



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE *Vernonia amygdalina Delile* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS

Uberlândia – MG

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE *Vernonia amygdalina Delile* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS

Fabíola Medeiros da Costa

Orientador: Érika Ohta Watanabe

Coorientadora: Carla Eponina Hori

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia – MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837e Costa, Fabíola Medeiros da, 1987-
2016 Extração de compostos bioativos de folhas de *Vernonia amygdalina*

Delile utilizando dióxido de carbono em condições supercríticas / Fabíola Medeiros da Costa. - 2016.

93 f. : il.

Orientadora: Érika Ohta Watanabe.

Coorientadora: Carla Eponina Hori.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia Química - Teses.
 2. Boldo - Teses.
 3. Extração (Química) - Teses.
 4. Compostos bioativos - Teses.
 5. Antioxidantes - Teses.
- I. Watanabe, Érika Ohta. II. Hori, Carla Eponina. III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 30 DE JULHO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Érika Ohta Watanabe
Orientadora (PPGEQ/UFU)

Prof. Dr^a. Carla Eponina Hori
Coorientadora (PPGEQ/UFU)

Prof. Dr^o. Cícero Naves de Ávila Neto
FEQ/UFU

Prof^a. Dr^a. Juliana de Souza Ferreira
FEQ/UFU

Dr^o. Willyan Machado Giufrida
Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

Ao nosso **Senhor** muito obrigada por conceder graças em minha vida, pela Tua constante presença na minha jornada.

Às professoras Érika Ohta Watanabe e Carla Eponina Hori, muito obrigada pela orientação, pela oportunidade de crescimento.

Ao professor Lúcio Cardozo Filho pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos amigos de trabalho, pelos momentos alegres, pelo apoio nos momentos difíceis e principalmente, pela companhia agradável e mútua colaboração, especialmente a Carol, Estelle, Rondinele e Letícia.

Aos colegas de todos os laboratórios pelo suporte e auxílio na obtenção de resultados.

A minha companheira de moradia, Mariana, pela força e contribuição para a conquista deste título.

Às amizades construídas na cidade, especialmente a Nicilene, Laiane, Felipe e Fernando.

À todos da minha família, que jamais mediram esforços acreditando que eu poderia chegar até aqui.

Ao programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade.

Ao CNPq, Vale S.A. (Processo TEC – RDP-00154-10), FAPEMIG, CAPES, pelo apoio financeiro.

Finalmente, a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“Tudo parece impossível até que
seja feito”*

Nelson Mandela

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 FUNDAMENTOS EM EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC).....	5
2.1.1 Fluido supercrítico	5
2.1.2 Extração supercrítica	9
2.1.3 Mecanismos da extração supercrítica	11
2.1.4 Aplicações da extração supercrítica	15
2.1.5 Estudos recentes sobre a extração supercrítica.....	17
2.2 <i>Vernonia amygdalina Delile</i>.....	19
2.2.1 Efeitos medicinais de alguns contituíntes da planta <i>Vernonia amygdalina Delile</i> ...	23
2.2.1.1 Fitol.....	23
2.2.1.2 Ácido hexadecanoíco.....	23
2.2.1.3 Ácido 9,12-octadecadienoíco	24
2.2.1.4 Ácido α-linolênico	24
2.3 ESTADO DA ARTE	25
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	26
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	27
3.2.1 Extração supercrítica (ESC)	27
3.2.2 Extração à baixa pressão com solvente orgânico (Soxhlet)	30
3.2.2.1 Densidade do CO ₂ supercrítico	31
3.2.2.2 Solubilidade	31
3.2.2.3 Rendimento global das extrações supercríticas	32
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS.....	32
3.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	32
3.3.2 Espectrofotometria UV-visível.....	33
3.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) do extrato de <i>Vernonia amygdalina Delile</i>	34
3.3.3.1 Derivatização do extrato	34
3.3.3.2 Metodologia para análise	34
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	35
3.4.1 Método de redução do radical estável livre DPPH'.....	35
3.4.2 Método para determinação do teor de fenólicos totais	36
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	38

4.1 EXTRAÇÕES	38
4.1.1 Extração com fluido supercrítico.....	38
4.1.2 Extração com solventes orgânicos do tipo Soxhlet	46
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	48
4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	48
4.2.2 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível.....	49
4.2.3 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	52
4.2.3.1 Constituintes majoritários encontrados no extrato da planta.....	52
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	54
4.3.1 Método de redução do DPPH [•]	54
4.3.2 Compostos fenólicos totais	58
5 CONCLUSÕES.....	61
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7 APÊNDICES	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de fases para o CO ₂ puro em sistema fechado.....	6
Figura 2. Curvas típica de extração - mecanismos de transferência de massa.....	12
Figura 3. Solubilidade do naftaleno em CO ₂ supercrítico em função da pressão.	13
Figura 4. Diagrama de pressão versus densidade do dióxido de carbono.	14
Figura 5. Principais famílias de compostos encontrados nos extratos obtidos por extração em condições supercríticas de biomassa vegetal.	16
Figura 6. <i>Vernonia amygdalina Delile</i>	20
Figura 7. Estrutura química do fitol.....	23
Figura 8. Estrutura química do ácido hexadecanóico.....	24
Figura 9. Estrutura química do ácido 9,12-octadecadienóico	24
Figura 10. Estrutura química do ácido α -linolênico	25
Figura 11. Imagem do aparato experimental utilizado na extração com CO ₂ em condições supercríticas.	27
Figura 12. Esquema do aparato experimental utilizado na extração com CO ₂ em condições supercríticas: (A) Cilindro de CO ₂ ; (B) Bomba de alta pressão; (C) Extrator; (D, E) Banho termostatizado; (F) Controlador de temperatura na válvula de expansão; (V1, V2) Válvulas gavetas; (V3) Válvula macrométrica; (V4) Válvula de expansão micrométrica; (G) Frasco de coleta.....	28
Figura 13. Extrator Soxhlet	31
Figura 14. Extratos diluídos em metanol obtidos por extração supercrítica a 250 bar (A) e 200 bar (B)	41
Figura 15. Curva de extração em condições supercríticas para as folhas de <i>Vernonia amygdalina Delile</i> no tempo de pré-extração de 30 minutos em diferentes valores de temperaturas: (A) 40 °C; (B) 50 °C; (C) 60 °C. Os valores de pressão utilizados nas extrações foram: (o) P = 150 bar; (\times) P= 200 bar; (\blacksquare) P=250 bar.	42
Figura 16. Isotermas de rendimento global do sistema <i>Vernonia amygdalina Delile</i> + CO ₂	44
Figura 17. Isotermas de rendimento global do sistema <i>Vernonia amygdalina Delile</i> + CO ₂ ...44	44
Figura 18. Curvas de solubilidade em função da densidade a temperaturas constantes de 40, 50 e 60 °C.....	46
Figura 19. Estrutura molecular de flavonóides.....	50

