °C; 15% EtOH; 1 mL/min, sendo CER (etapa com taxa constante de extração) e FER (etapa com taxa decrescente de extração)

4.1.2 – Efeito da concentração de etanol: cinética de extração, rendimento e solubilidade

De forma geral, a adição de etanol ao CO₂ supercrítico ocasiona um aumento da polaridade da mistura solvente, facilitando assim a remoção dos solutos polares de matrizes sólidas alterando suas propriedades extrativas como difusividade, densidade e viscosidade (Kong *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Dessa forma, conforme descrito no Capítulo 3, Seção 3.2 deste trabalho, foram realizados experimentos supercríticos em que a concentração de etanol foi avaliada, conforme apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Avaliação do efeito da concentração de etanol sobre o rendimento total e a solubilidade (Y_{CER}) em SFES da *Rumex acetosa* a 40 °C, 15 MPa e $Q_T = 1$ mL/min

P (MPa)	T (°C)	C_{EtOH} (% v/v)	Q_T (mL/min)	R_{total} (%)	Y_{CER} (g _e /g _s)
15	40	5	1,0	0,18	0,22E-03
15	40	15	1,0	0,29	0,57E-03
15	40	25	1,0	0,73	2,55E-03
15	40	35	1,0	1,07	4,50E-03
15	40	45	1,0	1,03	4,57E-03

P= Pressão total do extrator; T=Temperatura do extrator; C_{EtOH} = Concentração do cossolvente; Q_T = Vazão total de solvente; R_{total} = Rendimento total de extração (% g_e/g_a); Y_{CER} = Relação da taxa de extrato e de solvente (solubilidade).

Percebe-se pela Tabela 4.2 que o aumento da concentração de etanol gera ganho de rendimento em massa e aumento da solubilidade do soluto na mistura solvente nas SFES com cossolvente. Para SFES da *Rumex acetosa* a 40 °C, 15 MPa e $Q_T = 1$ mL/min com 5% (v/v) de etanol e com 35% (v/v) de etanol, os valores de rendimento foram 0,18% e 1,07%, respectivamente, enquanto as demais concentrações apresentaram valores intermediários de rendimento. A solubilidade variou de $0,22 \times 10^{-3}$ (g_e/g_s) e $4,57 \times 10^{-3}$ (g_e/g_s) quando ocorreu o aumento da concentração de etanol de 5% para 45%. Esses resultados são ratificados pelas Figuras 4.3 e 4.4, as quais indicam que o aumento da concentração do cossolvente em SC-CO₂ acarretou no aumento na eficiência extrativa na faixa entre 5 – 35% etanol (v/v).

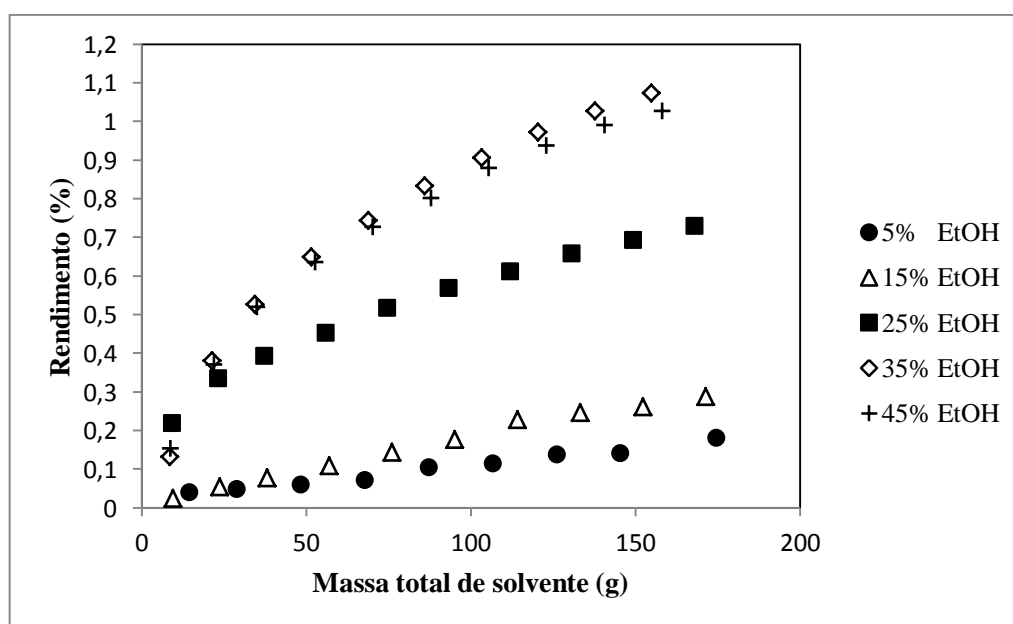


Figura 4.3 – Influência da concentração de etanol na mistura solvente sobre a cinética da extração de *Rumex acetosa* nas condições T= 40 °C, P=15 MPa, $Q_T=1$ mL/min e 180 min.

Segundo Yang & Wei (2015), o SC-CO₂ na presença do cossolvente etanol causa uma melhora na difusão dos compostos polares presentes na matriz sólida, tendo em vista o inchaço causado (aumento da área extrativa) e a afinidade entre os solventes e os compostos da matéria prima. Ainda segundo estes mesmos autores, quando o cossolvente é adicionado continuamente em SC-CO₂, é previsto que a interação do cossolvente com a matriz vegetal seja maior durante as fases iniciais de extração, sendo esta interação estabilizada durante as etapas seguintes da extração. De forma análoga, no presente trabalho da extração da *Rumex acetosa*, ao adicionar-se cossolvente, proporcionou-se um incremento no rendimento. Fenômeno semelhante também foi observado nos processos de extração supercrítica da *Hedyotis corymbosa* (Yang & Wei, 2015) e extração de fenólicos da *Cajanus cajan* (L.) Millsp (Kong *et al.*, 2009).

Ainda na Figura 4.3 percebe-se um bom comportamento da curva cinética de extração, no entanto, a etapa difusional não se apresentou tão claramente visível, tendo em vista que seriam necessários maiores tempos de extração para isso. No entanto, a etapa difusional é responsável por um baixo percentual do rendimento extrativo (Sousa *et al.*, 2002; Moura, *et al.*, 2012), não alterando muito os resultados obtidos. A Figura 4.4 apresenta o comportamento tanto do rendimento quanto da solubilidade na etapa CER perante a concentração de etanol.

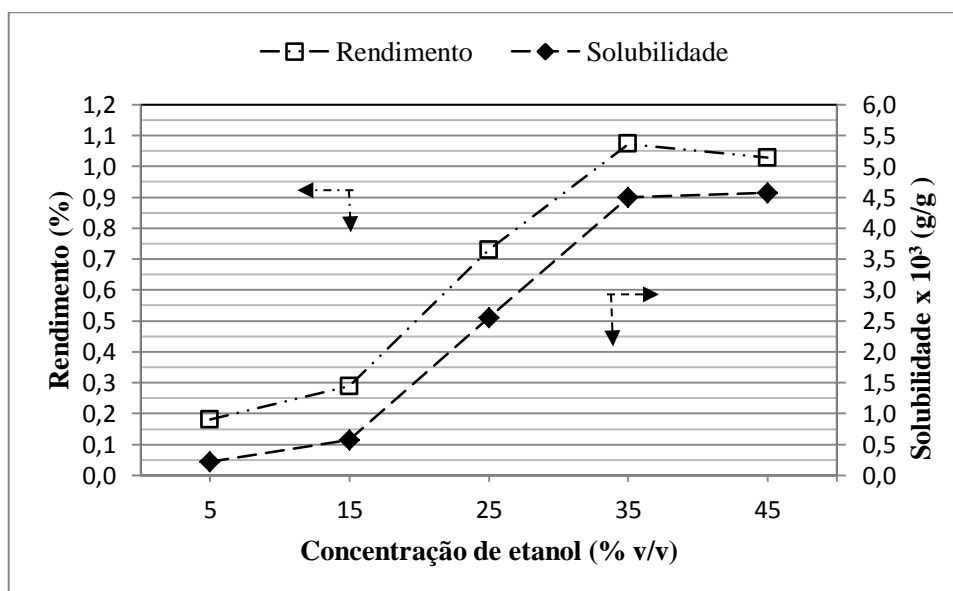


Figura 4.4 – Influência da concentração de etanol na mistura solvente sobre a rendimento (R_T) e solubilidade (Y_{CER}) da extração de *Rumex acetosa* com dióxido de carbono a 40 °C e 15 MPa, empregando uma vazão total da mistura solvente de 1 mL/min.

No tocante a Figura 4.4, percebe-se também um comportamento bastante similar entre o rendimento e a solubilidade, evidenciando assim a relação de proporcionalidade direta entre solubilidade (soluto na mistura de solventes) e rendimento extrativo. No entanto, os resultados estabilizaram na concentração de 35% de etanol, oscilando um pouco na concentração de 45%, o que pode ser atribuído a complexidade das composições químicas, devido a pouca investigação da matéria prima e a conseqüente deficiência no conhecimento de todos os compostos presentes.

4.1.3 – Isotermas de rendimento global e solubilidade

De forma geral, a influência da temperatura e da pressão sobre o rendimento global se assemelha ao da solubilidade do soluto em solventes supercríticos. A sobreposição dos dois fatores que atuam de forma contrária, pressão de vapor e densidade, definirá o impacto final nas isotermas. A Tabela 4.3 e a Figura 4.5 ilustram o comportamento do rendimento e da solubilidade para as isotermas de 40 e 60 °C, em três níveis de pressão (15, 20 e 25 MPa).

Tabela 4.3 – Avaliação dos efeitos da temperatura e da pressão sobre a solubilidade (Y_{CER}) e rendimento total das SFEs em *Rumex acetosa*

P (MPa)	T (°C)	C_{EIOH} (% v/v)	Q_T (mL/min)	R_{total} (%)	Y_{CER} (g _e /g _s)
15	40	15	1,0	0,29	0,57E-03
20	40	15	1,0	0,33	0,96E-03
25	40	15	1,0	0,40	1,14E-03
15	60	15	1,0	0,40	0,81E-03
20	60	15	1,0	0,44	1,26E-03
25	60	15	1,0	0,38	1,14E-03

P= Pressão total do extrator; T=Temperatura do extrator; C_{EIOH} = Concentração do cossolvente; Q_T = Vazão total de solvente; R_{total} = Rendimento total de extração (% g_e/g_a); Y_{CER} = Relação da taxa de extrato e de solvente (solubilidade).

Observa-se que as duas propriedades físico químicas afetaram o rendimento e a solubilidade, ou seja, a solubilidade sofreu influência direta de temperatura e pressão, que estão diretamente ligadas aos efeitos de pressão de vapor do soluto e da densidade do solvente, afetando diretamente o desempenho geral (Benová *et al.*, 2010; Kraujalis & Venskutonis, 2013).

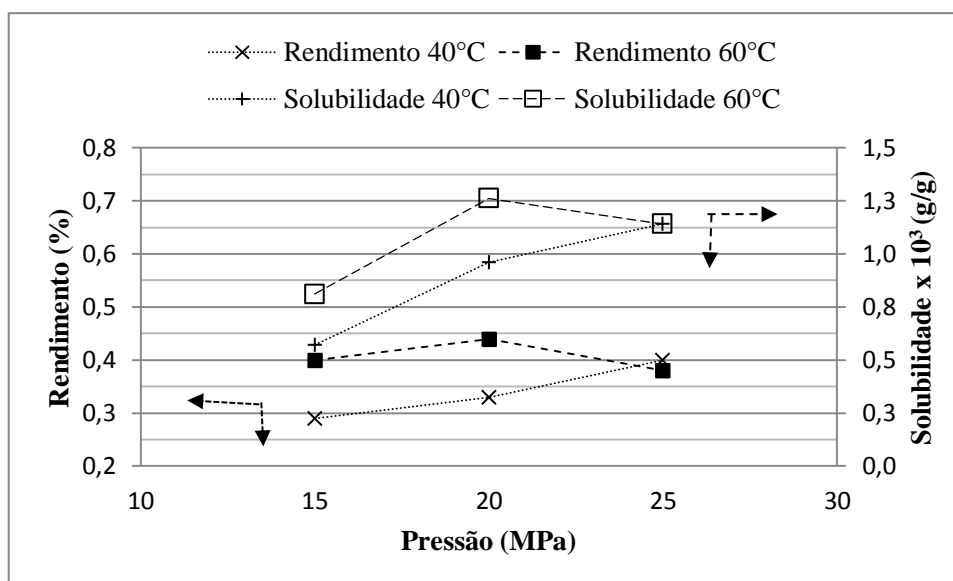


Figura 4.5 – Efeitos da temperatura e pressão sobre a solubilidade e rendimento global dos extratos (SFE) da *Rumex acetosa*, nas condições $C_{EtOH} = 15\%$ e $Q_T = 1\text{mL/min}$.

Na faixa de pressão entre 15 – 20 MPa (Figura 4.5), verificou-se um aumento do rendimento e da solubilidade, com a elevação da temperatura, bem como através da elevação da pressão, para ambas as isotermas (40 e 60 °C). Este efeito pode ser explicado a partir do aumento da pressão de vapor do soluto e consequente facilitação da extração pelo solvente supercrítico e sua penetração nos poros da matriz sólida, propiciando um maior contato do solvente com o soluto a ser extraído (Benová *et al.*, 2010; Jesus *et al.*, 2013; Pederssetti *et al.*, 2011). O aumento da temperatura também favorece o rendimento pela melhoria das propriedades de transporte do soluto e solvente, diminuindo a viscosidade e elevando a difusividade destes. Este fenômeno já foi observado em extrações SC-CO₂ de cafeína do chá, caule e resíduos de fibras (Içen & Guru, 2010), de piceid, resveratrol e emodina de *Japanese knotweed* (Benová *et al.*, 2010) e flavonoides na *Citrus depressa* Hayata (Lee *et al.*, 2010).

Entretanto, nas proximidades entre 20 – 25 MPa, observou-se uma leve diminuição da solubilidade e do rendimento com o aumento da temperatura numa dada pressão, ocasionando uma convergência das duas isotermas (40 e 60 °C). Nessa região, para a faixa de temperatura utilizada, o rendimento e a solubilidade não sofreram influências acentuadas da temperatura, possivelmente devido à complexidade da composição química do extrato, o que pode justificar tendências diferentes do esperado. Comportamento semelhante também foi encontrado por Leal *et al.*, 2008, no qual o extrato de folhas de manjeriço apresentou três pontos de inversão (entre 10 – 30 MPa e 30 – 50 °C) no que diz respeito ao rendimento, e consequente solubilidade.

4.1.4 – Teor de fenólicos totais (TFT) e atividade antioxidante (EC₅₀)

Para a estimativa da atividade antioxidante de todos os extratos deste trabalho, foi utilizado o método de sequestro do DPPH, enquanto que para a estimativa do teor de fenólicos totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu, conforme detalhado no Capítulo 3, nas secções 3.8 e 3.9, respectivamente. Dentro desse contexto, é importante reiterar o comportamento inversamente proporcional do EC₅₀ com a atividade antioxidante.

Dentro desse contexto, a Figura 4.6 apresenta os valores das atividades antioxidantes e os teores de fenólicos totais referentes às faixas da vazão total de mistura solvente (1 – 4 mL/min), da concentração de cossolvente (5 – 45%), da temperatura (40 – 60 °C) e a pressão (15 – 25 MPa). Evidenciando, dessa forma, o efeito de cada variável sobre esses teores.

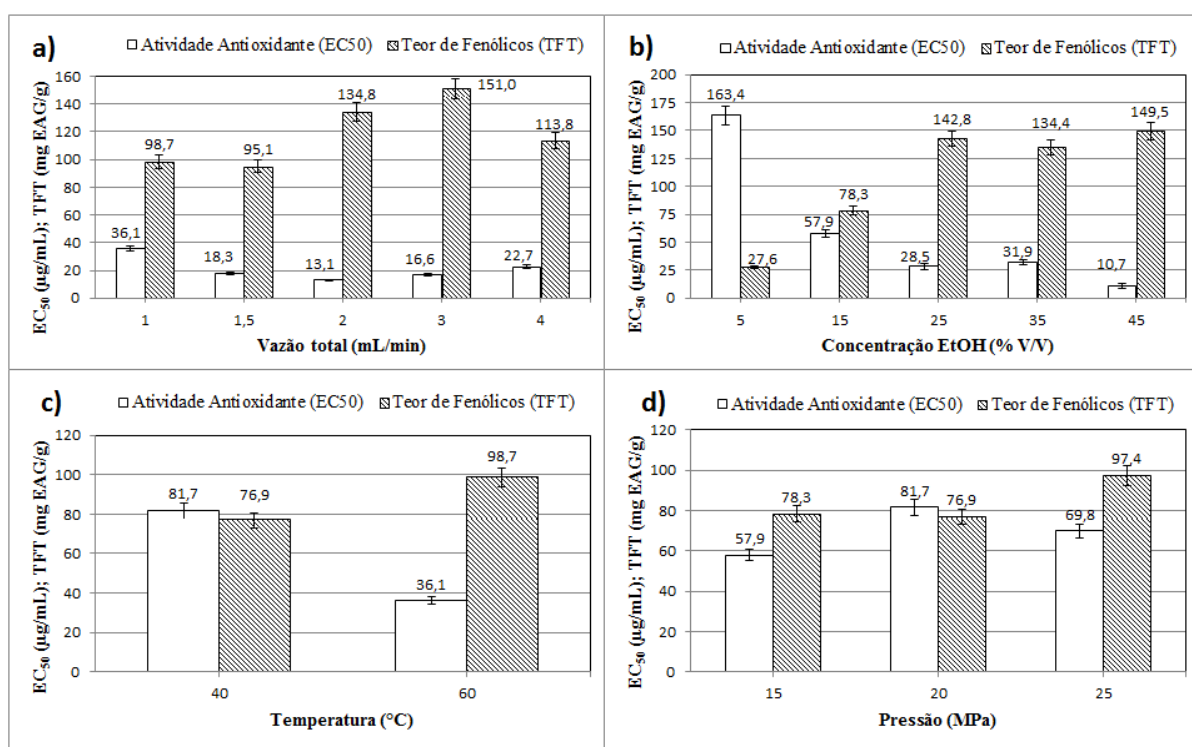


Figura 4.6 – Efeito das variáveis de processo no teor de fenólicos totais (TFT) e Atividade antioxidante. (a) Efeito da vazão total de solvente: 20 Mpa, 60 °C e 15% de etanol; (b) Efeito da concentração do cossolvente na mistura solvente: 15 Mpa, 40 °C e 1 mL/min de vazão total; (c) Efeito da temperatura: 20 MPa, 1 mL/min e 15% de etanol; (d) Efeito da pressão: 40 °C, 1 mL/min e com 15% de etanol.

Os resultados indicaram que os extratos obtidos (SFE) da raiz da *Rumex acetosa* apresentaram teores fenólicos totais (TFT) compreendidos entre 27,6 e 151,0 mg EAG/g_e, dependendo das condições experimentais utilizadas. Essa variação do TFT ocorreu em virtude, principalmente, do aumento da concentração do etanol (cossolvente) na mistura

solvente (Figura 4.6b); esse fenômeno é principalmente atribuído ao aumento do poder de solvatação de compostos mais polares conforme é aumentada a polaridade da mistura solvente com a adição de etanol (Marques *et al.*, 2016; Adil *et al.*, 2007; Akay *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012b). A adição do etanol em concentrações compreendidas entre 25% e 45% foram mais favoráveis à extração de fenólicos.

No tocante a influência da temperatura da SFE sobre o teor de compostos fenólicos, percebe-se uma influência positiva, conforme observado na Figura 4.6c. Quando aumentou-se a temperatura de 40 °C para 60 °C, o teor de fenólicos apresentou um acréscimo de aproximadamente 28% em seu valor inicial. Esse comportamento já era esperado, tendo em vista que Santos (2013a) também observou o mesmo fenômeno ao extrair compostos fenólicos da *Rumex acetosa*. Isso se deve, provavelmente, ao aumento da solubilidade do soluto no solvente a partir do aumento da difusividade do solvente e da pressão de vapor do soluto e conseqüente aumento do processo de transferência de massa (entre soluto e solvente) que ocorre com o aumento da temperatura (Kazan *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2012; Santos, 2013a). Outros autores como Lu *et al.* (2006) presenciaram incrementos no rendimento de extração, ao aumentarem a temperatura de processo de extração supercrítica (CO₂ + cossolvente) em experimentos realizados com as raízes da *Polygonum cuspidatum*, planta da mesma família que a *Rumex acetosa*.

No entanto, o comportamento da pressão não foi muito acentuado, embora tenha alcançado 97,4 mg EAG/g_e na região de maior pressão (25 MPa). Esse comportamento já foi observado por Santos (2013a) quando utilizou SFE na *Rumex acetosa* e percebeu que a pressão não influenciava significativamente no rendimento da extração e nem no teor de fenólicos. Benová, *et al.* (2010) perceberam que para o uso de extração supercrítica em raízes da *Japanese knotweed (Polygonum cuspidatum Siebold & Zucc.)*, planta também pertencente a mesma família da *Rumex acetosa (Polygonaceae)*, a pressões mais baixas que 250 bar, não se observou influência significativa sobre o rendimento de extração.

De forma geral, os valores de TFT encontrados para os extratos da *Rumex acetosa* foram interessantes, quando comparados com plantas da mesma família (*Polygonaceae*) (Benová, *et al.*, 2010) e com os resultados de Lucena *et al.* (2010) que apresentam reconhecido teor de compostos fenólicos em diversos tipos de vinhos brasileiros (ricos em resveratrol) com valores encontrados entre 53,9 mg EAG/g e 677,8 mg EAG/g. Takeoka *et al.* (2013) quantificaram o teor de compostos fenólicos em cerca de 29 variedades de *Rheum spp.* (espécie rica em antraquinonas) e seus valores variaram entre 6,7 mg EAG/g e 41,7 mg EAG/g.

Considerando a avaliação da atividade antioxidante (EC_{50}) dos extratos obtidos por SFE, percebe-se que a mesma ficou compreendida entre 10,7 e 163,4 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4.6), dependendo das variáveis de processo utilizadas. Para o caso da SFE em raízes da *Rumex acetosa*, Santos (2013a) percebeu que o comportamento da atividade antioxidante apresentava relação com o teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos. No entanto, esse comportamento ocorre de forma inversa, já que a EC_{50} diminui quando os extratos apresentam altos teores de compostos fenólicos (antioxidantes reconhecidos na literatura).

Consequentemente, de forma análoga ao TFT, percebe-se uma forte influência do aumento da atividade antioxidante (diminuição do EC_{50}) com o aumento da concentração de etanol (Figura 4.6b). Este fato, novamente é atribuído ao aumento da polaridade da mistura solvente com a adição de etanol, o que incrementa a solvatação de compostos fenólicos com reflexo na atividade antioxidante dos extratos (diminuição do EC_{50}) (Marques *et al.*, 2016; Adil *et al.*, 2007; Akay *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012b). Temperaturas mais elevadas (60 °C) foram mais favoráveis para a extração de compostos com maior atividade antioxidante (Figura 4.6.c). A influência da vazão a partir de 1,5 mL/min e da pressão sobre a atividade antioxidante (EC_{50}) dos extratos foi baixa quando comparada com as influências das demais variáveis (Figuras 4.6a,d).

De forma geral, os resultados obtidos corroboram aqueles de Sousa *et al.* (2007), que quantificaram o poder antioxidante (EC_{50}) de cinco plantas medicinais, reconhecidas popularmente por sua ação cicatrizante, com valores de EC_{50} entre 27,6 e 111,1 $\mu\text{g/mL}$. Para esse caso, os valores de EC_{50} apresentaram a mesma ordem de grandeza, no entanto os extratos da *Rumex acetosa* mostraram-se ainda mais antioxidantes, já que apresentaram os menores valores de EC_{50} . Quando comparados com o padrão de controle utilizado (ácido ascórbico, forte antioxidante da literatura) que obteve EC_{50} de 2,20 $\mu\text{g/mL}$, conforme descrito na Tabela 3.4, seção 3.8 deste trabalho, pode-se afirmar que foram obtidos extratos com considerável poder antioxidante, dependendo das condições de processo.

4.1.5 – Composição dos extratos SFE

A partir de metodologia de análise em HPLC, foram identificados os principais compostos presentes nos extratos cujos picos apresentaram os seguintes tempos de retenção: emodina ($t_r = 28,9$ min), *trans*-resveratrol ($t_r = 24,0$ min), *cis*-resveratrol ($t_r = 25,2$ min) e piceid ($t_r = 20,5$ min), de acordo com a Figura 4.7.

No entanto, todos os extratos oriundos da extração supercrítica e das demais extrações apresentaram valores de concentração abaixo do nível de detecção do método utilizado para os compostos: *cis*-resveratrol e piceid. Dessa forma, ambos não foram abordados nesse trabalho de forma significativa.

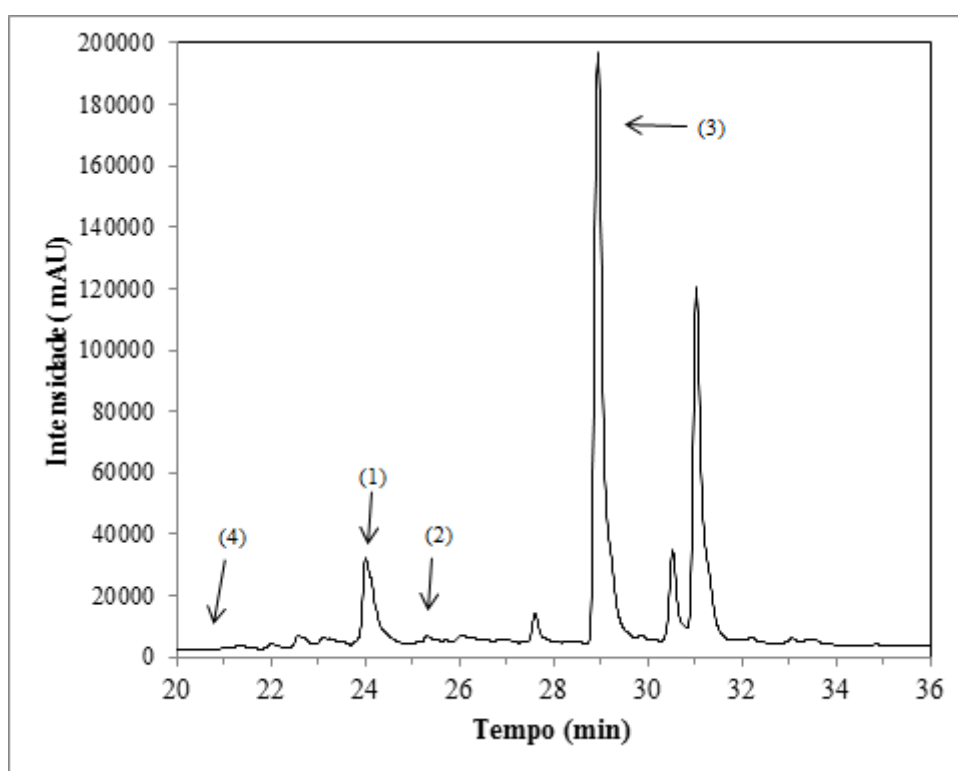


Figura 4.7 – Cromatograma típico da SFE: 15 MPa, 35% EtOH; 40 °C e 1 mL/min. (1) *Trans*-resveratrol; (2) *Cis*-resveratrol; (3) Emodina; (4) Piceid.

Os valores da composição (concentração de *trans*-resveratrol e emodina) dos extratos da SFE da *Rumex acetosa* foram dispostos graficamente na Figura 4.8, que apresenta os resultados oriundos das variações dos parâmetros: concentração de cossolvente (a), vazão (b), temperatura (c) e pressão (d).

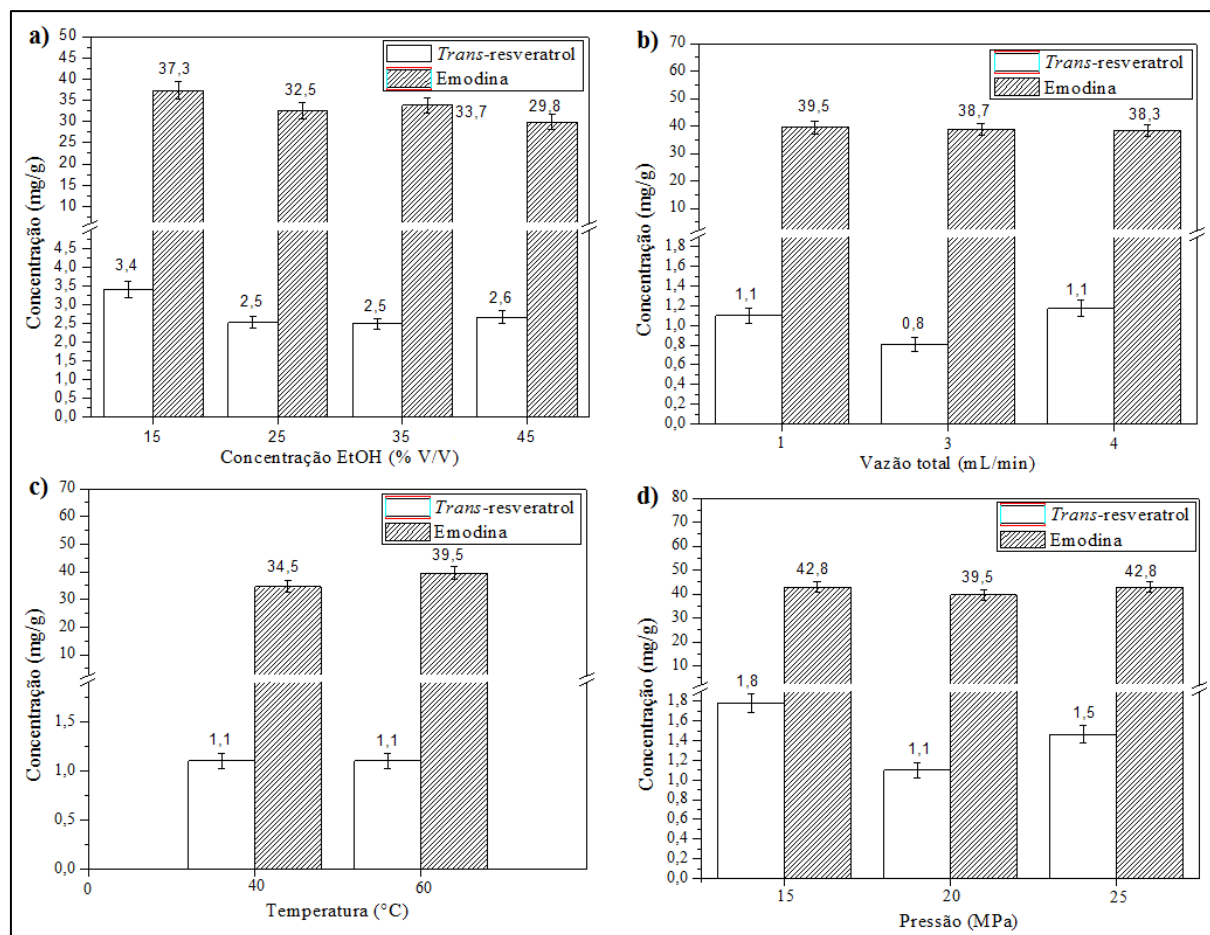


Figura 4.8 – Efeito das variáveis de processo no teor de *trans*-resveratrol e emodina. (a) Efeito da concentração do cossolvente: 15 Mpa, 40 °C e 1 mL/min; (b) Efeito da vazão total de solvente: 20 Mpa, 60 °C e 15% de EtOH; (c) Efeito da temperatura: 20 MPa, 1 mL/min e 15% de EtOH; (d) Efeito da pressão: 40 °C, 1 mL/min e 15% de EtOH.

De forma geral, os extratos SFE apresentaram concentrações de *trans*-resveratrol e emodina entre 0,8 – 3,4 mg/g e 29,8 – 42,8 mg/g respectivamente, dependendo das condições operacionais utilizadas. Santos (2013a) extraiu e quantificou *trans*-resveratrol em extratos oriundos de SFEs em *Rumex acetosa* obtendo valores na ordem de 0,4 mg/g. Essa diferença nos valores, provavelmente deve-se ao processo de extração em si, já que Santos (2013a) relata dificuldades no controle da vazão e manutenção de vazões acima de 0,6 g/min e problemas no armazenamento dos extratos, que podem ter acarretado prejuízos às análises de composição dos seus extratos.

Quando comparados com os teores de *trans*-resveratrol e emodina (0,22 mg/g e 0,82 mg/g, respectivamente) encontrados na SFEs da *Japanese knotweed* (planta da mesma família da *Rumex acetosa*) realizadas por Benová, *et al.* (2010), os dados de composição apresentam-se bastante acentuados.

Quanto a Figura 4.8a, percebe-se uma pequena diminuição da concentração de emodina com o aumento da concentração de etanol. Esse fato pode estar associado a questões de afinidade entre solvente e soluto, já que a polaridade do solvente é aumentada com a adição de etanol. No entanto, de forma geral, a partir dos resultados apresentados na Figura 4.8, pode-se considerar que os teores de emodina e *trans*-resveratrol são pouco influenciados pela variação de cada variável de processo (T , P , Q_T e C_{EtOH}), dentro da faixa experimental investigada neste trabalho. Esta observação sugere que a elevação de TFT e da atividade antioxidante (abaixamento do EC_{50}), relatada na Figura 4.6, estão relacionadas à extração de outros compostos fenólicos e antioxidantes.

Ao se avaliar a influência do tempo de extração (Figura 4.9), observa-se que o período entre 25 – 60 minutos de extração foi levemente mais favorável para a extração de *trans*-resveratrol e emodina, além de um leve aumento na concentração de fenólicos e de compostos antioxidantes.