Figura 20. Espectros eletrônicos de flavonóides em metanol	50
Figura 21. Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos supercríticos a (A) 200 bar e (B) 250 bar e (C) extrato etanólico	51
Figura 22. Curva padrão de ácido gálico	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Densidade, viscosidade e coeficiente de difusão de fluidos supercríticos, gases e líquidos.....	6
Tabela 2. Propriedades críticas de vários solventes empregados na extração supercrítica	8
Tabela 3. Vantagens e desvantagens da extração supercrítica.	10
Tabela 4. Condições experimentais dos ensaios em meio supercrítico.....	28
Tabela 5. Fase móvel e revelador utilizado para identificação de flavonóides e fenólicos totais.	33
Tabela 6. Testes preliminares para escolha das condições de operação.....	39
Tabela 7. Rendimento global de extrato de <i>Vernonia amygdalina Delile</i> obtido por extração supercrítica.....	40
Tabela 8. Rendimento global de extrato de <i>Vernonia amygdalina Delile</i> obtido por solventes orgânicos.....	47
Tabela 9. Propriedades relevantes dos solventes utilizados nas extrações Soxhlet.....	47
Tabela 10. Composição do extrato ESC (% em área) da planta em diferentes condições de extração (°C/bar).....	52
Tabela 11. Composição dos extratos (% em área) obtidos com os solventes hexano, diclorometano e etanol.....	53
Tabela 12. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de <i>Vernonia amygdalina Delile</i> usando o método DPPH'.....	55
Tabela 13. Teores de compostos fenólicos dos extratos de folhas de <i>Vernonia amygdalina Delile</i> expressos em gEAG/100g de extrato.....	59

LISTA DE SÍMBOLOS

- % AA - percentual da atividade antioxidantes
- Abs._{amostra} – absorbância da amostra
- Abs._{controle negativo} – absorbância do controle negativo
- ANOVA – análise de variância
- CCD – cromatografia em camada delgada
- CE₅₀ - concentração de extrato necessária para reduzir em 50% o DPPH[•] da reação
- CG-EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CER – *Constant Extraction Rate*
- DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazila
- EAG - equivalentes de ácido gálico
- ESC - extração supercrítica
- FER – *Fall Extraction Rate*
- m_{alim} – massa alimentada
- m_E – massa total de extrato
- m_{extraída} – massa de extrato a cada tempo
- m_{gás} – massa de CO₂ consumida a cada instante
- MSTFA – N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
- NP/PEG – difenilboriloxietilamina / polietilenoglicol
- P - pressão
- P.A – grau analítico
- R – rendimento global
- t – tempo
- T- temperatura
- T_c - temperatura crítica
- UV/VIS – ultravioleta visível
- V.A – *Vernonia amygdalina Delile*

RESUMO

A espécie *Vernonia amygdalina Delile* é conhecida por várias sinônimas populares nas regiões brasileiras como: boldo, boldo-bahiano, boldo-goiano, alumã, figatil, heparém e árvore-do-pinguço. Ela está associada ao tratamento e ao controle de mais de vinte doenças e como paliativo na medicina popular. Além de ser utilizada na medicina humana, está associada também à medicina veterinária e zoofarmacognosia. Considerando as doenças que são rotineiramente tratadas com a planta, pode-se verificar a utilização das folhas contra doenças do trato gastrointestinal, tais como diarreia, constipação, dor de estômago, vermes intestinais e infecções bacterianas. A aplicação da tecnologia supercrítica para a extração de compostos bioativos desta espécie pode ser atrativa, devido à baixa temperatura de operação e alta pureza dos extratos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o rendimento global de extração e a atividade antioxidante e identificar os constituintes fitoquímicos dos extratos obtidos com CO₂ pressurizado de *Vernonia amygdalina Delile* sob variação dos parâmetros pressão, temperatura e tempo de pré-extração e compará-los com os extratos obtidos pelo método convencional Soxhlet, com os solventes hexano, diclorometano e etanol. A extração supercrítica ocorreu nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e em pressões 100, 150, 200 e 250 bar. Os extratos supercríticos da planta apresentaram o rendimento global de 0,78% a 1,48% para o tempo de pré-extração de 30 min, já para 60 min foi de 0,71% a 1,39%. A condição de extração que favoreceu o maior rendimento para as folhas secas foi de 60 °C e 250,0 bar (1,48% para o tempo de pré-extração de 30 min e 1,39% para o tempo de 60 min). Foi possível identificar alguns componentes majoritários na espécie como: o ácido palmítico (10,02 – 19,01%), fitol (4,63 – 11,82%), ácido 9,12-octadecadienóico (9,84 – 20,49%), ácido α-linolênico (10,89 – 28,04%) e ácido octadecanóico (2,37 – 15,20%). No entanto, não foi possível identificar vários componentes que apresentaram composições elevadas, em relação ao percentual em área, pois alguns componentes que estão presentes nas folhas da espécie encontram-se em fase de pesquisa. Além disso, testes de atividade antioxidante mostraram que o material testado apresentou baixo poder antioxidante exibindo valores de CE₅₀ entre 622,62 a 937,88 µg/mL. Sendo assim, a extração supercrítica se mostrou como um método promissor para a obtenção de compostos bioativos da *Vernonia amygdalina Delile* utilizados para desenvolvimento de medicamentos a base de produtos naturais, em virtude das várias vantagens, tais como: não deixa resíduos no extrato, não poluente, inodoro.

Palavras-chave: *Vernonia amygdalina Delile*, extração supercrítica, atividade antioxidante.

ABSTRACT

The species *Vernonia amygdalina Delile* is known in the Brazilian regions as *boldo*, *boldo-bahiano*, *boldo-goiano*, *alumã*, *figatil*, *heparém* e *árvore-do-pinguço*. It is used in folk medicine for the treatment and control of over twenty diseases. Besides being used in human medicine, it is also associated with veterinary and zoofarmacognosy medicine. Considering the diseases that are routinely treated with the plant, it can be verified the use of the leaves against diseases of the gastrointestinal system such as diarrhea, constipation, stomach pain, intestinal worms and bacterial infections. The application of supercritical fluid technology for the extraction of bioactive compounds of this type may be attractive due to the low operating temperature and extracts of high purity. In this context, the aim of this study was to evaluate the overall efficiency of extraction, antioxidant activity and identify the phytochemical constituents of the extracts obtained with pressurized CO₂ from *Vernonia amygdalina Delile* under variation of the parameters pressure, temperature and pre-extraction time and compare them with the extracts obtained by the conventional method Soxhlet using hexane, dichloromethane and ethanol. The supercritical extraction occurred at temperatures of 40, 50 and 60 °C and at pressures of 100, 150, 200, 250 bar. Tests of antioxidant activity were performed. The supercritical extracts of the plant showed the overall yield of 0.78% to 1.48% for 30 min of pre-extraction time, and 0.71% to 1.39% for 60 min. The extraction condition which favors the highest yield for the dry leaves was 60 °C and 250.0 bar. It was possible to identify some major components in species such as palmitic acid, phytol, 9,12-octadecadienoic acid, α-linolenic acid and octadecanoic acid. However, it was not possible to identify various components with high concentration in relation to percentage of area, so many components that are present in the leaves of the species still are in research phase. Furthermore, the material tested showed low antioxidant exhibiting EC₅₀ values ranging from 622.62 to 937.88 µg/mL. Thus, the supercritical extraction tends to be a better method than the extraction to obtain bioactive compounds from *Vernonia amygdalina Delile* used to develop drugs based on natural products, because of several advantages, such as non-polluting, odorless and leaving no residue in the extract, among others.

Keywords: *Vernonia amygdalina Delile*, supercritical extraction, antioxidant activity.

1 - INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas como medicamentos ao longo da história humana. O conhecimento sobre o uso da planta foi generalizada em civilizações antigas. Até meados do século XIX, as plantas foram os principais agentes terapêuticos usados por seres humanos, e mesmo hoje seu papel na medicina ainda é relevante (HAYTA et al., 2014). Nos países em desenvolvimento e sociedades rurais, estima-se que para 80% das pessoas, a utilização de plantas medicinais é um valioso recurso e, além disso, elas fornecem uma alternativa real para os cuidados primários de saúde (CALVO e CALVERO, 2014; MELO e SAWAYA, 2015). No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

A importância global de plantas medicinais pode ser ilustrada pelas numerosas drogas convencionais que foram obtidas a partir de plantas e são correntemente utilizadas na prática clínica. A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundários relevante da mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma (MASULLO et al., 2015).

Várias espécies do gênero *Vernonia* (Asteraceae) são utilizados de forma medicinal, principalmente na América do Sul e Central e na África. No Brasil, *Vernonia amygdalina* Delile é utilizada na medicina popular em distúrbios gastrointestinais, dor de cabeça e diarreia. A planta é cultivada em diferentes regiões do país onde é conhecida como boldo, boldo-bahiano, boldo-goiano, alumã, figatil, heparém e árvore-do-pinguço, embora estes nomes populares são também compartilhadas por outras espécies do mesmo gênero (MONTEIRO et al., 2001).

Praticantes de medicina tradicional usam a planta como um anti-helmíntico, no tratamento da malária, laxante, tônico digestivo, antipirético e para o tratamento

tópico de feridas. A investigação científica nas últimas décadas tem examinado estas reivindicações e descobriu que extractos da planta tem inúmeras propriedades fitoterápicas. Os extractos de *Vernonia amygdalina Delile* demonstrou ter ação antimicrobiana (antibacterianas, antifúngicas, antiplasmódica etc), anti-cancerígena, antioxidante, hipoglicemiante, ocitótico, hepatoprotetora, e outras propriedades. Acredita-se que estas propriedades estão intermediadas com a ação de diferentes fitoquímicos encontrados na planta, agindo isoladamente ou em conjunto (IJEH e EJKE, 2011).

As avaliações fitoquímicas revelaram teores elevados de vitaminas antioxidantes (A, C, E e riboflavina), elementos minerais (Fe, Se, Zn, Cu, Cr e Mn) e fitocompostos em diversas partes da planta *Vernonia amygdalina Delile*, especialmente nas folhas (ATANGWHO et al., 2013). Os fitocompostos presentes nas folhas são as saponinas do tipo vernaliosides A1, A2, A3, A4, B2, B3, C, D e E; saponinas esteróides; lactonas sesquiterpênicas, vernolide, vernodalol, vernolepin, vernodalin, hidroxivernalide (ERASTO et al., 2006); flavonóides, luteolina, luteolina 7-O-β-glucoroniside e luteolina 7-O-β-glucósido (KOSHIMIZU et al., 1994), apigenina; e outros compostos presentes como os terpenos, cumarinas, ácidos fenólicos, lignanas, xantonas e antraquinonas (AWE et al., 1999; NTIE-KANG et al., 2014; ADEDAPO et al., 2014).

A extração destes compostos pode ser realizada com o uso de fluido pressurizado, principalmente o CO₂. A extração com dióxido de carbono supercrítico atraiu consideravelmente a atenção nos últimos anos como uma alternativa promissora em comparação aos métodos de extração convencionais, como: extração com solvente orgânico, destilação por arraste de vapor e prensagem mecânica para extração de óleos e outros compostos. Isto ocorre, pois ela oferece numerosas vantagens, incluindo a ausência de resíduos de solvente, uma melhor retenção de compostos aromáticos e por não promover a degradação térmica de compostos termolábeis (SAHENNA et al., 2009).

Muitos processos químicos e bioquímicos utilizando fluidos supercríticos têm sido avaliados por uma vasta gama de indústrias dos setores de agricultura, alimentação, cosméticos, farmacêuticas, tintas, têxteis, eletrônicos e semicondutores e tratamentos de resíduos. Segundo Bartlett et al. (2014), o uso de fluidos supercríticos apresenta-se como uma alternativa ao uso de solventes orgânicos convencionais em diversas aplicações, como: em processos de separação, extração, sorção, cromatografia e secagem; processos mecânicos, como homogeneização, extrusão, micronização, encapsulamento e impregnação; físico químico, como cristalização; químico, como a emulsificação e reacionais. As propriedades de

um fluido supercrítico são utilizadas para extrair seletivamente um composto específico ou para fracionar misturas alterando a temperatura e pressão sem qualquer mudança de fase.

A extração com fluido supercrítico é uma operação unitária, onde são utilizados solventes acima de seus pontos críticos para extraírem componentes solúveis de uma mistura. Esta operação tem despertado grande interesse de pesquisa devido às suas vantagens na qualidade dos produtos extraídos quando comparados com aqueles extraídos por técnicas tradicionais (RAVENTÓS et al., 2002). Dentre essas vantagens, pode-se destacar que os extratos não são alterados termicamente, não sofrendo oxidação, hidrólise, esterificação, caramelização, ou seja, o extrato permanece no seu estado original (BOZAN e TEMELLI, 2002). Além disso, os solventes que podem ser reutilizados na extração, normalmente são gasosos à temperatura e pressão ambiente, portanto, o extrato e o solvente são facilmente recuperados (SETIANTO et al., 2009). Ademais, através do ajuste da pressão e/ou temperatura e adição de modificadores de propriedades da mistura, o poder de solvatação dos gases comprimidos podem sofrer grandes alterações (BRUNNER, 2005; JOKIC et al., 2012a). Porém, este processo apresenta algumas desvantagens, como: a extração supercrítica é realizada comumente com o solvente CO₂, e, portanto, dificilmente os componentes polares são carreados na ausência de co-solventes (MEIRELES, 2009a); os extratos obtidos apresentaram características diferentes quando comparados com aqueles via extração convencional, como a extração com solventes orgânicos e a hidrodestilação, (SAHENNA et al., 2009) e ainda este método exige alto investimento inicial por operar com pressões elevadas.

Ressalta-se aqui, que poucos trabalhos realizaram a extração de compostos das folhas de *Vernonia amygdalina Delile* a partir de técnicas convencionais de extração e nenhum com fluido pressurizado, apesar da importância comprovada desta planta em uso medicinal. Essa ausência de informações na literatura motivou este trabalho, visando comparar as duas técnicas.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral a extração de compostos bioativos de folhas de *Vernonia amygdalina Delile* utilizando o solvente dióxido de carbono em condições supercríticas. Para alcançar a meta do objetivo geral foi necessário o desenvolvimento das seguintes etapas:

- ✓ Comparar os extratos obtidos com o uso de dióxido de carbono em condições supercríticas e com o uso de solventes orgânicos etanol, hexano e diclorometano;
- ✓ Determinar o rendimento global da extração de compostos bioativos utilizando solventes orgânicos e dióxido de carbono em condições supercríticas;

- ✓ Medir as cinéticas de extração de compostos bioativos com o uso de dióxido de carbono em meio supercrítico;
- ✓ Analisar a composição de flavonóides e fenólicos totais por cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrofotometria UV-visível;
- ✓ Identificar os compostos em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS);
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos extratos contendo os compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile*.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNDAMENTOS EM EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC)

2.1.1 Fluido supercrítico

Thomas Andrews, em 1869, relatou o resultado de seus experimentos relacionados à liquefação de gases. Na publicação consta que, para todos os gases em geral, acima de uma certa temperatura e pressão, denominadas de críticas ocorrerá a liquefação. Andrews determinou em seus experimentos a temperatura crítica do dióxido de carbono e éter, 31 °C e 200 °C, respectivamente (BASSALO, 1998; SMITH, 1999).