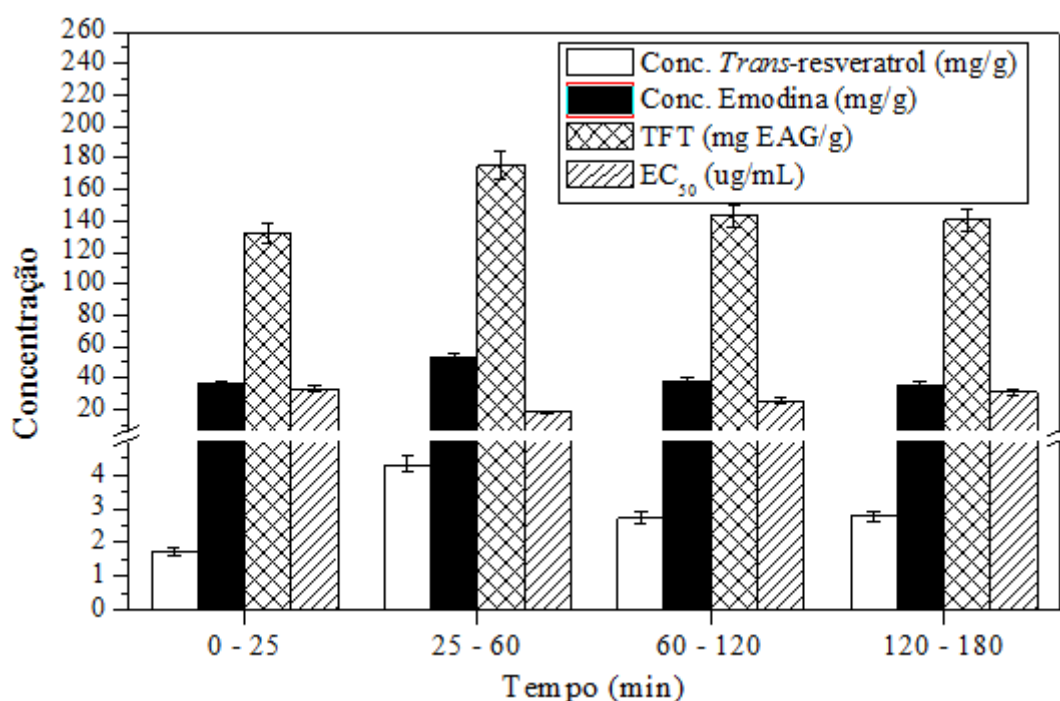


Figura 4.9 – Efeito do tempo de extração na composição dos extratos em SFE ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=15\text{MPa}$, $C_{EtOH} = 25\%$ e $Q_T = 1\text{ mL/min}$)

Os maiores valores de atividade antioxidante, teor de fenólicos, concentração de emodina e *trans*-resveratrol encontram-se na região compreendida entre 25 e 60 minutos de extração. De acordo com Seção 4.1.1 e Figura 4.2 deste trabalho, a faixa de tempo compreendida entre 0 e 53 minutos, aproximadamente, sinaliza a etapa CER da curva de

extração (SFE) e que nesse período extraiu-se cerca de 60% do soluto total extraído. Esse comportamento já era esperado, haja vista a alta taxa de extração e a grande quantidade de soluto de fácil acesso presentes nessa etapa (Sousa, *et al.*, 2002). Entre 50% e 90% do soluto de uma extração supercrítica é extraído na etapa CER, segundo Moura, *et al.* (2012). Autores como: Mezzomo *et al.* (2009) encontraram rendimentos de extração supercrítica, na etapa CER, de óleo essencial do pêssego na ordem de 60%. Moura *et al.* (2012) também encontraram rendimentos na etapa CER da SFE de *Psidium guajava* superiores a 50%.

4.2 – Extrações com líquidos pressurizados (PLEs)

4.2.1 – Extração com etanol pressurizado

Levando-se em consideração que não existem trabalhos na literatura que desenvolvam extrações com etanol pressurizado utilizando a *Rumex acetosa*, um pequeno planejamento experimental foi conduzido com o intuito de avaliar preliminarmente os efeitos da pressão e temperatura perante o rendimento extrativo. Dessa forma, segue a Figura 4.10 em que são dispostas as curvas cinéticas de extração e seus respectivos valores de rendimento final, juntamente com as condições de operação empregadas, conforme Seção 3.3 deste trabalho.

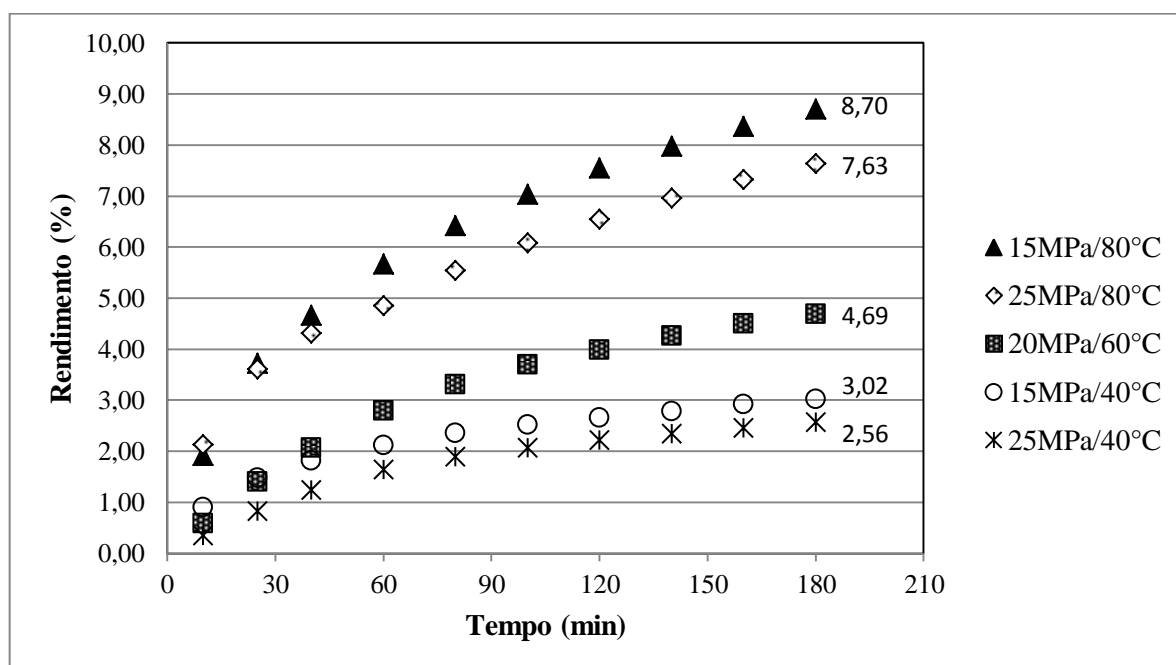


Figura 4.10 – Curvas cinéticas das PLEs com etanol a vazão de 1 mL/min

A partir da Figura 4.10, percebe-se que as curvas cinéticas apresentaram bom comportamento, já que é possível visualizar a distinção das etapas de extração CER e FER

(Galvão, 2009). É possível observar uma clara diferença de comportamento na etapa CER das curvas, mediante as mudanças de temperatura. Mesmo sem a realização da avaliação da solubilidade para a PLE, observa-se um aumento da inclinação da reta referente à etapa CER perante o aumento da temperatura; indicando assim, um possível aumento da solubilidade do etanol com o aumento da temperatura, fato esse amplamente discutido e atestado na literatura (França *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2002; Jesus *et al.*, 2013). No tocante a parte estatística, foram calculados os efeitos (Tabela 4.4) da temperatura, pressão e conjugado (pressão x temperatura) e o gráfico de Pareto (Figura 4.11) utilizando o *software Statistica 7.0*®.

Basicamente, a avaliação de cada variável ou conjugado de variáveis dá-se a partir da interpretação dos valores de seus efeitos perante uma variável resposta (rendimento extrativo). Nessa interpretação, podem ser utilizados a tabela dos efeitos (Tabela 4.4) ou ainda o gráfico de Pareto (Figura 4.11). Esse último, apresenta os efeitos padronizados em forma de coluna. As variáveis que apresentam efeitos com valores altos o suficiente para estarem a direita da linha pontilhada (vide Figura 4.11), são consideradas significativas, do contrário não o são.

Tabela 4.4 – Efeitos calculados no Statistica 7.0® para o planejamento experimental

Variáveis	Intervalo	Efeitos	p-valor
Temperatura [T] (°C)	40 – 80	5,375	0,0259
Pressão [P] (MPa)	15 – 25	-0,765	0,1776
[P] x [T]	---	-0,305	0,3967

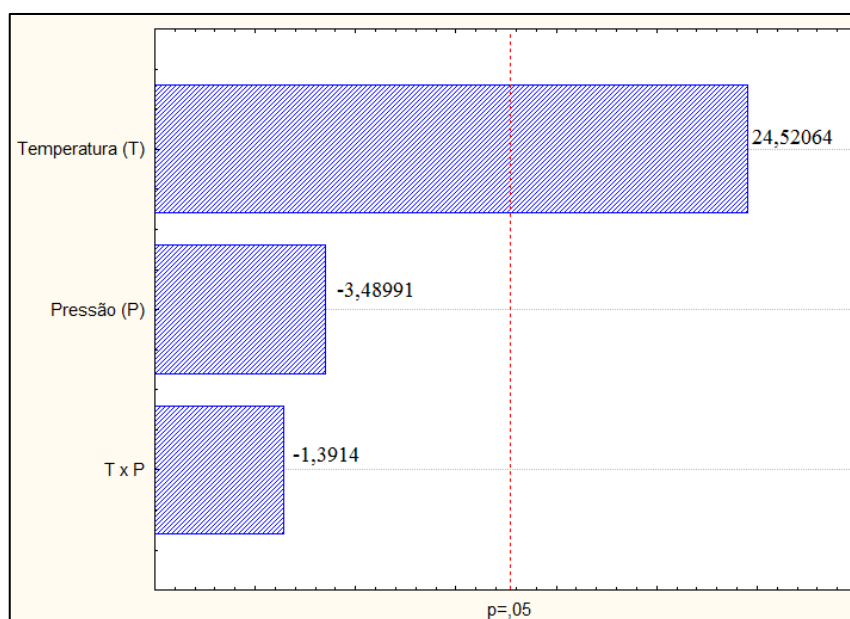


Figura 4.11 – Diagrama de Pareto para os valores dos efeitos padronizados

A partir da Tabela 4.4, pode-se perceber que o efeito da temperatura apresenta-se como o maior dentre os avaliados e o seu valor é positivo, mostrando que o rendimento da extração é diretamente proporcional à temperatura. Esse comportamento é confirmado pelo Diagrama de Pareto (Figura 4.11) que mostra a mesma como única variável significativa para uma confiança de 95% (única variável com barra à direita da linha pontilhada).

Partindo do pressuposto de que as propriedades de transporte presentes no processo, como viscosidade do solvente e difusividade do soluto, são influenciadas pela mudança de temperatura em processos de extração com líquidos pressurizados, pode-se explicar o comportamento observado (temperatura ser significativa) a partir do aumento da transferência de massa com o aumento da temperatura nesse tipo de extração (Brunner, 1994).

Comportamento semelhante foi observado no trabalho de Santos (2013a), em que foram feitas extrações com fluidos supercríticos em raízes da *Rumex acetosa* (mesmo grupo de pesquisa deste trabalho) e a temperatura apresentou o mesmo comportamento. Rodríguez-Pérez *et al.* (2016) observaram aumentos no rendimento de extração de compostos fenólicos na faixa de temperatura de até 100 °C a partir da folha da *Moringa oleífera*. Bucić-Kojić *et al.* (2013) observaram que o rendimento da extração de compostos fenólicos obtidos a partir do bagaço da uva por PLE, aumenta com o consequente aumento da temperatura.

Quanto ao efeito da pressão e do combinado pressão x temperatura, ambos apresentaram-se não significativos com relação ao rendimento, frente à temperatura e também apresentaram valores negativos, mostrando que são inversamente proporcionais ao rendimento. Pode-se observar (Figura 4.10 e 4.11) que na faixa utilizada, o aumento da pressão gerou uma pequena variação negativa nos rendimentos. Esse comportamento já foi observado em PLEs de compostos fenólicos a partir da casca da jabuticaba (Santos *et al.*, 2012a). No entanto, nesse mesmo trabalho de Santos *et al.* (2012a), os autores perceberam um aumento na eficiência da extração de compostos fenólicos, quando os resultados foram comparados com extrações a baixa pressão (LPSE), demonstrando a eficácia da utilização da temperatura e pressão empregadas na extração com líquido pressurizado. Benová *et al.* (2010) observaram que para pressões abaixo de 250 bar, o rendimento da extração com utilização de fluidos supercríticos foi pequeno. Santos (2013a) percebeu que a pressão não foi significativa para processos com fluidos supercríticos utilizando a raiz da *Rumex acetosa*. Dessa forma, é possível que o emprego de pressões abaixo de 250 bar justifique a baixa influência da pressão no rendimento de extração neste trabalho, visto que a faixa de pressão foi de 15 – 25MPa.

Kamali *et al.* (2012) observaram que a pressão de operação não demonstrou ser estatisticamente significativa para o processo de extração com fluido pressurizado de óleo essencial a partir das flores da *Lavandula hybrida*.

A Figura 4.12 apresenta a superfície de resposta gerada a partir do *software Statistica 7.0®*, e essa mostra a forte influência da temperatura sobre o rendimento de extração, já que apresenta uma inclinação bastante pronunciada em direção à região de maior rendimento, enquanto que percebe-se a pequena influência da pressão, tendo em vista a pequena inclinação da reta observada no eixo da pressão.

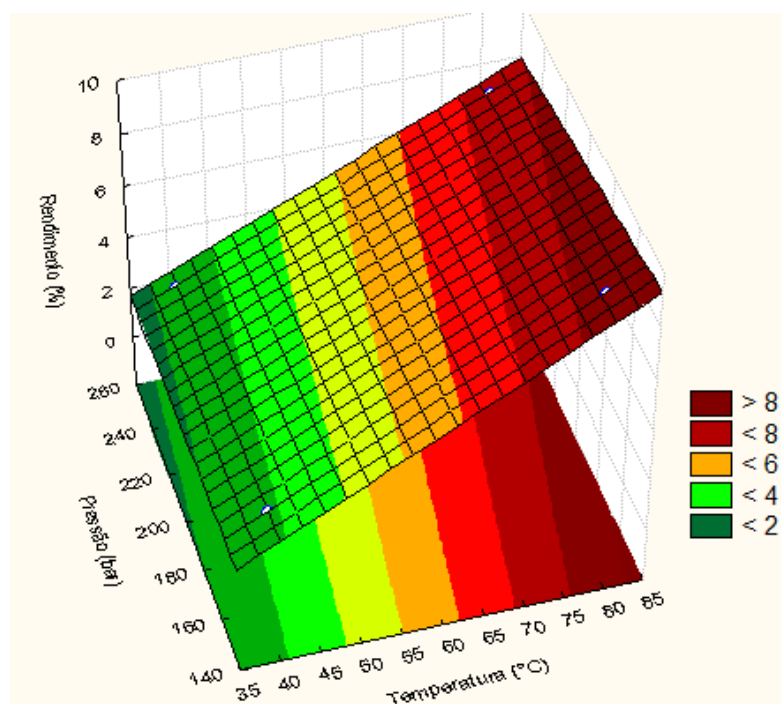


Figura 4.12 – Superfície de resposta em função do rendimento da extração, para Temperatura (°C) versus Pressão (bar)

4.2.2 – Extração PLE com solventes distintos

A segunda parte das extrações com líquidos pressurizados teve por objetivo a avaliação da PLE com a utilização de diversos solventes, conforme explicitado na Seção 3.3 e ilustrado na Tabela 4.5. Essa etapa precede a etapa da extração com líquidos pressurizados sequenciais, conforme também explicitado na Seção 3.3. Dessa forma, os resultados para o rendimento e composição das extrações com líquidos pressurizados (utilizando diversos solventes) são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Extração com líquido pressurizado utilizando solventes distintos

<i>Nom. Extração</i>	<i>Solvente utilizado</i>	<i>P</i> (MPa)	<i>T</i> (°C)	<i>Q_T</i> (mL/min)	<i>R_{total}</i> (%)	<i>Trans-resveratrol</i> (mg/g)	<i>Emodina</i> (mg/g)
LPA	Água	20	80	1	3,93	1,4	0,4
LPAC	Acetonitrila	20	80	1	1,91	5,7	28,8
LPI	Isopropanol	20	80	1	3,15	5,0	10,1
LPE	Etanol	20	80	1	8,54	5,5	5,6
LPH	Hexano	20	80	1	0,54	0,0	9,2
LPT	Tolueno	20	80	1	0,91	0,4	57,0

P= Pressão total do extrator; T=Temperatura do extrator; Q_T= Vazão total de solvente; R_{total} = Rendimento total de extração (% ge/ga).

De forma clara, a extração com etanol pressurizado demonstrou ser a que apresenta maior rendimento em massa. Esse resultado corrobora com os resultados da extração sequencial em raízes da *Rumex acetosa* encontrados por Santos (2013a), pertencente a este mesmo grupo de trabalho. Em ambos os casos, esse fato pode ser atribuído a forte afinidade entre os compostos presentes na raiz da *Rumex acetosa* e o etanol. Possivelmente, devido a presença de grupos hidroxilas na estrutura dos compostos extraídos e a consequente formação de ligações de hidrogênio entre essas e as moléculas de etanol, ratificando a escolha desse como solvente utilizado na Seção 4.2.1 nas PLEs com o intuito de avaliação da pressão e temperatura. Mesmo com a presença de hidroxilas na emodina, a mesma não demonstrou ser muito solúvel em água, conforme a Tabela 4.5. Cunha (2009) explica esse comportamento a partir das propriedades estruturais e eletrônicas da emodina.

Quanto ao isopropanol, o comportamento é análogo ao do etanol, no entanto com menor intensidade. A extração utilizando tanto o hexano quanto o tolueno como solvente demonstraram um baixo valor de rendimento (o que pode ser explicado por sua baixa polaridade), enquanto que a extração utilizando acetonitrila demonstrou um comportamento intermediário entre o etanol e o hexano.

Mesmo com o baixo rendimento em massa observado na Tabela 4.5, o tolueno apresentou um extrato bastante rico em emodina e pouca solubilização do *trans-resveratrol*. Esse fato pode ser atribuído ao maior caráter apolar observado na estrutura química da emodina (Figura 2.5), enquanto que o etanol apresenta uma menor afinidade pela mesma, quando comparado ao tolueno, e uma maior afinidade pelo *trans-resveratrol*, quando comparado aos demais solventes.