Um fluido encontra-se no estado supercrítico quando está acima de sua pressão crítica (P_c) e acima de sua temperatura crítica (T_c). O diagrama de fases mostrado na Figura 1 exemplifica que para um composto puro é possível distinguir os três estados físicos do material: sólido, líquido e vapor. Estes estados são separados pela curva de fusão ou equilíbrio sólido - líquido, pela curva de sublimação ou equilíbrio sólido - vapor e pela curva de vaporização ou equilíbrio líquido - vapor. Há também dois pontos importantes: o ponto triplo em que os três estados coexistem e o ponto crítico que se encontra no final da curva de vaporização, em que a fase gás e líquido fundem-se para formar um fluido homogêneo (RAVENTÓS et al., 2002).

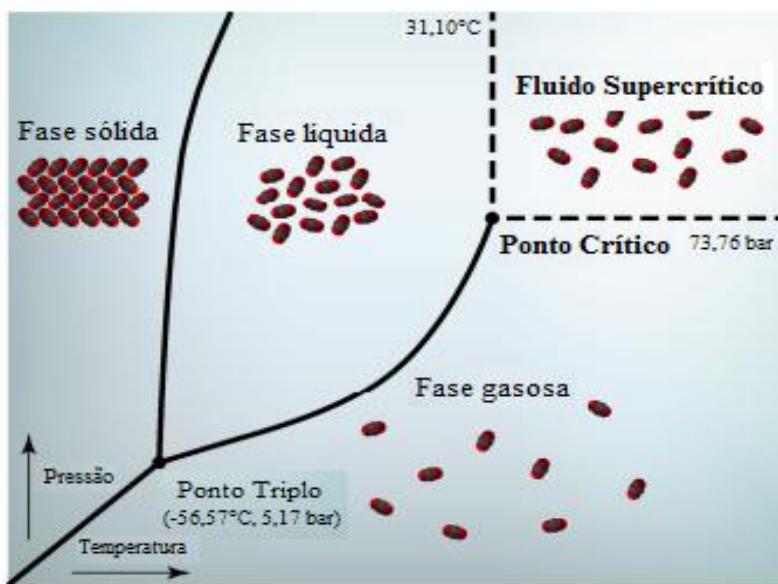


Figura 1. Diagrama de fases para o CO₂ puro em sistema fechado.

Fonte: (Adaptado de CAPUZZO et al., 2013).

Segundo Bartlett et al. (2014), as propriedades físico-químicas, temperatura, pressão, densidade, coeficiente de difusividade e viscosidade dos líquidos e gases combinam-se na fase supercrítica, tornando-os solventes desejáveis para inúmeros processos (Tabela 1). Forooghi e Hooman (2014) relataram que, em qualquer pressão supercrítica, não é possível distinguir o fluido líquido e vapor em equilíbrio, com uma gradual transição do fluido de alta densidade para um fluido de baixa densidade com um aumento na temperatura.

Tabela 1. Densidade, viscosidade e coeficiente de difusão de fluidos supercríticos, gases e líquidos.

Propriedade	Gás	Fluido Supercrítico	Líquido
Temperatura / K	298	T _c	298
Pressão / MPa	0,1	P _c	0,1
Densidade / g.cm ⁻³	0,6 – 2 x 10 ⁻³	0,2 – 0,5	0,6 – 2
Coeficiente de Difusão / cm ² .s ⁻¹	0,1 – 0,4	0,5 – 4 x 10 ⁻³	0,2 – 2 x 10 ⁻⁵
Viscosidade / MPa.s	0,01 – 0,03	0,01 – 0,03	0,2 – 20

Fonte: BARTLETT et al., 2014.

A densidade dos fluidos supercríticos é próxima a dos líquidos, o que lhes proporciona uma elevada capacidade de solubilização. A viscosidade e a tensão superficial são similares as dos gases e a difusividade apresenta um valor intermediário entre os gases e líquidos, permitindo uma penetração e difusão mais efetiva na matriz da qual se deseja extrair o soluto. As propriedades físicas podem ser facilmente ajustadas alterando-se a temperatura e a pressão (JOKIC et al., 2012a; SAHENA et al., 2009).

Em regiões próximas ao ponto crítico, com aumento da temperatura e da pressão do sistema, a densidade do solvente diminui. Acima do ponto crítico, um mínimo aumento da pressão do sistema leva ao aumento considerável da densidade do fluido (SIHVONEN et al., 1999). As regiões de alta densidade do solvente devem ser utilizadas em processos que visem à extração com alto valor de rendimento de extrato, com o intuito de obter a solubilização do maior número de compostos da mistura. Essa condição é alcançada em operação com altas pressões (BRUNNER, 1994; DUNFORD e ZHANG, 2003).

Muitos processos químicos e bioquímicos utilizando fluidos supercríticos têm sido avaliados por uma vasta gama de indústrias dos setores de agricultura, alimentação, cosméticos, farmacêuticas, tintas, têxteis, eletrônicos e semicondutores e tratamentos de resíduos. Segundo Bartlett et al. (2014), o uso de fluidos supercríticos apresenta-se como uma alternativa ao uso de solventes orgânicos convencionais em diversas aplicações, como, por exemplo, em processos de separação, extração, sorção, cromatografia e secagem. Quando aplicado em processo de extração, as propriedades de um fluido supercrítico são utilizadas para extrair seletivamente um composto específico ou para fracionar misturas alterando a temperatura e pressão sem qualquer mudança de fase.

Há um grande número de compostos já estudados em processos supercríticos, que podem ser usados como solvente em técnicas supercríticas. Porém, a maioria deles, devido à toxicidade, reatividade, possibilidade de explosão, dano ao meio ambiente, alto custo, condições supercríticas extremas e baixo grau de pureza não podem ser adotados como solvente (TEMELLI, 2009). A Tabela 2 mostra as propriedades críticas dos principais solventes utilizados em condições supercríticas.

Tabela 2. Propriedades críticas de vários solventes empregados na extração supercrítica.

Solvente	Temperatura Crítica (°C)	Pressão Crítica (bar)
Dióxido de carbono	31,10	73,76
Etano	32,30	48,84
Etileno	9,30	50,36
Propano	96,70	42,45
Propileno	91,90	46,20
Ciclohexano	280,30	40,73
Benzeno	289,00	48,94
Tolueno	318,60	41,14
Clorotrifluormetano	28,90	39,21
Acetona	235,00	47,00
Amônia	132,50	112,77
Água	374,20	220,48

Fonte: VELASCO et al., 2007.

Assim, o composto mais utilizado é o dióxido de carbono, pois trata-se de um solvente não inflamável, não poluente, não corrosivo, não tóxico e que não deixa resíduos. Além disso, o dióxido de carbono é incolor, inerte, uma substância de relativamente baixo custo, abundante quando comparada aos solventes orgânicos clássicos e que apresenta temperatura crítica (31,10 °C) e pressão crítica (73,76 bar) moderadas (JOKIC et al., 2012b; JOKIC et al., 2011). Além disso, a baixa temperatura crítica do CO₂ permite a extração de compostos sensíveis à temperatura sem degradação (BOZAN e TEMELLI, 2002). Apesar de suas vantagens, o dióxido de carbono não é um bom solvente para compostos de alta volatilidade.

De acordo com Rosa et al. (2009), a molécula do dióxido de carbono possui momento dipolo igual a zero, portanto é uma substância apolar. Apresenta semelhança de polaridade a de outros solventes apolares que são utilizados comumente em processos de extração sólido-líquido. A solubilidade do soluto no CO₂ supercrítico está relacionada à polaridade, peso molecular e presença de grupos funcionais. Assim, compostos orgânicos apolares, ou pouco polares de baixo peso molecular, apresentam alta solubilidade em dióxido de carbono. Os compostos polares e de maior peso molecular, são moderadamente solúveis, enquanto os altamente polares e de maior peso molecular, são dificilmente solúveis no CO₂ puro supercrítico (TAYLOR, 1996). Nestes casos, a solubilidade pode ser aumentada pela adição de co-solventes líquidos a baixas concentrações. A utilização de co-solventes pode modificar as

propriedades da mistura e as interações entre o soluto e a matriz sólida, melhorando o transporte de solutos a partir dos poros à sua superfície (MEIRELES, 2009b). Além de reduzir as limitações do poder de solvatação do CO₂, os co-solventes possibilitam o controle da seletividade do processo de extração, proporcionando o uso de pressões mais amenas (BRUNNER, 2005). De acordo com Azevedo et al. (2008), os co-solventes mais utilizados são o metanol, etanol e água, pois estes fazem ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo com a molécula do soluto que possuem grupos polares.

Os benefícios do aumento da solubilidade com adição de co-solventes devem ser balanceados em relação ao efeito negativo da complicaçāo do processo. A adição do modificador de mistura será eficiente se a seletividade puder ser melhorada, já que a solubilidade de todos os constituintes da mistura é aumentada em virtude dos efeitos da densidade (TEMELLI, 2009).

2.1.2 Extração supercrítica

A primeira unidade industrial para extração de uma matriz vegetal com fluido supercrítico foi instalada na Alemanha no final da década de 70, com o processo de descafeinação dos grãos de café e chá (MOORE et al. 1994). Este processo destaca-se devido à utilização de tecnologia limpa, sem resíduos, uso de solventes não tóxicos, extração de produtos de alta qualidade e sem alteração das propriedades originais da matéria-prima. As principais aplicações dos fluidos supercríticos ocorrem na extração supercrítica de extratos vegetais e produtos naturais. Na literatura, a maioria dos trabalhos referem-se à extração de metabólitos secundários como compostos fenólicos, alcaloides e óleos essenciais. Já para os metabólitos primários, carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, a técnica aplica-se para lipídios, pois os polissacarídeos são moléculas polares e de alto peso molecular.

Grandes unidades de descafeinação de café e extração de lúpulo foram instaladas nos Estados Unidos, frente à supremacia alemā nos processos de extração e fracionamento em condições supercríticas, enquanto diversas unidades de capacidade média foram construídas na França e Itália, sobretudo para a extração supercrítica e fracionamento de insumos alimentícios e princípios ativos para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos (PERRUT, 2000).

O método de extração com fluido supercrítico apresenta vantagens e é ambientalmente amigável em relação a outros métodos de extração utilizando solvente convencional. A tecnologia de extração e fracionamento dos produtos em condições supercríticas é promissora

para as indústrias alimentícias e farmacêuticas (SAHENNA et al., 2009). A Tabela 3 mostra as vantagens e desvantagens da extração supercrítica (ESC).

Tabela 3. Vantagens e desvantagens da extração supercrítica.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Os extratos não são alterados termicamente, não sofrem oxidação, hidrólise, esterificação, caramelização, ou seja, o extrato permanece no seu estado original (BOZAN e TEMELLI, 2002); • Os solventes utilizados na extração normalmente são gasosos à temperatura e pressão ambiente, portanto, o extrato e o solvente são facilmente recuperados (SETIANTO et al., 2009); • Através do ajuste da pressão e/ou temperatura e adição de modificadores de propriedades da mistura (o co-solvente), o poder de solvatação dos gases comprimidos podem sofrer grandes alterações. Com a introdução dos agentes que alteram a polaridade, podem ser realizadas extrações multifásicas e fracionamento do extrato (BRUNNER, 2005; JOKIC et al., 2012a). • Os solventes podem ser reutilizados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Como a extração supercrítica é realizada comumente com o solvente CO₂, dificilmente os componentes muito polares são carreados na ausência de co-solventes (MEIRELES, 2009b); • Os extratos obtidos apresentam características diferentes quando comparados com àquela via extração convencional (SAHENNA et al., 2009); • Método que exige alto investimento inicial, por operar com pressões elevadas; • Não há um modelo matemático geral que representa a extração de produtos naturais, uma vez que cada matriz vegetal comporta-se de uma forma particular perante aos parâmetros utilizados (SOVOVÁ, 1994).

A indústria de alimentos está sempre procurando por tecnologias de separação para obter compostos naturais de alta pureza e rendimento, produtos saudáveis que são de excelente

qualidade. O elevado custo dos solventes orgânicos, os regulamentos ambientais cada vez mais rigorosos, novas exigências das indústrias de medicamentos e alimentos e o elevado valor agregado dos produtos têm aumentado a necessidade do desenvolvimento de tecnologias novas e limpas para a transformação de produtos. A extração com dióxido de carbono supercrítico atraiu consideravelmente a atenção nos últimos anos como uma alternativa promissora em comparação aos métodos de extração convencionais, como: extração com solvente orgânico, destilação por arraste de vapor e prensagem mecânica para extração de óleos e outros materiais. Isto ocorre, pois ela oferece numerosas vantagens, incluindo a ausência de resíduos de solvente, uma melhor retenção de compostos aromáticos e por não promover a degradação térmica de compostos termolábeis (SAHENA et al., 2009).

A principal desvantagem da tecnologia supercrítica refere-se aos elevados custos de investimento e, portanto, os preços dos produtos obtidos podem ser relativamente elevados em comparação com os obtidos por métodos convencionais (FIORI et al., 2014). Desta maneira, mesmo que a ESC (extração supercrítica) esteja principalmente relacionada a produtos de alta qualidade, deve estar restrita a produtos de alto valor agregado. Sovová et al. (1994) afirmaram que mesmo que os equipamentos utilizados em alta pressão apresentem custos onerosos, o custo de operação total é usualmente inferior aos processos de separação convencional e os custos totais são comparáveis se os processos são realizados em condições ótimas e o volume do extrator for suficientemente adequado.

2.1.3 Mecanismos da extração supercrítica

A extração supercrítica de componentes de uma matriz sólida é um processo que ocorre com o contato contínuo do soluto com o fluido supercrítico. Geralmente, o substrato forma um leito fixo, onde o fluido escoa e extraí os componentes que possuem afinidade química. O processo é caracterizado como transiente. Os componentes são transportados da fase sólida para a fase supercrítica (CARDOZO-FILHO et al., 1997). A Figura 2 (A) representa a curva típica de extração com as variáveis concentração e tempo. A curva de extração para o isolamento de substâncias sólidas do material vegetal é geralmente dividida em um período de queda da taxa de extração. A transferência de massa controlada pela solubilidade prevalece no período inicial do processo, período com predominância do mecanismo convectivo, ao passo a transferência de massa é controlada pela difusão. A difusão e a hidrodinâmica influenciam a taxa de transferência de massa (MEIRELES, 2009a). A forma da curva está relacionada com

os mecanismos da cinética de extração do sólido e da solubilização do solvente, que estão associados com os parâmetros de operação (BRUNNER, 1994). A Figura 2 (B) representa a curva de extração supercrítica caracterizada por três etapas: a primeira é a etapa de taxa constante de extração (CER – *Constant Extraction Rate*), a transferência ocorre devido à convecção na fase fluida; a segunda é a etapa de taxa decrescente de extração (FER – *Fall Extraction Rate*), parte em que a velocidade de extração é determinada pelos efeitos convectivos na fase fluida e difusionais na fase sólida; a terceira é a etapa de taxa de extração difusiva no sólido.