4.2.3 – Extração PLE sequencial

Conforme explicado na Seção 3.3.1, e ratificada nesta seção, a extração sequencial teve por base os resultados obtidos na Seção 4.2.2. Essa extração baseou-se nos resultados em que o etanol, o hexano e o tolueno apresentaram resultados interessantes no tocante à seletividade entre os compostos *trans*-resveratrol e emodina. É importante ressaltar que esses solventes foram escolhidos tendo por base, também, o trabalho de Souto (2010) em que o mesmo purifica *trans*-resveratrol a partir de extrações em raízes de *Rumex acetosa*, a baixas pressões, utilizando tolueno, hexano e éter dietílico, nessa ordem.

Foi adotada essa sequência a partir dos resultados obtidos na Tabela 4.5, tendo em vista que o tolueno apresenta alta seletividade pela emodina em detrimento do *trans*-resveratrol, enquanto que o etanol não demonstra o mesmo comportamento. Dessa forma, faz-se necessário iniciar a extração sequencial utilizando tolueno, seguido de uma limpeza com hexano e por fim a utilização do etanol.

A Figura 4.13 apresenta as curvas cinéticas das PLEs sequenciais, nas quais foi utilizado tolueno (0 – 180 min), hexano (180 – 210 min) e etanol (210 – 390 min) em três temperaturas distintas e constantes (40, 60 e 80 °C).

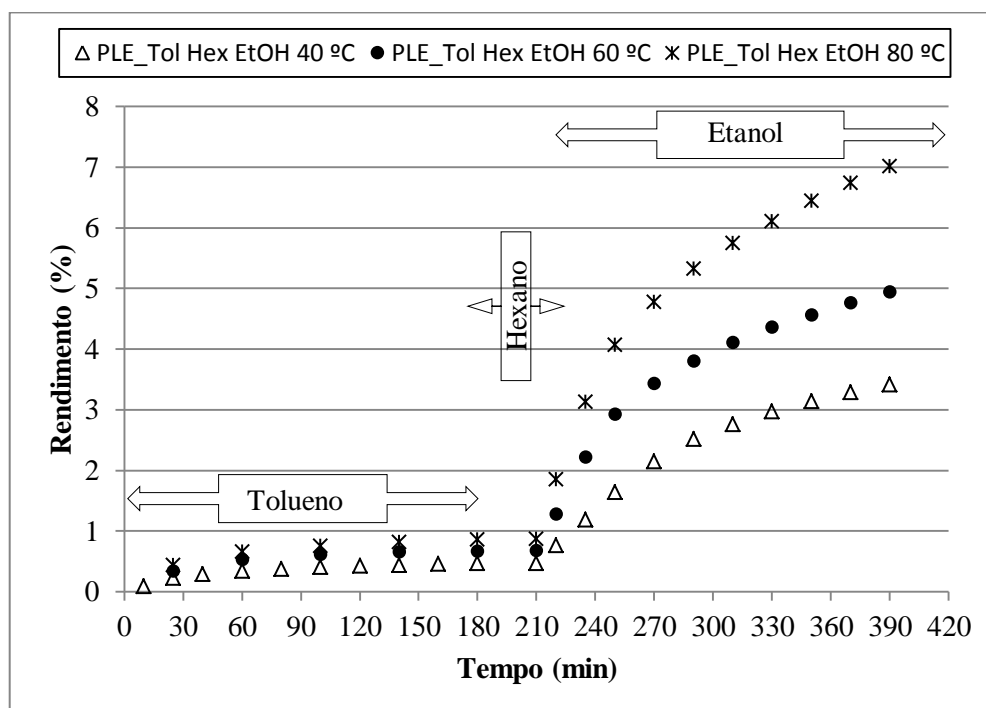


Figura 4.13 – Curvas cinéticas de extração com líquidos pressurizados distintos (Tolueno, Hexano, Etanol) de forma sequenciada.

Tomando por base os resultados apresentados na Figura 4.13, pode-se perceber o bom comportamento das curvas cinéticas nas três temperaturas distintas, demonstrando uma nítida distinção entre as etapas CER e FER, pelo menos, nos tempos acima de 210 minutos, na qual o etanol foi utilizado. Quanto ao comportamento da temperatura, percebe-se um claro aumento da solubilidade quanto na utilização do etanol (210 – 390 min), devido ao aumento da inclinação da reta que delimita a etapa CER, fato já observado na Figura 4.10, quando se utilizou etanol como solvente da PLE em várias temperaturas. Conseqüentemente, quanto maior a temperatura, melhor o rendimento ao longo de todo o processo.

Também se pode perceber que o rendimento em massa referente à utilização do tolueno (0 – 180 min) basicamente foi estabilizado em no máximo 1%, dado que confirma o observado na Tabela 4.5. O segundo solvente utilizado foi o hexano (180 – 210 min) que apresentou rendimento irrelevante, se comparado ao etanol. No entanto, a função do hexano foi de retirada de impurezas, já que o seu uso em extrações pode ser atribuído, em casos específicos, a processos de limpeza, ou desengorduração, ou ainda purificação (Souto, 2010; Rockenbach *et al.*, 2008; Cabral, 2008).

E por fim, o etanol (210 – 390 min) apresentou rendimento máximo da ordem de 7%, confirmando o observado na Tabela 4.5. O comportamento diferenciado do etanol ratifica a hipótese de que a raiz da *Rumex acetosa* apresenta uma alta concentração de compostos fenólicos polares, já que mesmo com a prévia utilização de tolueno e hexano, o rendimento de extração total aumentou de 0,9% para 7,0% com a utilização de etanol, conforme Figura 4.13. Ratificando essas observações, a Figura 4.14 apresenta a quantidade de *trans*-resveratrol e emodina para cada etapa da extração sequencial, tendo por base a extração Soxhlet.

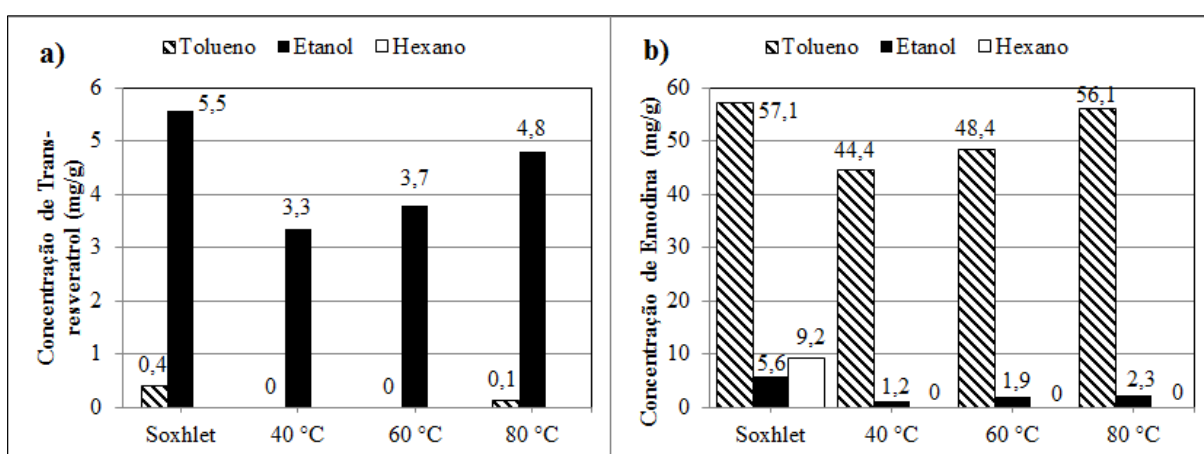


Figura 4.14 – Dados de composição para cada extrato da PLE sequencial em diferentes temperaturas; a) Gráfico para concentração de *trans*-resveratrol; b) Gráfico para concentração de emodina

Na Figura 4.14 tem-se a referência (concentração de *trans*-resveratrol e emodina na extração Soxhlet) e a composição do extrato oriundo de cada solvente e temperatura. Quanto à utilização do hexano, percebe-se (Figura 4.14), que o mesmo, de fato, não apresentou resultados significativos de emodina e de *trans*-resveratrol, corroborando com a finalidade de sua utilização (limpeza da matéria prima). É importante ressaltar que o hexano foi capaz de extrair emodina na extração soxhlet num tempo de 8 horas, condição não satisfeita na extração sequencial em que foi utilizado apenas 30 minutos de extração.

Na Figura 4.14-a percebe-se que o etanol conseguiu obter altas concentrações de *trans*-resveratrol (compreendidas entre 3,3 e 4,8 mg/g), alcançando quase os 5,5 mg/g da extração soxhlet, ratificando a forte afinidade entre esse e o etanol. No entanto, o tolueno demonstrou valores muito inferiores, confirmando as expectativas quanto à baixa solubilidade do *trans*-resveratrol nesse solvente. Esse comportamento já foi observado, a pressão ambiente, no trabalho de Souto (2010), o qual utilizou uma extração convencional sequencial com o intuito de purificar o *trans*-resveratrol obtido ao final do processo.

De forma análoga, na Figura 4.14-b percebe-se que a etapa na qual se utilizou tolueno destacou-se diante das demais, gerando altos valores de concentração de emodina (compreendidos entre 44 e 56 mg/g), enquanto a Soxhlet mostra 57 mg/g. Esse comportamento ratifica a grande afinidade do tolueno com a emodina, já que pelo princípio da polaridade, o tolueno, notoriamente apolar, consegue exercer uma boa solubilização da emodina (composto razoavelmente apolar). Souto (2010) já havia observado esse comportamento da alta solubilização da emodina em tolueno e utilizado esse fenômeno em processos de separação.

Considerando que a extração PLE com a utilização de solventes distintos e de forma fracionada pode promover a separação de substâncias por questões de afinidade molecular (Souto, 2010) e também levando-se em consideração os resultados obtidos na Tabela 4.5 e Figura 4.14, quanto a alta solubilização da emodina a partir do uso do tolueno e a alta solubilização de *trans*-resveratrol a partir do uso do etanol, pode-se observar, tendo em vista a coerência dos resultados obtidos na Figura 4.13 e a Tabela 4.5, de forma clara, a separação do *trans*-resveratrol da emodina a partir da utilização de solventes diferentes que apresentaram afinidades distintas com cada um desses compostos.

4.2.4 – Teor de fenólicos totais (TFT), atividade antioxidante (EC₅₀) e composição

Os extratos obtidos a partir das extrações com líquidos pressurizados foram submetidos à quantificação de fenólicos e de atividade antioxidante, conforme descrito nas Seções 3.8 e 3.9 deste trabalho. Dessa forma, a Tabela 4.6 ilustra os valores encontrados para essas quantificações.

Tabela 4.6 – Avaliação do potencial antioxidante dos extratos (EC₅₀) e do teor de fenólicos totais dos extratos da PLE com etanol (EtOH)

<i>Extrações</i>	<i>EC₅₀</i> (µg/mL)	<i>TFT</i> (mg EAG/g _e)
20 MPa/ 60 °C / 1 mL/min	7,9	118,7
15 MPa/ 40 °C/ 1 mL/min	7,8	143,4
15 MPa/ 80 °C/ 1 mL/min	7,0	120,2
25 MPa/ 40 °C/ 1 mL/min	5,5	139,6
25 MPa/ 80 °C/ 1 mL/min	4,7	107,4

Conforme pode ser observado na Tabela 4.6, os valores referentes ao EC₅₀ ficaram compreendidos entre 4,7 e 7,9 µg/mL, sem sofrer grandes variações com as mudanças das condições de extração.

A partir da análise da influência das variáveis, percebe-se uma pequena tendência a obtenção de melhores resultados (menores valores de EC₅₀) para as extrações com maior pressão de trabalho. Quanto à temperatura, a mesma atua de forma mais branda, no entanto, a atividade antioxidante tende a aumentar com o aumento da temperatura. Esse comportamento pode estar associado às mudanças nas propriedades, de solvatação e difusividade, ligadas aos processos extrativos pressurizados, conforme já comentado neste trabalho.

Esses resultados encontrados para a técnica PLE demonstraram ser melhores do que os resultados encontrados por Santos (2013a), que estimou a atividade antioxidante dos extratos oriundos da SFE a partir da *Rumex acetosa*, encontrando valores inferiores a 18,4, chegando até a 7,9. Santos (2012) quantificou a atividade antioxidante dos extratos oriundos da SFE da semente de Pitanga, encontrando valores de EC₅₀ entre 4,9 e 94,4 µg/mL, valores esses que se encontram na mesma ordem de grandeza que os obtidos nesta seção do trabalho.

Os resultados encontrados para essa técnica foram melhores dos que os obtidos por Oliveira (2010) que quantificou o poder antioxidante de extratos de uva oriundos de extrações

supercríticas, extrações a baixa pressão (Soxhlet) e extrações por ultrassom obtendo resultados de EC_{50} compreendidos entre 211 e 5770 $\mu\text{g/mL}$. Lucena *et al.* (2010) quantificaram o poder antioxidante de vinhos brasileiros e estes resultaram em valores de EC_{50} compreendidos entre 3,4 e 122,5 $\mu\text{g/mL}$. Quanto a comparação com o padrão de controle utilizado (ácido ascórbico com EC_{50} de 2,2 $\mu\text{g/mL}$) conforme descrito na Tabela 3.4, seção 3.8 deste trabalho, pode-se afirmar que foram obtidos extratos com excelente poder antioxidante.

Com relação ao teor de compostos fenólicos totais (TFT), os valores encontrados para os extratos oriundos da PLE com etanol ficaram compreendidos entre 107,4 e 143,4 $\mu\text{g/mL}$, conforme Tabela 4.6. Quando comparados aos valores de TFT encontrados pelas extrações SFE de Santos (2013a), os mesmos apresentam valores na mesma ordem de grandeza. Esses resultados de TFT demonstraram ser melhores que os teores obtidos por Oliveira (2014) para extratos reconhecidamente antioxidantes como: vinhos (TFT entre 7,8 e 15,1 g EAG/L) e extratos de uvas (46,7 e 95,3 g EAG/L). Dias *et al.* (2013) determinou o teor de compostos fenólicos em vinhos elaborados no Vale do São Francisco, resultando em valores compreendidos entre 16,0 e 42,0 mg EAG/L, ratificando, assim, a superioridade nos valores de TFT encontrados para PLE.

Dessa forma, diante de todos os resultados discutidos nesse ponto, pode-se afirmar que esses extratos, oriundos das PLEs da *Rumex acetosa*, apresentam um alto potencial antioxidante, quando comparados com alguns vinhos, extratos de plantas e frutas, fontes reconhecidamente ricas em compostos fenólicos e compostos antioxidantes.

4.3 – Extração com utilização de micro-ondas (MAE)

A extração assistida por micro-ondas obteve os resultados ilustrados na Tabela 4.7, quanto à composição (*trans-resveratrol* e emodina), rendimento, atividade antioxidante e teor de fenólicos totais.

Tabela 4.7 – Resultados encontrados para a extração assistida por micro-ondas nas condições: F/S = 6,4g/30mL; 80 °C e 30 min

<i>Extração</i>	R_{total} (%)	<i>Trans-resveratrol</i> (mg/g)	<i>Emodina</i> (mg/g)	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	TFT (mg EAG/g _e)
Micro-ondas	4,13	3,4	6,2	3,4	130,6

Diante do exposto na Tabela 4.7, pode-se afirmar que a extração como utilização de micro-ondas desponta como uma técnica de extração bastante promissora. Percebe-se excelentes resultados no tocante à extração de *trans*-resveratrol, atividade antioxidante e teor de fenólicos. Quanto à concentração de *trans*-resveratrol, os extratos oriundos da MAE apresentaram valores inferiores à extração Soxhlet, no entanto, apresentou valores superiores ao das SFEs. Quanto à atividade antioxidante, apresentou bons resultados, melhores que os apresentados pelas demais técnicas. Esses bons comportamentos podem estar associados à presença de umidade no interior da matéria-prima, ocasionando eventuais rupturas celulares e consequente facilitação do processo de transferência de massa (Mandal *et al.*, 2007).

Quanto ao teor de fenólicos, apresentou resultados da mesma ordem de grandeza dos encontrados para a extração de casca de amendoim (cerca de 140 mg EAG/g_e) utilizando a mesma técnica (Ballard *et al.*, 2010). No entanto, os extratos da MAE apresentaram valores inferiores aos encontrados por Pérez-Serradilla & Castro (2011), cerca de 370 mg EAG/g, quando utilizaram essa técnica na extração em “borras” oriundas do vinho.

Também demonstrou ser bastante interessante do ponto de vista ambiental e de eficiência, já que utiliza menos solvente, apenas 30 mL para cada 6,4 gramas, e consome menos tempo, cerca de 30 min para obter rendimentos de 4,23%, se comparado à extração soxhlet que consome cerca de 80 mL e 8 horas para obter rendimentos de 8,32%.

4.4 – Discussão sobre as técnicas de extração: SFE, PLE, Soxhlet, LPSE e com utilização de micro-ondas

Nesta seção, será realizada uma discussão sobre as técnicas utilizadas neste trabalho, afim de abordar diferenças, vantagens e pontos negativos entre todas elas.

A Figura 4.15 apresenta os resultados comparativos em relação ao rendimento de extração obtidos nas técnicas avaliadas. Pode-se observar que as extrações Soxhlet e PLE apresentaram melhores rendimentos em relação à LPSE, SFE e Micro-ondas. O solvente mais efetivo foi o etanol, apresentando 8,32% de rendimento na extração Soxhlet e 8,7 na extração PLE sob pressão de 15 MPa, 80 °C, vazão de 1 mL/min, ratificando assim sua escolha como cossolvente da SFE por apresentar forte interação com o soluto. As extrações com os demais solventes apresentaram valores intermediários (2,0 – 3,3%), fenômeno que pode ser atribuído à diminuição da afinidade desses para com os solutos presentes na matriz vegetal, conforme discutido em seções anteriores (Benová *et al.*, 2010; Rockenbach *et al.*, 2007).

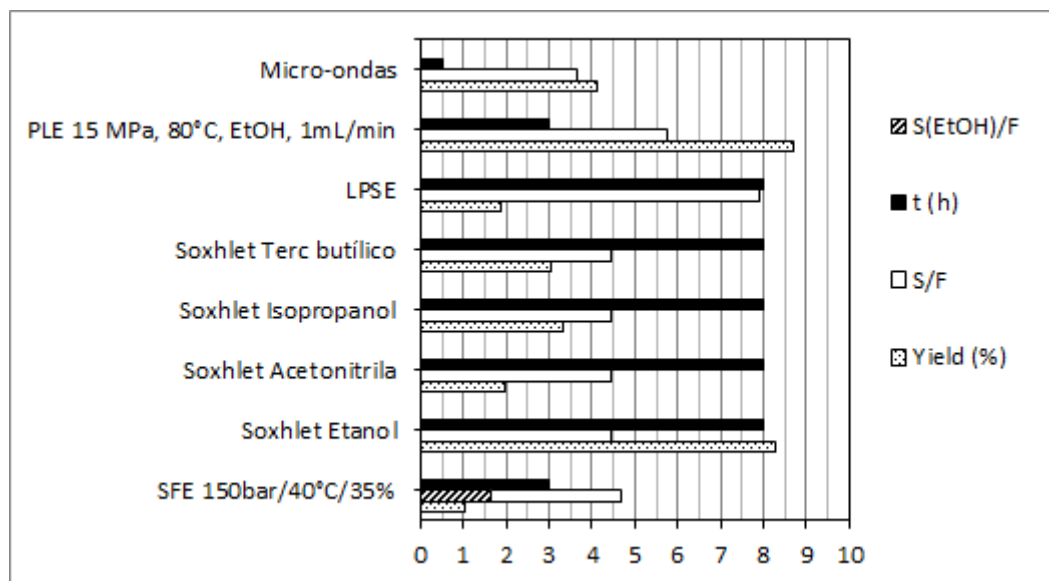


Figura 4.15 – Resultado das técnicas de extração quanto ao rendimento (%); tempo (h); g solvente total/g amostra alimentada (S/F) e g EtOH/g amostra alimentada (S(EtOH)/F)

A extração SFE apresentou o menor resultado quanto ao rendimento (1,07%), no entanto, mostrou ser a segunda melhor técnica quanto ao tempo de operação, quanto a relação massa de solvente total/alimentação (S/F) e a melhor na relação massa de EtOH/alimentação ($S_{(EtOH)}/F$). Esse comportamento do rendimento pode ser atribuído ao caráter intermediário de polaridade da mistura SC-CO₂/EtOH em relação ao soluto presente. Quanto às relações S/F e $S_{(EtOH)}/F$, a SFE demonstrou ser uma das melhores técnicas no tocante ao consumo de solvente por massa alimentada ao sistema, perdendo apenas para a extração com utilização de micro-ondas (MAE), enquanto que a extração LPSE, mesmo com 1,9% de rendimento, demonstrou ser a técnica de extração que mais consumiu solvente, proporcionalmente. A baixa eficiência do LPSE pode ser atribuída à baixa difusividade e solvatação do etanol líquido em baixa pressão e temperatura. Entretanto, observou-se que a curva cinética de extração obtida na LPSE (Figura 4.16), apresentou um comportamento que sugere a possibilidade de que a extração não foi esgotada, corroborando a sugestão das baixas taxas de transferência de massa presentes nesta técnica de extração.

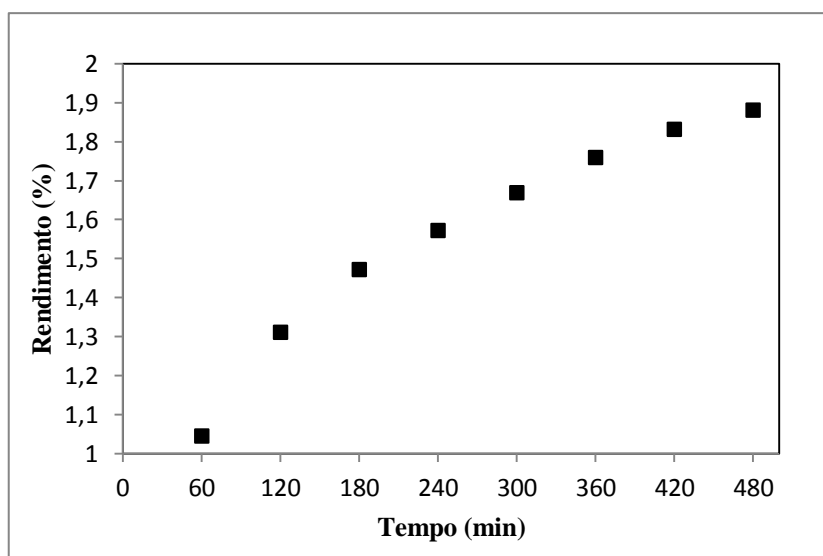


Figura 4.16 – Curva de extração global das raízes da *Rumex acetosa* obtidas através de LPSE com etanol a 40 °C

A extração com utilização de micro-ondas (MAE) apresenta-se como a melhor técnica quanto ao tempo e a utilização de solvente. Essa técnica extrativa apresenta um rendimento intermediário em um curto tempo de operação (30 minutos). Esse comportamento pode ser explicado pela alta interação das ondas eletromagnéticas com os componentes polares presentes na mistura entre solvente e matéria-prima (Carniel *et al.*, 2017).

A extração PLE com utilização de etanol e nas condições (15 MPa, 80 °C, 1mL/min) apresentou o melhor rendimento em massa, provavelmente devido a forte afinidade soluto-solvente e maior coeficiente de transferência de massa, no entanto apresentou o segundo maior consumo de solvente. É importante ressaltar a forte influência da temperatura nessa técnica de extração para as condições utilizadas e para a matéria-prima escolhida.

A Figura 4.17 apresenta os resultados em relação ao TFT e atividade antioxidante para as extrações Soxhlet, LPSE, MAE e a extração SFE e PLE com melhores rendimentos. Os TFT e EC₅₀ encontrados nos extratos Soxhlet sugerem que estes solventes são eficientes na extração de compostos fenólicos e antioxidantes, mesmo diante da variedade de solventes e suas polaridades (Ziaková & Brandsteterová, 2002).

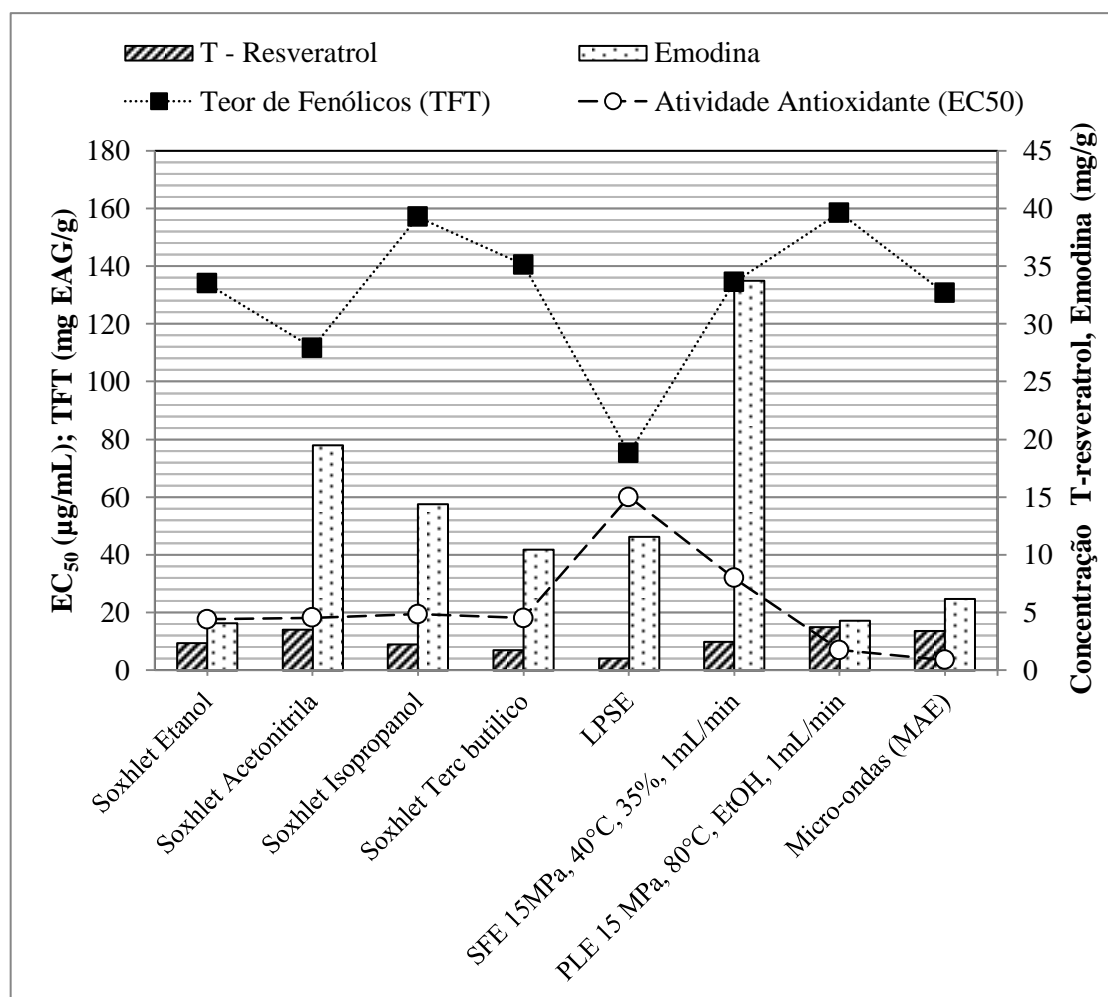


Figura 4.17 – Resultados das técnicas de extração em relação a composição dos extratos, avaliação antioxidante e teor de fenólicos totais.

O Isopropanol se apresentou como um dos solventes com maior teor de TFT (157,0 mg EAG/g_e) e excelente atividade antioxidante (EC₅₀ = 19,4 μg/mL), este perdendo apenas para a extração PLE e MAE, respectivamente. Quanto à técnica LPSE, esta apresentou valor inferior de TFT (75,2 mg EAG/g_e), se comparado com o Soxhlet (111,6 a 157,0 mg EAG/g_e), SFE (27,6 a 149,5 mg EAG/g_e), PLE e MAE, conforme a Figura 4.16, provavelmente devido às baixas taxas de transferência de massa do soluto da matriz vegetal para o solvente.

Ainda de acordo com a Figura 4.17, a extração Soxhlet com acetonitrila apresentou um dos melhores resultados para o teor de *trans*-resveratrol, embora seu TFT tenha sido inferior em relação a todos os solventes testados. A acetonitrila exerceu uma alta solvatação dos estilbenos (Benova *et al.*, 2010) apresentando, no entanto, relevante toxicidade e, quando comparado ao etanol, demonstrou baixo rendimento. Dessa forma, optou-se por não utilizá-lo como cossolvente na SFE e nem na PLE. Quando comparadas às extrações Soxhlet, LPSE, MAE e PLE, a SFE apresentou melhores resultados para a emodina (33,8 mg/g), tendo em

vista o caráter apolar do CO₂ presente no solvente. Esses resultados mostraram-se bastante promissores, tendo em vista que Benova *et al.* (2010) obtiveram extratos com 0,25 mg/g de *trans*-resveratrol e 0,82 mg/g de emodina a partir de SFE da *Japanese knotweed*.

As extrações MAE e PLE apresentaram ótimos resultados quanto à extração de *trans*-resveratrol, evidenciando a forte tendência dessas técnicas na extração de compostos polares, percebendo-se, conseqüentemente, um baixo valor de EC₅₀, evidenciando um alto poder antioxidante dos extratos dessas técnicas.

Finalmente, avaliando-se de uma forma geral o potencial bioativo da *Rumex acetosa* em relação à uva (reconhecida pelo seu poder antioxidante, elevados TFT e alto conteúdo de resveratrol), observou-se que os resultados aqui encontrados (Figura 4.17) se mostraram extremamente promissores. Isto é verificado quando Vatai *et al.* (2009) obtiveram extratos com 0,019 mg/g e 0,21 mg/g de *trans*-resveratrol e emodina respectivamente a partir de bagaço de uva. Quanto ao teor de fenólicos totais, os autores obtiveram 60,0 mg EAG/g.

4.5 – Processo de precipitação com anti-solvente supercrítico

Dentro dos processos de precipitação utilizando anti-solvente supercrítico, a seletividade desse fluido é bastante importante e podendo ser avaliada a partir dos dados de composição dos precipitados (Villanueva-Bermejo *et al.*, 2017).

Dessa forma, a Figura 4.18 apresenta os dados de composição dos extratos secos de forma convencional e dos precipitados (extratos secos) a partir do anti-solvente supercrítico (CO₂). Conforme a Figura 4.18, para ambos os casos, esse processo apresentou precipitados (extratos secos) com teor de emodina bastante reduzido, cerca de 100%.

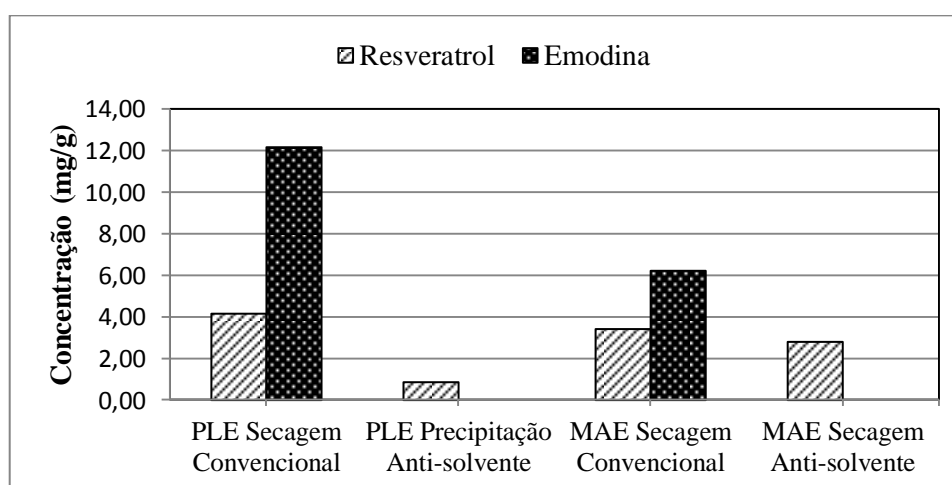


Figura 4.18 – Dados de composição dos extratos secos a partir da precipitação por anti-solvente supercrítico e secagem convencional

Os extratos submetidos à secagem convencional obtiveram aproximadamente 12 e 6 mg/g de emodina para as extrações PLE e MAE respectivamente, enquanto que esses extratos submetidos ao processo de precipitação e secagem com anti-solvente supercrítico obtiveram resultados de concentração de emodina abaixo dos limites de detecção deste trabalho. Comportamento parecido já foi observado por Bermejo *et al.* (2015) na redução de quase 93% da cafeína oriunda de extratos de chá verde, quando utilizou-se CO₂ supercrítico como anti-solvente.

É provável que a justificativa para a redução tão acentuada (cerca de 100%) da emodina presente nos extratos, possa ser atribuída à afinidade entre o CO₂ e a emodina, tendo em vista o razoável caráter apolar desses compostos.

No entanto, também se pode observar no gráfico da Figura 4.18 que ocorreu uma redução de 4,2 mg/g para 0,8 mg/g e de 3,4 para 2,8 mg/g na concentração de *trans*-resveratrol nos extratos da PLE e MAE, respectivamente. Uma possível explicação para essa maior redução na concentração de *trans*-resveratrol estaria pautada na maior quantidade de etanol presente, inicialmente, no extrato oriundo da PLE. Desse modo, é provável que ao deslocar o etanol presente nos extratos, parte do *trans*-resveratrol também teria sido arrastado por esse.