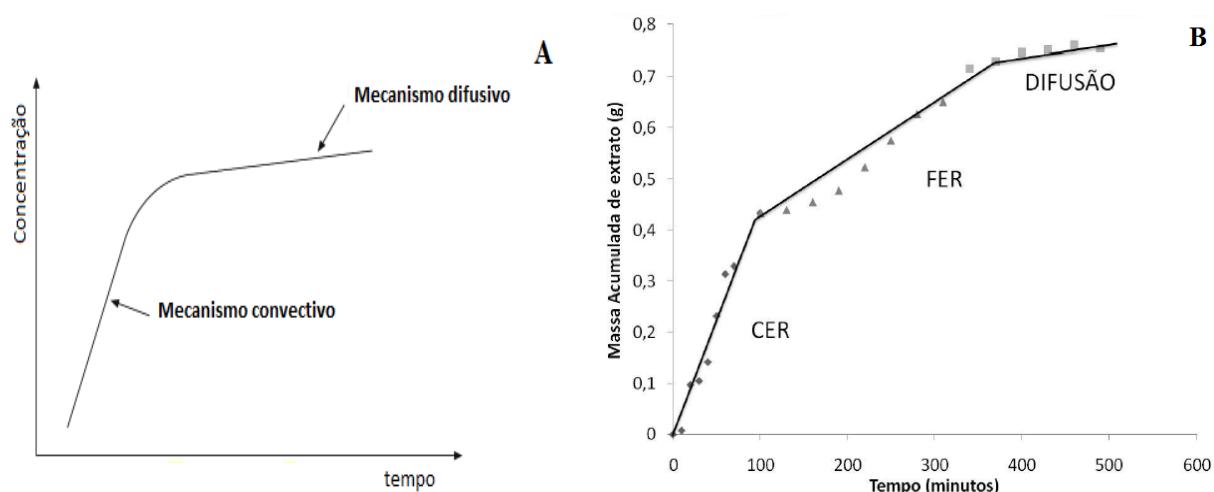


Figura 2. Curvas típica de extração - mecanismos de transferência de massa.

Fonte: Adaptada de MEIRELES, 2009a (A); Adaptada de SILVA, 2004 (B).

De acordo com Mohamed (1997), a extração e o fracionamento de produtos com fluidos supercríticos podem ser realizados em duas maneiras de operação: extração seletiva e/ou separação seletiva. A primeira envolve a manipulação das condições termodinâmicas de temperatura e pressão e/ou a modificação da natureza química do solvente na capacidade de solvatação do fluido utilizado na extração. Na segunda maneira de operação, permite-se um fracionamento controlado dos produtos a serem extraídos por meio da despressurização ou do aquecimento ou resfriamento graduais do extrato. A separação seletiva pode ser obtida também pelo acoplamento do processo de extração a outro processo de separação como, por exemplo, adsorção.

A solubilidade de um soluto no fluido supercrítico pode ser interpretada como a concentração máxima de extrato presente na fase solvente, em equilíbrio com a concentração do extrato presente na fase sólida (MCHUNG e KRUKNIS, 1986). Em pressões baixas e

moderadas, a solubilidade está associada à pressão de vapor do soluto e à pressão total do sistema, de tal forma que a curva (Figura 3) tende chegar a um mínimo com o aumento da pressão. Assim ocorre um grande aumento na solubilidade em virtude de grandes alterações na densidade na fase gasosa com pequeno aumento da pressão. Porém, a máxima solubilidade dá-se com altas densidades, a partir do momento em que as forças de repulsão entre o solvente e o soluto ocasionarão respostas importantes.

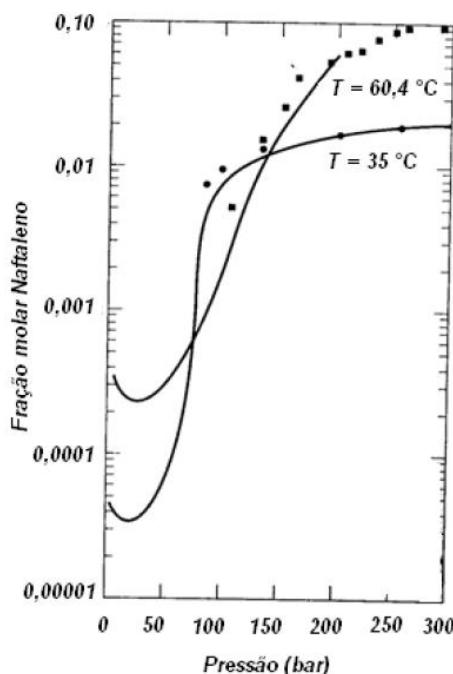


Figura 3. Solubilidade do naftaleno em CO₂ supercrítico em função da pressão.

Fonte: (Adaptado de SANDLER, 1994).

Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007) afirmaram que o efeito da temperatura sobre a solubilidade é complexo devido à combinação dos parâmetros densidade e pressão de vapor do soluto. Com o aumento da temperatura, tem-se o aumento da pressão de vapor, elevando assim a solubilidade. Mas ao diminuir o valor da densidade do fluido, a solubilidade do soluto é diminuída. O efeito dominante dependerá da contribuição do efeito para cada sistema.

McHung e Krukonis (1986) afirmaram que em uma isoterma de solubilidade percebe-se que a densidade do solvente aumenta com o aumento da pressão do sistema. Porém, na isóbara, observa-se que a densidade do fluido diminui e a pressão de vapor do soluto aumenta, com o aumento da temperatura. Os efeitos contrários da densidade do solvente e pressão de vapor do soluto causam uma inversão da curva da solubilidade, fenômeno denominado como solubilidade retrógrada ou condensação retrógrada. Com o aumento da temperatura do sistema

e com o consequente aumento da pressão de vapor do soluto, esta pode exercer maior influência na solubilidade global do soluto, compensando ou não o efeito de diminuição da densidade do solvente (JOCHMANN, 2000).

Portanto, a pressão em ESC é o parâmetro operacional mais importante, como já foi dito, que pode alterar na eluição do fluido. A Figura 4 apresenta o diagrama de densidade em função da pressão. Observa-se que a área sombreada corresponde ao domínio experimental de extração supercrítica e nesta região, a densidade não varia linearmente com a pressão.

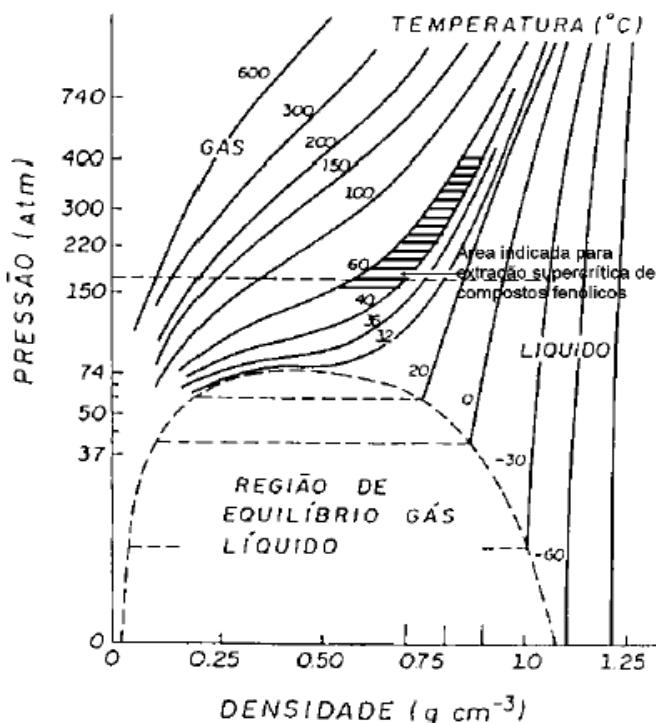


Figura 4. Diagrama de pressão versus densidade do dióxido de carbono.