4.6 – Avaliação de modelos cinéticos de extração

Para a avaliação dos modelos para os ajustes das curvas cinéticas, foram utilizados os modelos de Crank (1975), Martínez *et al.* (2003) e Sovová (1994) para ajustes nas extrações PLE e SFE, conforme explicitado na Seção 3.11 deste trabalho. Considerando que foram escolhidos alguns modelos para o ajuste das curvas experimentais citadas na Tabela 3.7, a qualidade desses ajustes foi quantificada a partir do desvio médio relativo total (AARD %), conforme a Equação 21.

$$AARD (\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{\eta_i^{calc} - \eta_i^{exp}}{\eta_i^{exp}} \right| \quad (21)$$

Em que “n” representa o total de pontos da curva de massa acumulada por tempo, η_i^{exp} e η_i^{calc} representam os pontos de rendimento acumulado experimental e calculado pelos modelos no ponto i, respectivamente. Os modelos escolhidos e seus respectivos parâmetros encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Parâmetros dos modelos ajustados às curvas cinéticas das extrações SFE e PLE

Ext.	Crank		Martínez <i>et al.</i>			Sovová			
	$D \times 10^{12}$ (m ² /s)	AARD (%)	$b_i \times 10^4$ (s ⁻¹)	$t_{mi} \times 10^{-4}$ (s)	AARD (%)	$x_k \times 10^3$	$K_{FA} \times 10^3$ (s ⁻¹)	$K_{SA} \times 10^4$ (s ⁻¹)	AARD (%)
SFE 20 MPa 60 °C 15% 1mL/min	6,46	40,54	3,36	0,05	4,71	3,64	0,19	3,14	4,23
SFE 20 MPa 60 °C 15% 4mL/min	10,33	9,10	3,39	-9,54	4,89	4,82	0,81	3,15	1,20
SFE 15 MPa 40 °C 35% 1mL/min	8,08	22,91	2,88	-0,71	5,02	7,77	9,63	2,94	3,47
PLE 25 MPa 40 °C 100% 1mL/min	8,53	22,93	3,18	-0,44	2,02	18,9	9,57	3,75	2,64
PLE 15 MPa 80 °C 100% 1mL/min	9,41	9,88	3,08	-8,43	5,95	63,43	9,57	3,11	3,80

AARD (desvio médio relativo total); D (coeficiente de difusão do soluto na partícula); b_i e t_{mi} (parâmetros ajustáveis do modelo de Martínez *et al.*); x_k (concentração do soluto de difícil acesso); K_{FA} e K_{SA} (Coeficiente de transferência de massa da fase fluida e sólida, respectivamente)

Na Tabela 4.8 pode-se observar que o modelo de Sovová (1994) apresentou os menores desvios, de forma geral. Provavelmente, esse modelo é superior quanto ao ajuste dos desvios por fornecer uma descrição mais abrangente dos efeitos da transferência de massa nos processos extrativos facilitando a compreensão dos fenômenos de transporte envolvidos no processo (Liu *et al.*, 2014; Martínez, 2005).

Na Tabela 4.8 percebe-se que o aumento da quantidade de etanol na mistura solvente, de forma geral, ocasiona o aumento do coeficiente de transferência de massa da fase fluida K_{FA} . Isso pode ser explicado pela maior afinidade do etanol pelos compostos presentes na matéria-prima, frente ao gás carbônico (Jesus, *et al.*, 2013). Para praticamente todas as condições mostradas na Tabela 4.8, o K_{FA} apresentou um valor numérico maior que o K_{SA} , mostrando que para os casos estudados neste trabalho, o efeito convectivo do solvente perante o processo de transferência de massa é mais importante que o efeito difusivo na matriz sólida

(Martínez *et al.*, 2003). Nesse aspecto o K_{FA} está associado à fração de soluto de fácil acesso, enquanto que o K_{SA} está relacionado ao soluto de difícil acesso (Santos *et al.*, 2016).

No tocante a variação da vazão total, percebe-se um acréscimo no coeficiente K_{FA} com o aumento dessa vazão. Esse comportamento pode estar associado ao aumento do M_{CER} (taxa de transferência de massa na etapa CER) com o aumento da vazão total, conforme observado na Tabela 4.1. O aumento da vazão total acaba por ocasionar uma maior extração de soluto por unidade de tempo. Esse comportamento já foi observado em extrações supercríticas a partir da planta *Calendula officinalis* (López-Padilla *et al.*, 2017).

Conforme Tabela 4.8, o valor de x_k (concentração do soluto de difícil acesso) está aumentando com o acréscimo da vazão e/ou de etanol nos sistemas SFE e PLE, indicando que o acréscimo gerado no rendimento total pode ser oriundo da solubilização do soluto de difícil acesso (Sovová, 1994). Esse fenômeno pode ser observado, principalmente, com a mudança de técnica de SFE para PLE, na qual os rendimentos totais das PLEs são maiores do que os das SFEs, conforme discutido em outras seções.

A Figura 4.19 apresenta a curva cinética de extração e os ajustes matemáticos dos modelos de Cranck (1975), Sovová (1994) e Martínez *et al.* (2005) para o caso do ponto SFE, 15 MPa, 40 °C, 35%, 1 mL/min. Neste ponto, percebe-se uma razoável aproximação dos dados gerados a partir dos modelos de Sovová (1994) e Martínez *et al.* (2005) aos dados experimentais, enquanto que o modelo de Cranck (1975) não obteve um bom ajuste.

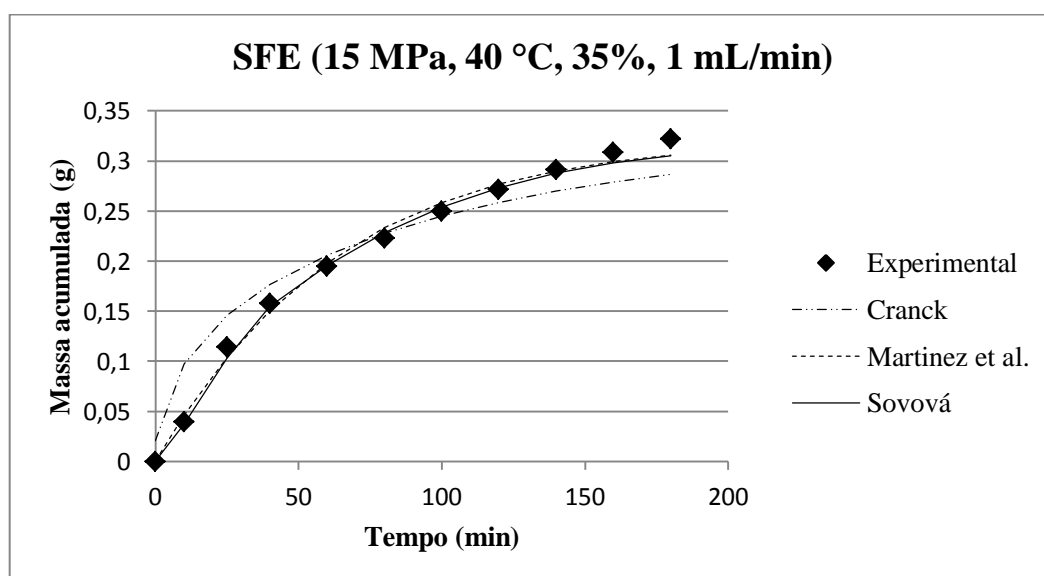


Figura 4.19 – Comparação entre os dados experimentais da SFE (15 MPa, 40 °C, 35%, 1 mL/min) e os ajustes dos modelos de Cranck, Martínez *et al.* e Sovová

Em relação à Figura 4.20, a mesma ilustra a comparação entre a curva experimental (SFE 20 MPa, 60 °C, 15%, 4 mL/min) e os modelos ajustados. Em conjunto com a Tabela 4.8, pode-se perceber que esse ponto apresenta, praticamente, os menores desvios dentre os pontos avaliados. Da mesma forma, esse comportamento pode ser associado ao fato de que extrações com vazões mais elevadas tendem a apresentar etapas CER mais bem definidas e consequentemente melhores resultados no tocante ao modelo de Sovová (Galvão, 2009).

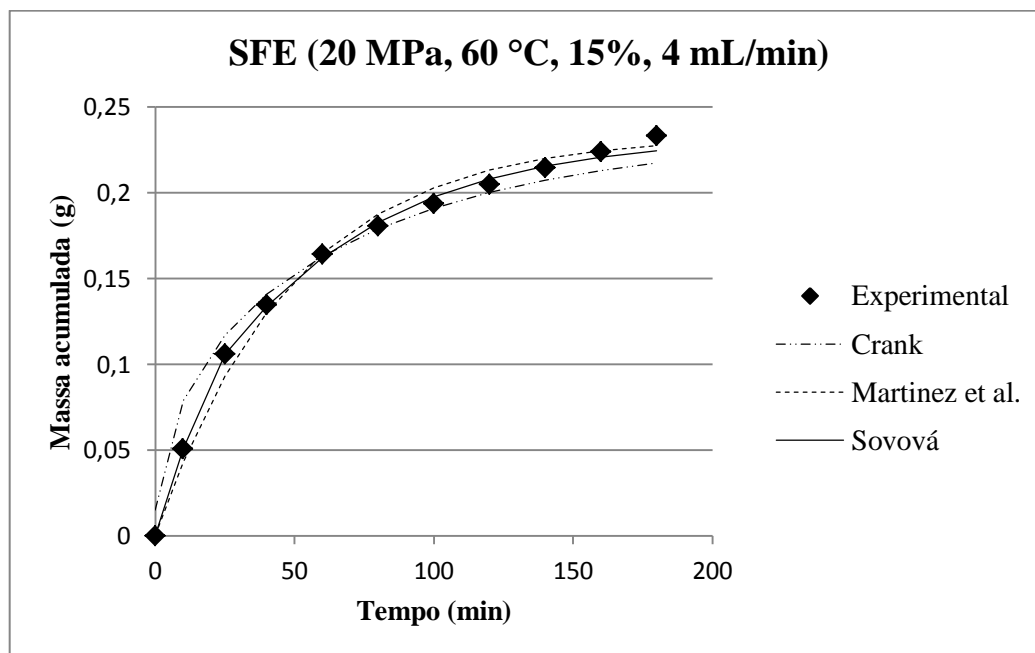


Figura 4.20 – Comparação entre os dados experimentais da SFE (20 MPa, 60 °C, 15%, 4 mL/min) e os ajustes do modelos de Crank, Martínez *et al.* e Sovová

A Figura 4.21 apresenta a comparação entre a curva experimental da extração PLE com maior rendimento em massa (15 MPa, 80 °C e 1 mL/min) e os modelos avaliados. Inicialmente, o modelo de Sovová (1994) foi projetado para extrações supercríticas, principalmente utilizando o gás carbônico como solvente. No entanto, esse modelo vem sendo aplicado tanto em SFEs com cossolvente, conforme Liu *et al.* (2014); Melo *et al.* (2016) e Moura *et al.* (2012), quanto em extrações com líquido pressurizado (Jesus *et al.*, 2013).

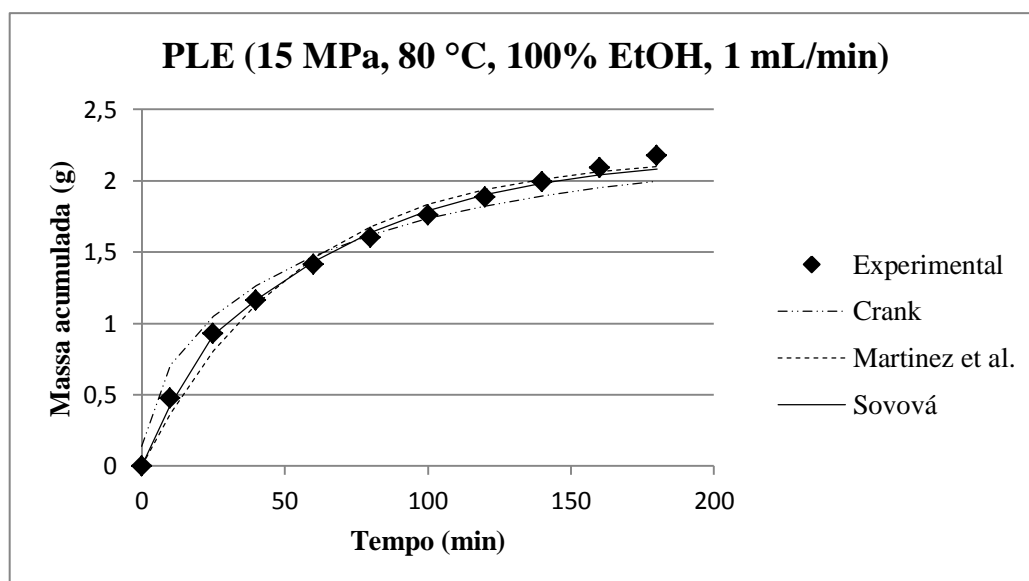


Figura 4.21 – Comparação entre os dados experimentais da PLE (15 MPa, 80 °C, 100% EtOH, 1 mL/min) e os ajustes do modelos de Crank, Martínez et al. e Sovová

O modelo de Martínez *et al.* (2003) apresenta apenas dois parâmetros (Tabela 4.8), e de forma geral, ajustou-se de forma boa quanto às curvas de extração. Esses parâmetros não apresentam sentido físico, principalmente o b_i (Martínez *et al.*, 2003). O modelo apresentou desvios relativamente baixos, no entanto foram encontrados valores de t_{mi} positivos e negativos. Como esse parâmetro indica o momento em que a taxa de extração alcança seu valor máximo, quando o seu valor é negativo, percebe-se que a curva de extração apresenta taxa decrescente desde o momento inicial do processo (Martínez *et al.*, 2003).

Praticamente todos os experimentos avaliados apresentaram taxa decrescentes desde o início do processo extrativo, conforme pode ser percebido na Tabela 4.8.

No entanto, o modelo de Crank (1975) não apresentou bons resultados (AARD entre 9,10% e 40,54%), conforme pode ser observado na Tabela 4.8. Nesse caso, o modelo seguiu um certo padrão, já que a massa de extrato coletada foi superestimada no início do processo e subestimada ao final do processo, conforme Figuras 4.19, 4.20 e 4.21. Esse comportamento pode ser justificado pelas próprias limitações do modelo, já que o mesmo considera que qualquer processo de extração é controlado unicamente por difusão, sem considerar os mecanismos da convecção (Cavalcanti *et al.*, 2016).

Quanto ao coeficiente de difusão do soluto na partícula (D), os valores obtidos estão na mesma ordem de grandeza dos coeficientes de difusão em sólidos, no entanto, pode-se concluir que esses valores não são confiáveis, tendo em vista os ajustes ruins e a não consideração da convecção por parte do próprio modelo (Cavalcanti *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2014).

Capítulo 5

Conclusões

5. Conclusões

Quanto às extrações com fluido supercrítico (SFE)

- ⇒ A vazão total da mistura solvente demonstrou ser importante no cálculo da solubilidade. Percebeu-se que na vazão de 1 mL/min o solvente já encontrava-se saturado (em equilíbrio) do soluto.
- ⇒ Ao variar a concentração de cossolvente (etanol) de 5% para 45%, percebeu-se um incremento significativo no rendimento de extração (de 0,18% para 1,03%) e na solubilidade soluto-solvente (de $0,22 \times 10^{-3}$ para $4,57 \times 10^{-3}$ g_e/g_a), haja vista a forte presença de compostos fenólicos polares na matriz sólida.
- ⇒ Percebeu-se uma tendência ao aumento da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos com o aumento da concentração, temperatura e vazão. Os melhores valores encontrados para o teor de fenólicos totais (TFT) e para a atividade antioxidante foram: 151,05 mg EAG/g_e e 10,7 µg/mL.
- ⇒ A etapa CER (0 – 60 min) destacou-se por apresentar o maior rendimento e maiores concentração de *trans*-resveratrol e emodina.

Quanto às extrações com líquido pressurizado (PLE)

- ⇒ Para a extração PLE com a utilização de etanol, a temperatura demonstrou ser significativa, enquanto que a pressão não apresentou-se como significativa. O valor de rendimento máximo obtido foi de 8,70 % a 80 °C e 15 MPa.
- ⇒ Quanto à extração com solventes distintos, observou-se composições distintas para solventes diferentes. O etanol destacou-se por alcançar um rendimento de 8,54% e 5,56 mg/g de concentração de *trans*-resveratrol, enquanto que o tolueno apresentou a maior solubilidade em emodina (cerca de 57 mg/g de concentração).
- ⇒ A extração sequencial demonstrou ser uma boa alternativa para a separação de *trans*-resveratrol e emodina. Quanto ao efeito da temperatura, o rendimento variou de forma acentuada (de 3,4 para 7,0%) com o aumento de 40 °C para 80 °C.
- ⇒ Quanto a atividade antioxidante e o teor de fenólicos das PLEs, os melhores resultados foram 4,74 µg/mL (EC₅₀) e 143,46 mg EAG/g_e (TFT), nas condições de 25 MPa, 80 °C e 15MPa e 40 °C, respectivamente.

Quanto à extração com utilização de micro-ondas (MAE)

⇒ A extração com micro-ondas apresentou resultados promissores quanto à atividade antioxidante ($EC_{50} = 3,48 \mu\text{g/mL}$), ao teor de fenólicos (TFT = 130,67 mg EAG/g_e) e ao baixo tempo de operação (30 min).

Quanto à discussão entre as técnicas convencionais e pouco convencionais

⇒ No tocante à discussão entre as técnicas, as extrações com fluidos pressurizados (SFE e PLE) destacaram-se pela combinação de polaridades e seletividade (SFE) e pelo rendimento (PLE), enquanto que a MAE apresentou extratos com ótima atividade antioxidante, tempo de extração e razão S/F. Quanto à extração sequencial, pode-se afirmar que foi possível a separação e isolamentos de compostos a partir de processos pressurizados em sequência. Basicamente, a extração Soxhlet apresentou-se como uma referência para as demais, enquanto que a LPSE apresentou os piores resultados (1 mg/g de *trans*-resveratrol; EC_{50} de 60 $\mu\text{g/mL}$ e TFT de 75 mg EAG/g_e).

Quanto à aplicação da precipitação com anti-solvente

⇒ Após o processo de precipitação e secagem, cerca de 100% da emodina presente nos extratos foi retirada, enquanto que o resveratrol reduziu de 3,42 para 2,80 mg/g para a extração MAE.