Fonte: CARDOZO-FILHO, 1999.

Assim, é de suma importância recorrer às correlações e modelos de previsão de solubilidade de soluto no CO₂ supercrítico. Equações distintas foram desenvolvidas, como as equações teóricas de estado e equações de correlação semi-empíricas, para modelagem matemática de dados de solubilidade em CO₂ supercrítico. Os modelos de equações de estado, como Peng-Robinson com a regra de mistura de Van der Waals, são ferramentas úteis para a correlação dos dados experimentais e previsão do equilíbrio de fases, principalmente na descrição do equilíbrio líquido-vapor de misturas complexas com CO₂ supercrítico (SETIANTO et al., 2009).

2.1.4 Aplicações da extração supercrítica

Há várias aplicações da extração utilizando fluido pressurizado, dentre elas pode-se mencionar:

- Extração de sólidos e líquidos usando gases densos: vários compostos naturais de matrizes vegetais, como os flavonóides, sesquiterpênicos, tocoferóis, diterpenóides, triterpenóides (Figura 5), aromas naturais, pigmentos, óleos essenciais e vitaminas, são bastante solúveis em fluidos supercríticos. Assim, a extração de produtos nutracêuticos, antioxidantes ou alimentos aditivos, que são produtos de alto valor agregado obtidos a partir de materiais naturais, é uma das aplicações mais estudadas com fluidos supercríticos;
- A extração de constituintes de lúpulo e de descafeinação de chá e café por CO₂ supercrítico já é realizada em escala industrial (CAPUZZO et al., 2013);
- Extração de metais pesados tóxicos (GHOREISHI et al., 2012);
- Remoção de compostos poluentes de águas residuárias;
- Recuperação de solo pela extração de pesticidas e outros compostos tóxicos (MOHAMED, 1997).

Yen et al. (2015) estudaram a extração de compostos de elevado valor agregado da biomassa de microalgas utilizando fluido supercrítico. A aplicação de extração em condições supercríticas sobre a recuperação destes compostos a partir da biomassa de microalgas apresenta várias vantagens em comparação com os métodos convencionais de extração com solvente orgânico, especialmente em relação ao meio ambiente. Os autores apresentaram informações sobre o uso de extração em condições supercríticas para recuperação de componentes de alto valor agregado a partir de biomassa de microalgas, como lipídios totais, ácidos graxos de cadeia longa e pigmentos, bem como a utilização e características da tecnologia supercrítica.

No setor de energia, os fluidos supercríticos têm sido utilizados na recuperação suplementar de petróleo com a injeção do gás carbônico e extração de hidrocarbonetos líquidos de carvão e xisto. Na preservação e recuperação do meio ambiente, cita-se o uso de solventes não-ofensivos ao meio ambiente e a ausência de resíduos tóxicos nos produtos extraídos. Além disso, há o uso potencial de fluidos supercríticos no tratamento de esgotos pela oxidação com água supercrítica e a recuperação de solo pela extração de pesticidas e outros compostos tóxicos. Fluidos supercríticos têm sido aplicados amplamente na

recuperação do material biológico com a precipitação anti-solvente e solubilização em micelas reversas. Há também, de modo geral, a utilização de fluidos supercríticos na extração de princípios ativos de produtos naturais como, por exemplo, alcalóides, óleos, resinas, entre muitos outros (MOHAMED, 1997).

Perrut (2000) afirma que, nas últimas duas décadas, as aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas têm sido direcionadas para a extração e fracionamento de produtos naturais. Com relação à extração em condições supercríticas de produtos naturais estima-se que haja aproximadamente cem unidades industriais em operação atualmente, com um crescimento de 10% ao ano.

No Brasil existem, atualmente, inúmeras pesquisas sendo desenvolvidas utilizando fluidos supercríticos, principalmente a extração em condições supercríticas de matrizes vegetais com o solvente CO₂.

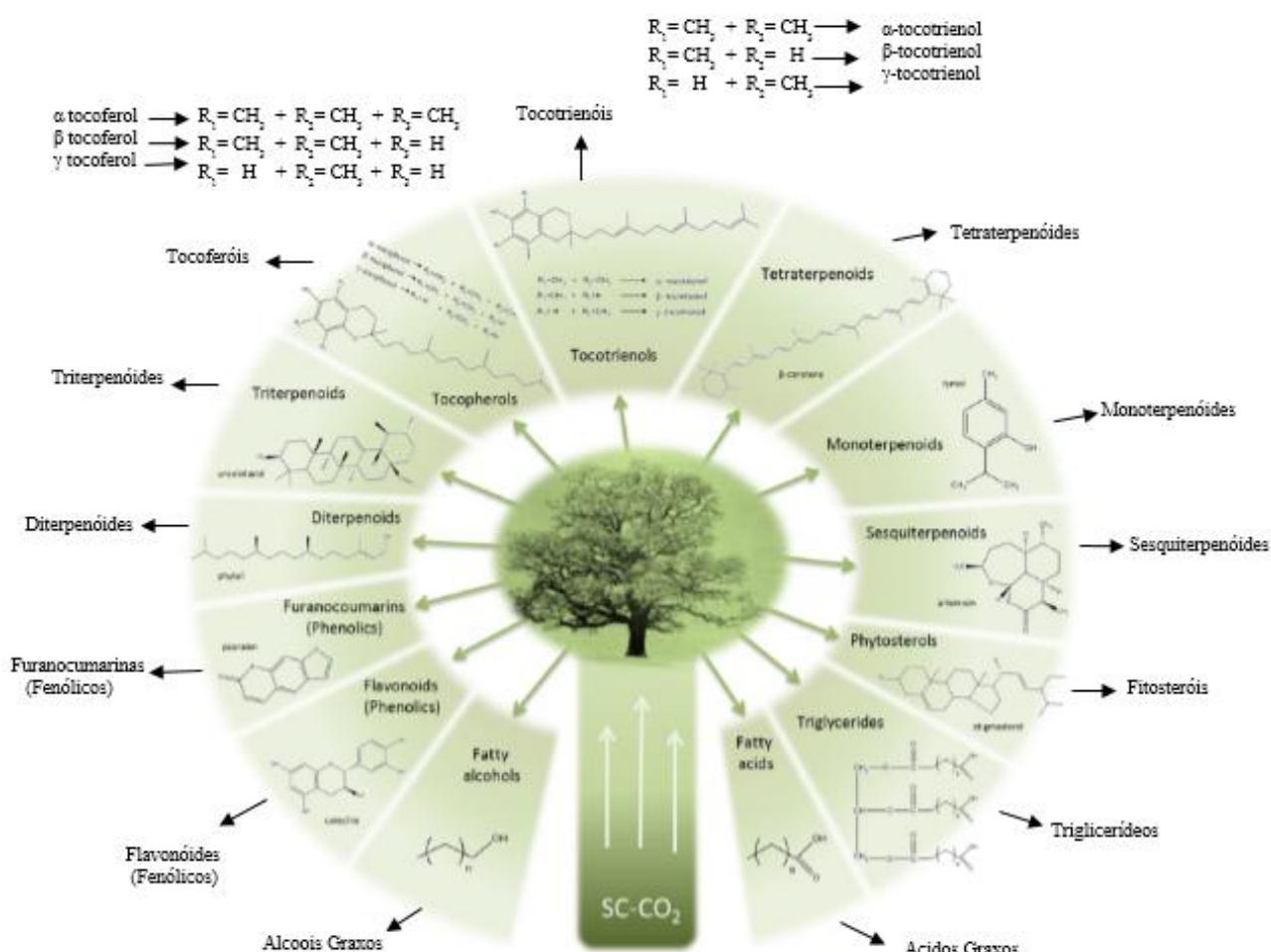


Figura 5. Principais famílias de compostos encontrados nos extratos obtidos por extração em condições supercríticas de biomassa vegetal.