Quanto à modelagem cinética

⇒ De forma geral, os modelos de Martínez e Sovová apresentaram desvios máximos (AARD%) de 5,95 e 4,23%, respectivamente. O aumento da vazão total e o acréscimo de etanol na mistura solvente ocasionaram um aumento no K_{FA} . O modelo de Cranck apresentou alto desvio máximo (40,54%) atribuído a não consideração dos efeitos convectivos no processo extrativo.

Referências

6. Referências

ADIL, Í. H.; ÇETIN, H. İ.; YENER, M. E.; BAYINDIRLI, A. Subcritical (carbon dioxide+ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.43, p.55–63, 2007.

AGRA, N. G. *Secagem e liofilização de manga: características físico-químicas, nutricionais e sensoriais*. 2006. 148f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

AKAY, S.; ALPAK, I.; YESIL-CELIK TAS, O. Effects of process parameters on supercritical CO₂ extraction of total phenols from strawberry (*Arbutus unedo L.*) fruits: An optimization study. *Journal of Separation Science*, v.34, p.1925–1931, 2011.

ALONSO-CARRILLO, N.; AGUILAR-SANTAMARÍA, MA. A.; VERNON-CARTER, E. J.; JIMÉNEZ-ALVARADO, R.; CRUZ-SOSA, F.; ROMÁN-GUERRERO, A. Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial Crops & Products*, v.103, p.213-221, 2017.

ALVES, S. B. *Estudo teórico e experimental do processo de secagem do Abacate (Persea americana Mill.)*. 2014. 140f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.24, n.2, 2006.

ARAÚJO, A. L. M. *Polpa de jambolão (Syzygium cumini) desidratada por liofilização e secagem em leito de jorro: caracterização físico-química funcional e impacto da secagem*.

2014. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, v.89, p.27-36, 2005.

AYUB, A.; POULOSE, N.; RAJU, R. Resveratrol improves survival and prolongs life following hemorrhagic shock. *Molecular Medicine*, v.21, n.1, p.305-312, 2015.

BALLARD, T. S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, v.120, n.4, p.1185-1192, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, n.1, p.113 – 123, 2006.

BAUR, J.A.; PEARSON, K.J.; PRICE, N.L.; JAMIESON, H.A.; LERIN, C.; KALRA, A.; PRABHU, V.V.; ALLARD, J.S.; LOPEZ-LLUCH, G.; LEWIS, K.; PISTELL, P.J.; POOSALA, S.; BECKER, K.G.; BOSS, O.; GWINN, D.; WANG, M.; RAMASWAMY, S.; FISHBEIN, K.W.; SPENCER, R.G.; LAKATTA, E.G.; LE COUTEUR, D.; SHAW, R.J.; NAVAS, P.; PUIGSERVER, P.; INGRAM, D.K.; DE CABO, R.; SINCLAIR, D.A. Resveratrol improves health and survival of mice on a highcalorie diet. *Nature*, v. 444, p.337–342, 2006.

BENOVÁ, B.; ADAM, M.; PAVLÍKOVÁ, P.; FISCHER J. Supercritical fluid extraction of piceid, resveratrol and emodin from Japanese knotweed. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 51, p.325–330, 2010.

BERMEJO, D. V.; IBANEZ, E.; REGLERO, G.; TURNER, C.; FORNARI, T.; RODRIGUEZ-MEIZOSO, I. High catechins/low caffeine powder from green tea leaves by pressurized liquid extraction and supercritical antisolvent precipitation. *Separation And Purification Technology*, v.148, p.49-56, 2015.

BICKER, J.; PETEREIT, F.; HENSEL, A. Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa* L. *Fitoterapia*, 2009, v.80, n.8, p.483-495, 2009.

BITENCOURT, R. G.; FILHO, W. A. R.; PAULA, J. T.; GARMUS, T. T.; CABRAL, F. A. Solubility of γ -oryzanol in supercritical carbon dioxide and extraction from rice bran. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.107, p.196-200, 2016.

BOLIGON, A. A.; MACHADO, M. M.; ATHAYDE, M. L. Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal chemistry*, v.4, n.7, p.517-522, 2014.

BOZZI, L. D. DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$. Química Nova Interativa, maio 2011. Disponível em: <<http://qnint.s bq.org.br/qni/>>. Acesso em: 13 de junho de 2017

BRADAMANTE, S.; BARENGHI, L.; VILLA, A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews*, v.22, p.169–188, 2004.

BRUN, G. W. *Processo de produção de erva-mate descafeinada e de micro/nanopartículas de cafeína usando dióxido de carbono supercrítico*. 2012. 118f. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais), Faculdade de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre.

BRUNNER, G. *Gas extraction. An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes*. New York: Springer-Verlag, 1994.

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

BRUNNER, G. Applications of supercritical fluids. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, v.1, p.321-42, 2010.

BUCIĆ-KOJIĆ, A.; SOVOVÁ, H.; PLANINIĆ, M.; TOMAS, S. Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry*, v.136, p.1136-1140, 2013.

BUCZER, B; GELDART, D. Determination of density of porous particles using very fine dense powders. *Powder Technology*, v.45, p.173-176, 1986.

CABRAL, I. S. R. *Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira*. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CAMPOMANES, A. M. F. *Recuperação de compostos bioativos via extração supercrítica e convencional dos resíduos de uva provenientes do processamento do pisco*. 2012. 251 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARNIEL, N.; DALLAGO, R. M.; DARIVA, C.; BENDER, J. P.; NUNES, A. L.; ZANELLA, O.; BILIBIO, D.; PRIAMO, W. L. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids from *Physalis angulate*. *Journal of Food Process Engineering*, v.40, n.3, 2017.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. J.; ROLDÁN, A.; DE ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Extraction of resveratrol from the pomace of *Palomino fino* grapes by supercritical carbon dioxide. *Journal of food engineering*, v.96, p.304 – 308, 2010.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. J. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from sunflower leaves with carbon dioxide and water on a pilot plant scale. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.45, p.37–42, 2008.

CAVALCANTI, R. N. *Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (myrciaria cauliflora) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática*. 2013. 235f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de

Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CAVALCANTI, R. N.; ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical CO₂ extraction of cupuassu butter from defatted seed residue: Experimental data, mathematical modeling and cost of manufacturing. *Food and Bioproducts Processing*, v.97, p.48-62, 2016.

CHONG, J.; POUTARAUD, A.; HUGUENEY, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, v.177, p.143–155, 2009.

CONDORET, J.; HERZI, N.; CAMY, S.; BOUAJILA, J.; DESTAC, P.; ROMDHANE, M. Supercritical CO₂ extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *Journal of Supercritical Fluids* v.82, p.72–82, 2013.

COOPER, K. A.; CHOPRA, M.; THURNHAM, D.I. Wine polyphenols and promotion of cardiac health. *Nutrition Research Reviews*, v.17, n.1, p.111 -130, 2004.

CRANK, J. *The Mathematics of Diffusion*. 2.ed. Oxford: University Press, 1975.

CUNHA, A. R. *Estudos teóricos de propriedades estruturais e eletrônicas da molécula emodina em solução*. 2009. 167f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física, Departamento de Física Geral e Experimental, Universidade de São Paulo.

DANLAMI, J. M.; ZAINI, M. A. A.; ARSAD, A.; YUNUS, M. A. C. Solubility assessment of castor (*Ricinus communis L*) oil in supercritical CO₂ at different temperatures and pressures under dynamic conditions. *Industrial Crops & Products*, v.76, p.34-40, 2015.

DIAS, F.; KLASSEN, A.; TAVARES, M.; DAVID, J. Fast Determination of Phenolic Compounds in Brazilian Wines from Vale do São Francisco Region by CE. *Chromatographia*, v.76, n.9, p.559-563, 2013.

DOCHERTY, J. J.; FU, M. M.; HAH, J.M.; SWEET, T. J.; FAITH, S. A.; BOOTH, T. Effect of resveratrol on herpes simplex virus vaginal infection in the mouse. *Antiviral Research*, v.67, p.155 – 162, 2005.

ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G.; KING, M.B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.16, n.1, p.43-58, 1999.

FARÍAS-CAMPOMANES, A. M.; ROSTAGNO, M. A.; MEIRELES, M. A. A. Production of polyphenol extracts from grape bagasse using supercritical fluids: Yield, extract composition and economic evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids* v.77, p.70–78, 2013.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A.; CABRAL, F. A. Extraction of essential oil of black pepper with liquid carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, v.20, n.2, p.121-133, 1993.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum L.*) essential oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.14, n.3, p.235-245, 1999.

FIELDS, P. R.; CHESTER, T. L.; STALCUP, A. M. Viscosity estimation in binary and ternary supercritical fluid mixtures containing carbon dioxide using a supercritical fluid chromatograph. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.34, n.12, p.995-1003, 2011.

FLÓREZ, N.; CONDE, E.; DOMÍNGUEZ, H. Microwave assisted water extraction of plant compounds. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.90, n.4, p.590-607, 2015.

FRANÇA, L. F.; REBER, G.; MEIRELES, M. A. A.; MACHADO, N. T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.14, n.3, p.247-256, 1999.

FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of beta-carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, v.47, n.2, p.259-269, 2008.

FRANZENER, G.; MOURA, G. S.; MEINERZ, C. C.; STANGARLIN, J. R. Ocorrência de *Sclerotium rolfsii* em *Rumex acetosa* no Paraná. *Summa Phytopathologica*, v.39, n.1, p.64, 2013.

FREITAS, L. S. *Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos*. 2007. 227f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, v.66, n.8, p.663-673, 2000.

GALVÃO, E. L. *Extração do óleo essencial de Cymbopogon winterianus J. com CO₂ pressurizado*. 2004. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

GALVÃO, E. L. *Extração supercrítica do óleo de linhaça: construção do extrator, estudo de parâmetros de processo, avaliação química e antioxidante do produto*. 2009. 142f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

HAMILTON, K. D.; BROOKS, P. R.; OGBOURNE, S. M.; RUSSELL, F. D. Natural products isolated from *Tetragonula carbonaria* cerumen modulate free radical-scavenging and 5-lipoxygenase activities in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.17, p.232, 2017.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. *International journal of food science & technology*, v.47, n.10, p.2023–2044, 2012.

HAN, S.; KWON, K. J.; SHIN, C.Y. Melatonin potentiates neuroprotective property of resveratrol through heme oxygenase-1 induction. *Alzheimer's and Dementia*, v.5, p.336 – 337, 2009.

İÇEN, H.; GURU, M. Effect of ethanol content on supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.55, p.156–160, 2010.

IQBAL, M. A.; BAMEZAI, R. N. K. Resveratrol inhibits cancer cell metabolism by down regulating pyruvate kinase M2 via inhibition of mammalian target of rapamycin. *PLoS One*, v.7, n.5, 2012.

JESUS, A. A.; ALMEIDA, L. C.; SILVA, E. A.; FILHO, L. C.; EGUES, S. M. S.; FRANCESCHI, E.; FORTUNY, M.; SANTOS, A. F.; ARAUJO, J.; SOUSA, E. M. B. D.; DARIVA, C. Extraction of palm oil using propane, ethanol and its mixtures as compressed solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.81, p.245–253, 2013.

JESUS, S. P. *Modelagem da cinética de transferência de massa no processo de extração supercrítica a partir de produtos naturais*. 2015. 187f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

JUNGES, A. Síntese de micro e nanopartículas de sílica e nanopartículas de paládio suportadas em sílica empregando CO₂ pressurizado. 2016. 112f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Aracaju.

KAMALI, H.; JALILVAND, M. R.; AMINIMOGHADAMFAROUJ, N. Pressurized fluid extraction of essential oil from *Lavandula hybrida* using a modified supercritical fluid extractor and a central composite design for optimization. *Journal of Separation Science*, v.35, n.12, p.1479-1485, 2012.

KAZAN, A.; KOYU, H.; TURU, I. C.; YESIL-CELIKTAS, O. Supercritical fluid extraction of *Prunus persica* leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.92, p.55-5, 2014.

KEMPER, K. J. Sorrel (*Rumex acetosa* L.). July 1999. Disponível em: <<http://www.longwoodherbal.org/sorrel/sorrel.pdf>>. Acesso em: 13 de agosto de 2017.

KEREM, Z.; BILKIS, I.; FLAISHMAN, M.A.; SIVAN, L. Antioxidant activity and inhibition of α -glucosidase by *trans*-resveratrol, piceid, and a novel *trans*-stilbene from the roots of israeli *Rumex Bucephalophorus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.1243-1247, 2006.

KONG, Y.; FU, Y. J.; ZU, Y. G.; LIU, W.; WANG, W.; HUA, X.; YANG, M. Ethanol modified supercritical fluid extraction and antioxidant activity of cajanin stilbene acid and pinostrobin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chemistry*, v.117, p.152–159. 2009.

KOVÁROVÁ, M.; FRANTÍK, T.; KOBLIHOVÁ, H.; BARTUNKOVÁ, K.; NYVLTOVÁ, Z.; VOSÁTKA, M. Effect of clone selection, nitrogen supply, leaf damage and mycorrhizalfungi on stilbene and emodin production in knotweed. *BMC Plant Biology*, v.11, p.98, 2011.

KRAUJALIS, P.; VENSKUTONIS, P. R. Optimisation of supercritical carbon dioxide extraction of amaranth seeds by response surface methodology and characterization of extracts isolated from different plant cultivars. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.73, p.80–86, 2013.

- LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I.; IBERN-GÓMEZ, M.; TORRE-BORONAT, M. C. Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p.1533-1536, 1999.
- LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. *Talanta*, v.53, p.771–782, 2001.
- LANGE, D. W.; VERHOEF, S.; GORTER, G.; KRAAIJENHAGEN, R. J.; WIEL, A. V.; AKKERMAN, J. N. Polyphenolic grape extract inhibits platelet activation through PECAM-1: An explanation for the French paradox. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v.31, n.8, p.1308 -1314, 2007.
- LEAL, P. F.; MAIA, N. B.; CARMELLO, Q. A. C.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; MEIRELES, M. A. A. Sweet basil (*Ocimum basilicum*) extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE): Global yields, chemical composition, antioxidant activity, and estimation of the cost of manufacturing. *Food and Bioprocess Technology* v.1, p.326–338, 2008.
- LEE, M.; KIM, S.; KWON, O.; OH, S.; LEE, H.; AHN, K. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *International Immunopharmacology*, v.9, p.418 – 424, 2009.
- LEE, Y. H.; CHARLES, A. L.; KUNG, H. F.; HO, C. T.; HUANG, T. C. Extraction of nobiletin and tangeretin from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier. *Industrial Crops and Products* 31, 59–64, 2010.
- LIAZID, A.; PALMA, M.; BRIGUI, J.; BARROSO, C. G. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, v.1140, n.1, p.29-34, 2007.
- LIN, S. P.; CHU, P. M.; TSAI, S. Y.; WU, M. H.; HOU, Y. C. Pharmacokinetics and tissue distribution of resveratrol, emodin and their metabolites after intake of *Polygonum cuspidatum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.144, n.3, p.671-676, 2012.

LIU, X.; YANG, D.; LIU, J.; XU, K.; WU, G. Modeling of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Calycopteris floribunda* leaves. *Chemical Papers*, v.68, n.3, p.316-323, 2014.

LÓPEZ-PADILLA, A.; RUIZ-RODRIGUEZ, A.; REGLERO, G.; FORNARI, T. Supercritical carbon dioxide extraction of *Calendula officinalis*: Kinetic modeling and scaling up study. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2017.

LUCAS-ABELLÁN, C.; MERCADER-ROS, M. T.; ZAFRILLA, M. P.; GABALDÓN, J. A.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology*, v.49, p.1255 – 1260, 2011.

LUCENA, A. P. S.; OLIVEIRA, E. J.; NASCIMENTO, R. J. B.; MACIEL, J. A. C.; TAVARES, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.23, p.30 – 36, 2010.

LU, H.; NI, W.; LIANG, Y.; MAN, R. Supercritical CO₂ extraction of emodin and physcion from *Polygonum cuspidatum* and subsequent isolation by semipreparative chromatography. *Journal of Separation Science*, v.29, p.2136–2142, 2006.

MACHADO, A. P. F. *Extração de compostos bioativos do bagaço da amora-preta (Rubus spp.) utilizando líquidos pressurizados*. 2014. 127f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MANDAL, V.; MOHAN, Y.; HEMALATHA, S. Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, v.1, n.1, p.7-18, 2007.

MARQUES, L. L. M.; PANIZZON, G. P.; AGUIAR, B. A. A.; SIMIONATO, A. S.; CARDOZO-FILHO, L.; ANDRADE, G.; OLIVEIRA, A. G.; GUEDES, T. A.; MELLO, J. C. P. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chemistry*, v.212, p.703-711, 2016.

MARTÍNEZ, J. *Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos*. 2005. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of Ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v.42, n.5, p.1057-1063, 2003.

MAZZUTTI, S. *Extração de compostos com importância biológica provenientes de Plantago major e Plantago lanceolata através de técnicas ambientalmente seguras*. 2016. 168f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MEIRELES, M. A. A. (2007). *Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants*. In Martínez, J.L. (Eds.). **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**. Boca Raton: CRC Press-Taylor and Francis Group, 2007, p.424.

MELO, M. M. R.; MARTINS, P. F.; SILVESTRE, A. J. D.; SARMENTO, P.; SILVA, C. M. Measurement and modeling of supercritical fluid extraction curves of *Eichhornia crassipes* for enhanced stigmasterol production: Mechanistic insights of the process. *Separation and Purification Technology*, v.163, p.189-198, 2016.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.51, n.1, p.10-16, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Manual de hortaliças não-convencionais, 2010. Disponível em: < http://www.abcsem.com.br/docs/manual_hortaliças_web.pdf >. Acesso em: 11 de agosto de 2017.

MODEY, W. K.; MULHOLLAND, D. A.; RAYNOR, M. W. Analytical Supercritical Fluid Extraction of Natural Products. *Phytochemical analysis*. v.7, p.1 – 15, 1996.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica L.*) fruit. *Separation and Purification Technology*, v.162, p.68-76, 2016.

MORELLI, L. L.; PRADO, M. A. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. *Ultrason Sonochem*, v.19, n.6, p. 1144–1149, 2012.

MOURA, P. M.; PRADO, G. H. C.; MEIRELES, M. A. A.; PEREIRA, C. G. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.62, 116–122, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v.1054, p.95 – 111, 2004.

NASCIMENTO, A. D. P.; SOARES, L. A. L.; STRAGEVITCH, L.; DANIELSKI, L. Extraction of *Acrocomia intumescens* Drude oil with supercritical carbon dioxide: Process modeling and comparison with organic solvent extractions. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.111, p.1-7, 2016.

NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, 2010, v.29, n.7, p.752-764, 2010.

OIKONOMOPOULOU, V. P.; KROKIDA, M. K.; KARATHANOS, V. T. The influence of freeze drying conditions on microstructural changes of food products. *Procedia Food Science*, v.1, p.647-654, 2011.

OLDONI, T. L. C. *Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindústrias*. 2010. 165f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

OLIVEIRA, D. A. *Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (Vitis Vinifera) das variedades Merlot e Syrah*. 2010. 211f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, D. S. *Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos*. 2014. 150f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PACHÚ, C. O. *Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos*. 2007. 117f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Centro de Ciência e Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

PAES, J. *Concentração de compostos bioativos de resíduos de mirtilo (Vaccinium myrtillus L.) usando extração com CO₂ supercrítico e nanofiltração*. 2016. 171f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult. *Phytotherapy Research*, v.24, p.S11-S14, 2010.

PARK, K. J.; YADO, M. K. M.; BROD, F. P. R. Estudo de secagem de pêra bartlett (*pyrus sp.*) em fatias. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.3, 2001.

PASCUAL-MARTÍ, M.; SALVADOR, A.; CHAFER, A.; BERNA, A. (2001). Supercritical fluid extraction of resveratrol from grape skin of *Vitis vinifera* and determination by HPLC. *Talanta*, v.54, p.735–740, 2001.

PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; FOGGIO, M. A.; SOUSA, I. M. O.; CABRAL, F. A. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, v.81, p.33-41, 2013.

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

PÉREZ-SERRADILLA, J. A.; CASTRO, M. D. L. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, v.124, n.4, p.1652-1659, 2011.

POEHLER, H.; KIRAN, E. Volumetric properties of carbon dioxide + ethanol at high pressures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v.42, n.2, p.384-388, 1997.

POERSCHMANN, J.; TROMMLER, U.; BIEDERMANN, W.; TRUYEN, U.; LÜCKER, E. Sequential pressurized liquid extraction to determine brain-originating fatty acids in meat products as markers in bovine spongiform encephalopathy risk assessment studies. *Journal of Chromatography A*, v.1127, n.1, p.26-33, 2006.

Q.ALVES, C.; M.DAVID, J.; P.DAVID, J.; V.BAHIA, M.; M.AGUIAR, R. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, v.33 (10), p.2202 – 2210, 2010.

RABESIAKA, M.; RAKOTONDRAMASY-RABESIAKA, L.; MABILLE, I.; PORTE, C.; HAVET, J. Extraction of trans-resveratrol from red wine and optimization by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, v.81, p.56 – 61, 2011.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, v.49, n.4, p.311-319, 2001.

REGITZ, C.; FITZENBERGER, E.; MAHN, F. L.; DUBLING, L. M.; WENZEL, U. Resveratrol reduces amyloid-beta (A β)-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Nutrition*, v.55, n.2, p.741-747, 2016.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, v.339, p.1523 -1526, 1992.

ROCKENBACH, I. I.; DA SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; FETT, R. Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*). *Rev Inst Adolfo Lutz*, v.66, n.2, p.158–163, 2007.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.28, p.238-244, 2008.

RODRIGUES, V. M.; SOUSA, E. M. B. D.; MONTEIRO, A. R.; CHIAVONE-FILHO, O.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent. *J. Supercritical Fluids*, v.22, p.21-36, 2002.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; GILBERT-LÓPEZ, B.; MENDIOLA, J. A.; QUIRANTES-PINÉ, R.; SEGURA-CARRETERO, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of microwave-assisted extraction and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* leaves by multiresponse surface methodology. *Electrophoresis*, v.37, n.13, p.1938-1946, 2016.

ROMERO-PÉREZ, A. I.; IBERN-GÓMEZ, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; TORRE-BORONAT, M. C. Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.1533-1536, 1999.

RUIZ-MATUTE, A. I.; RAMOS, L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, M. L. Fractionation of honey carbohydrates using pressurized liquid extraction with activated charcoal. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.56, n.18, pp.8309-8313, 2008.

SALVADOR, I. *Atividade antioxidante e teor de resveratrol em cacau, chocolates, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas*. 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de energia nuclear na agricultura e no ambiente, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. *Química Nova*, v.25, n.4, 2002.

SANTANA, A. L. B. D. *Estudo químico, antitérmico e antifúngico da madeira de lei Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) von Reis Alt. (Angico de Carço)*. 2011. 309f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química Fundamental, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SANTOS, D. N. *Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de Pitanga (Eugenia uniflora L.)*. 2012. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *Journal of Food Engineering*, v.108, n.3, p.444-452, 2012a.

SANTOS, E. R. M. *Extração, caracterização e avaliação bioativa do extrato de rumex acetosa*. 2013a. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

SANTOS, E. R. M.; OLIVEIRA, H. N. M.; OLIVEIRA, E. J.; AZEVEDO, S. H. G.; JESUS, A. A.; MEDEIROS, A. M.; DARIVA, C.; SOUSA, E. M. B. D. Supercritical fluid extraction

of *Rumex Acetosa L.* roots: yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.122, p.1-9, 2017.

SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*) Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). *Química Nova*, v.30, p.3, p.604-610, 2007.

SANTOS, S. A. O.; VILLAVERDE, J. J.; SILVA, C. M.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* Labill bark. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.71, p.71–79, 2012b.

SANTOS, W. J. *Extração de compostos antioxidantes da folha de mangueira (Mangifera indica L.) utilizando CO₂ supercrítico, água e etanol*. 2013b. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Engenharia de Processos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SANTOS, K. A.; KLEIN, E. J.; GAZIM, Z. C.; GONÇALVES, J. E.; CARDOZO-FILHO, L.; CORAZZA, M. L.; DA SILVA, E. A. Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythropappus*): Supercritical CO₂ oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.114, p.1-8, 2016.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.3, p.437 – 442, 2005.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. JIMENEZ, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, n.4, p.287–306, 2005.

SCHMUCH, J.; BECKERT, S.; BRANDT, S.; LÖHR, G.; HERMANN, F.; SCHMIDT, J. T.; BEIKLER, T.; HENSEL, A. Extract from *Rumex acetosa L.* for prophylaxis of periodontitis: inhibition of bacterial in vitro adhesion and of gingipains of *Porphyromonas gingivalis* by

epicatechin-3-O-(4 β →8)-epicatechin-3-O-gallate (procyanidin-B2-Di-gallate). *PLoS ONE*, v.10, n.3, 2015.

SETYANINGSIH, W.; SAPUTRO, I. E.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chemistry*, v.169, p.141-149, 2015.

SHARIF, K. M.; RAHMAN, M. M.; AZMIR, J.; SHAMSUDIN, S. H.; UDDIN, M. S.; FAHIM, T. K.; ZAIDUL, I. S. M. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant rich extract from *Pereskia bleo*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.21, p.1314-1322, 2015.

SHI, N.; ZHU, C.; LI, L. S. Rehabilitation training and resveratrol improve the recovery of neurological and motor Function in rats after cerebral ischemic injury through the sirt1 signaling pathway. *BioMed Research International*, v.2016, p.1-10, 2016.

SILVA, E. B. *Quebra de emulsões de petróleo via micro-ondas: estudo da partição de espécies ácidas*. 2010. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Aracaju.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. *Introdução à termodinâmica da engenharia química*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.16, p.144 – 158, 1965.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v.30, n.2, p.351 – 355, 2007.

SOUSA, E. M. B. D.; CHIAVONE-FILHO, O.; MORENO, M. T.; SILVA, D. N.; MARQUES, M.; MEIRELES, M. A. A. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippiasidoides cham.* using pressurized carbon dioxide. *Brazilian J. Chem. Eng.*, v.19, p.229–241, 2000.

SOUSA, E. M. B. D. Construção e utilização de um dispositivo de extração com fluido pressurizado, aplicado a produtos naturais. 2001. 195f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

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

SOUTO, A. A., Porto Alegre – RS. **Process of obtainment of *trans-resveratrol and/or emodin and nutraceutical compositions containing them.*** C.I. 514/680. US n. DI 0081724. 30 jan. 2008; 1 apr. 2010. Patent Application Publication, Atlanta, 1 apr. 2010.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.33, p.35–52, 2005.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—I. Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Science*, v.49, n.3, p.409-414, 1994.

SOVOVÁ, H.; ZAREVÚCKA, M.; VACEK, M.; STRÁNSKÝ, K. Solubility of two vegetable oils in supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.20, n.1, p.15-28, 2001.

SVILAAS, A.; SAKHI, A. K.; ANDERSEN, L. F.; SVILAAS, T.; STROM, E. C.; JACOBS, D. R. JR.; OSE, L.; BLOMHOFF, R. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *The Journal of Nutrition*, v.134, n.3, p.562-567, 2004.

TAAMALLI, A.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; IBAÑEZ, E.; ZARROUK, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS(2). *Journal of agricultural and food chemistry*, v.60, n.3, p.791-798, 2012.

TAKEOKA, G. R.; DAO, L.; HARDEN, L.; PANTOJA, A.; KUHL, J. C. Antioxidant activity, phenolic and anthocyanin contents of various rhubarb (*Rheum* spp.) varieties. *International Journal of Food Science and Technology*, v.48, p.172–178, 2013.

TAN, C.; LIOU, D. Modeling of desorption at supercritical conditions. *AIChE Journal*, v.35, n.6, p.1029-1031, 1989.

VATAI, T.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, v.90, p.246–254, 2009.

VIGANÓ, J.; ZABOT, G. L.; MARTÍNEZ, J. Supercritical fluid and pressurized liquid extractions of phytonutrients from passion fruit by-products: Economic evaluation of sequential multi-stage and single-stage processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, April 2017, Vol.122, p.88-98, 2017.

VILLANUEVA-BERMEJO, D.; ZAHRAN, F.; TROCONIS, D.; VILLALVA, M.; REGLERO, G.; FORNARI, T. Selective precipitation of phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. extracts by supercritical anti-solvent technique. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.120, p.52-58, 2017.

WANG, D.; ZHANG, Z.; JU, J.; WANG, X.; QIU, W. Investigation of piceid metabolites in rat by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v.879, p.69–74, 2011.

WANG, G.; HU, Z.; SONG, X.; CUI, Q.; FU, Q.; JIA, R.; ZOU, Y.; LI, L.; YIN, Z. Analgesic and anti-inflammatory activities of resveratrol through classic models in mice and rats. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2017, p.9, 2017.

WANG, G.; HUANG, X.; PEI, D.; DUAN, W.; QUAN, K.; LI, X.; DUOLONG DI, D. DPPH-HPLC-DAD analysis combined HSCCC for screening and identification of radical scavengers in *Cynomorium songaricum* Rupr. *New Journal of Chemistry*, v.40, p.3885-3891, 2016.

WANG, H.; WANG, Z.; GUI X.; SUN, Y.; LEI, F.; ZHAO, L.; LI, W. Optimization of pressurized liquid extraction of three major acetophenones from *Cynanchum bungei* using a box-behnken design. *International Journal of Molecular Sciences*, v.13, n.11, p.14533-14544, 2012.

WOJTOWICZ, E.; KRUPSKA, A.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. Antioxidant activity and free radicals of roasted herbal materials. *Herba Polonica*, v.63, n.2, p.34-41, 2017.

YANG, N.; SAMPATHKUMAR, K.; LOO, S. C. J. Recent advances in complementary and replacement therapy with nutraceuticals in combating gastrointestinal illnesses. *Clinical Nutrition*, v.36, n.4, p.968-979, 2017.

YANG, Y. C.; WEI, M. C. Ethanol solution-modified supercritical carbon dioxide extraction of triterpenic acids from *Hedyotis corymbosa* with ultrasound assistance and determination of their solubilities. *Separation and Purification Technology*, v.150, p.204–214, 2015.

YESIL-CELIK TAS, O.; PILAVTEPE, M. Mathematical modeling and mass transfer considerations in supercritical fluid extraction of *Posidonia oceanica* residues. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.82, p.244–250, 2013.

ZIAKOVÁ, A.; BRANDSTETEROVÁ, E. Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* v.25, p.3017–3032, 2002.

ZUKNIK, M. H.; NORULAINI, N. A. N.; DALILA, W. S. W. N.; ALI, N. R.; OMAR, A. K. M. Solubility of virgin coconut oil in supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* v.168, p.240–244, 2016.

Anexos

7. Anexos

Anexo A – Foto da unidade da extração com líquido pressurizado



Figura 7.1 – Unidade de extração com líquido pressurizado (PLE)

Anexo B – Quantidade de reagente e solvente para a quantificação do teor de fenólicos totais nos extratos da *Rumex acetosa*

Tabela 7.1 – Planilha contendo os volumes utilizados de cada solvente e reagente para os ensaios reacionais com os extratos da *Rumex acetosa*

<i>Concentração final das soluções dos extratos</i>	<i>Volume de solução de amostra a 1,0 mg/mL</i>	<i>Volume de solução de Na₂CO₃ a 15%</i>	<i>Volume de água destilada</i>	<i>Volume do reagente Folin-Ciocalteu</i>
50,0 µg/mL	500 µL	600 µL	8700 µL	200 µL
100,0 µg/mL	1000 µL	600 µL	8200 µL	200 µL
200,0 µg/mL	2000 µL	600 µL	7200 µL	200 µL

Anexo C – Dados de entrada para a modelagem utilizando o *software Tecanalysis*.

Tabela 7.2 – Dados de entrada utilizados no ajuste das curvas cinéticas de extração referentes a SFE nas condições 20 MPa / 60 °C / 15% / 4 mL/min

<i>SFE 20 MPa / 60 °C / 15% / 4 mL/min</i>		<i>Tempo</i> (min)	<i>Massa acumulada</i> (g)
Temperatura (K)	333,15	0	0
Porosidade Leito	0,41	10	0,0509
Rendimento (Massa extrato./Matéria-prima)	0,0078	25	0,1058
Densidade do sólido (g/cm ³)	0,73	40	0,1347
Densidade do Solvente (g/cm ³)	0,74	60	0,1644
Vazão de solvente (g/min)	3,88	80	0,1808
Altura do leito (cm)	10,23	100	0,1939
Diâmetro do leito (cm)	2,16	120	0,2049
Diâmetro da partícula (cm)	0,142	140	0,2147
Massa de matéria prima (g)	30,0323	160	0,2239
Solubilidade (g/g)	0,0044	180	0,2335
Viscosidade do solvente (g/cm.min)	0,06		
Número de pontos da curva cinética	11		

Tabela 7.3 – Dados de entrada utilizados no ajuste das curvas cinéticas de extração referentes a SFE nas condições 15 MPa / 40 °C / 35% / 1 mL/min

<i>SFE 15 MPa / 40 °C / 15% / 1 mL/min</i>		<i>Tempo</i> (min)	<i>Massa acumulada</i> (g)
Temperatura (K)	313,15	0	0
Porosidade Leito	0,41	10	0,0395
Rendimento (Massa extrato/Matéria-prima)	0,0107	25	0,1142
Densidade do sólido (g/cm ³)	0,73	40	0,1580
Densidade do Solvente (g/cm ³)	0,86	60	0,1949
Vazão de solvente (g/min)	0,86	80	0,2233
Altura do leito (cm)	10,23	100	0,2501
Diâmetro do leito (cm)	2,16	120	0,2718
Diâmetro da partícula (cm)	0,142	140	0,2917
Massa de matéria prima (g)	30,005	160	0,3084
Solubilidade (g/g)	0,0045	180	0,3219
Viscosidade do solvente (g/cm.min)	0,06		
Número de pontos da curva cinética	11		

Tabela 7.4 – Dados de entrada utilizados no ajuste das curvas cinéticas de extração referentes a PLE nas condições 15 MPa / 80 °C / EtOH / 1 mL/min

<i>PLE 15 MPa / 80 °C / EtOH / 1 mL/min</i>		<i>Tempo (min)</i>	<i>Massa acumulada (g)</i>
Temperatura (K)	353,15	0	0
Porosidade Leito	0,41	10	0,4785
Rendimento (Massa extrato/Matéria-prima)	0,0870	25	0,9303
Densidade do sólido (g/cm ³)	0,73	40	1,1657
Densidade do Solvente (g/cm ³)	0,8	60	1,4170
Vazão de solvente (g/min)	0,8	80	1,6055
Altura do leito (cm)	8,5	100	1,7598
Diâmetro do leito (cm)	2,16	120	1,8872
Diâmetro da partícula (cm)	0,142	140	1,9943
Massa de matéria prima (g)	25,0026	160	2,0912
Solubilidade (g/g)	0,048	180	2,1766
Viscosidade do solvente (g/cm.min)	0,06		
Número de pontos da curva cinética	11		