Fonte: Adaptada de MELO et al., 2014.

2.1.5 Estudos recentes sobre a extração supercrítica

Uribe et al. (2011) estudaram a extração de óleo de semente de chia (*Salvia hispânica*, L.) com CO₂ em condições supercríticas. O óleo de sementes de chia é rico em ácidos poliinsaturados, especialmente ω -3 ácido linolênico (54-67%) e ω -6 ácido linoléico (12-21%), compostos benéficos para a saúde humana e animal. O trabalho avaliou o rendimento total da extração e a concentração de ácidos ω -3 e ω -6, nas pressões de 136, 272 e 408 bar e nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C. O melhor rendimento (7,18%) foi obtido nas condições de 408 bar e 80 °C e observou-se que o efeito da pressão é mais significativo no rendimento da extração frente ao efeito da temperatura. Os rendimentos dos compostos de interesse, ω -3 e ω -6, não diminuíram com o aumento da temperatura e pressão nos intervalos testados.

Herzi et al. (2013) investigaram a composição química, atividade antioxidante e a modelagem matemática da extração com CO₂ supercrítico de *Tetraclinis articulata*. Foram analisados diferentes valores de pressão (90, 280 e 1000 bar), a influência da temperatura, fluxo do fluido, o processo estático e dinâmico da extração e o tamanho da partícula na obtenção de frações voláteis e não voláteis. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa FID/MS e a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos ABTS (2, 2'-azino-bis (3-etylbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) e DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilidrazila). Foram realizadas extrações por hidrodestilação para fins de comparação com o método em condições supercríticas. Concluiu-se que os compostos fenólicos presentes foram encontrados em maior quantidade no sistema em altas pressões (280 e 1000 bar) do que na extração convencional por hidrodestilação. Uma alta atividade antioxidante foi observada na extração em condições supercríticas a altas pressões. No processo a baixa pressão, a atividade antioxidante mostrou-se significativa, apesar de apresentar baixo teor de compostos fenólicos. No óleo essencial obtido por hidrodestilação, além do baixo teor de fenólicos apresentados, a atividade antioxidante também foi baixa. Ao avaliar a cinética, em conjunto com a modelagem da extração, notou-se que o processo de extração foi limitado pelo equilíbrio termodinâmico de solutos acessíveis, onde a dispersão axial foi significativa.

No trabalho de Silva et al. (2014) a extração de óleo essencial de *Cyperus articulatus* L. var. *articulatus* (priprioca) com CO₂ pressurizado foi baseado no diagrama de fases. O estudo avaliou a cinética de extração e atividade microbiana de extratos da planta. Os parâmetros estudados foram: temperatura (313, 323, e 333 K) e pressão (13 e 25 MPa). Os componentes dos extratos foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada a

espectrometria de massas. A condição 333 K e 13 MPa mostrou-se eficaz na extração dos compostos, que apresentaram atividade antifúngica (*Cladosporium sphaerospermum ATCC 4464*) e a 323 ou 333 K e 25 MPa, os extratos obtidos apresentaram atividade antibacteriana (*Staphylococcus aureus ATCC25923*). Um modelo matemático foi proposto a partir dos mecanismos de transferência de massas.

Lin et al. (2015) estudaram a extração de lignanas proveniente da semente de *Schisandra chinensis* com fluido supercrítico e subsequente separação em leito móvel simulado utilizando fluido supercrítico. Este estudo desenvolveu um processo para extrair e separar as lignanas de *Schisandra chinensis* utilizando dióxido de carbono supercrítico, etanol e 2-propanol como solventes auxiliares. As lignanas em óleo de semente de *Schisandra chinensis* foram separadas com sucesso. Este estudo demonstra que a extração e separação dos ingredientes bioativos a partir de ervas podem ser executadas com a tecnologia supercrítica.

Duba e Fiori (2015) investigaram o efeito dos parâmetros do processo sobre a cinética de extração do óleo de semente de uva com CO₂ supercrítico. O efeito das principais variáveis de processo que afetaram a extração de CO₂ supercrítico de óleo de semente de uva foi investigada, tanto experimentalmente quanto através da modelagem. A taxa de extração aumentou com o aumento da pressão, temperatura e taxa de fluxo de solvente, embora haja também o aumento do consumo específico de CO₂. O tamanho de partícula influenciou no rendimento final da extração.

Garmus et al. (2015) analisaram a extração de compostos fenólicos das folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides Cham.*) por extração sequencial em extrator de leito fixo usando CO₂ supercrítico (SC), etanol (SE) e água (SA) como solventes. O estudo comparativo entre a extração em vários estágios e a extração em uma etapa mostraram que a combinação de processos é um método eficaz para a obtenção de compostos de interesse. O efeito da pressão mostrou-se significativo, a nível de 5% de significância, sobre os compostos fenólicos e conteúdos de flavonóides para ambos os extratos etanólicos e aquosos. O etanol tem maior afinidade química para os compostos de interesse, por apresentar polaridade intermediária. A extração sequencial permite a extração de diferentes famílias de compostos fenólicos, pois além da solubilidade dos compostos variar de acordo com a polaridade do solvente, as suas interações com outros constituintes da planta podem influenciar o processo de extração. O rendimento global acumulado (%) nas três etapas de extração sequencial (SC + SE + SA) foi de 43%, que foi significativamente mais elevado do que os rendimentos obtidos na extração de uma etapa (convencional e leito fixo) utilizando etanol ou água. Os resultados mostraram que

a combinação de processos de extração é um método eficaz para obter extratos com diferentes composições e funcionalidades. No geral, a extração etanólica em leito fixo e a extração sequencial mostrou os melhores resultados em termos de rendimento global, teor e rendimento de fenólicos totais e flavonóides. Os extratos etanólicos exibiram a melhor atividade antioxidante.

2.2 *Vernonia amygdalina Delile*

Asteraceae é a maior família de angiospermas, também denominada Compositae, é representada por cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies concentradas nas regiões temperadas, tropicais e subtropicais no mundo. No Brasil há espécies herbáceas, arbustivas ou subarbustivas e raramente arbóreas, representada aproximadamente por 180 gêneros e 1.900 espécies. Nos últimos anos, esta família vem sendo profundamente estudada quanto à morfologia, anatomia, ontogenia, citogenética, ecologia e fitoquímica e estrutura macromolecular. Os óleos essenciais de várias plantas possuem grande importância comercial na Europa e Estados Unidos, principalmente, nas indústrias de licores e perfumes especialmente (COSTA et al., 2008).

O gênero *Vernonia*, um dos mais representados da família Asteraceae, abrange uma grande diversidade de espécies distribuídas no mundo inteiro. É representado por cerca de 1.000 espécies propagadas nas zonas tropicais e subtropicais, especialmente na África e América do Sul. As espécies deste gênero estão associadas ao tratamento de diversas enfermidades, salientando-se o uso para o tratamento da malária, doenças respiratórias e distúrbios gastrointestinais. Estudos fitoquímicos envolvendo plantas do gênero relatam a ocorrência de classes distintas de metabólitos secundários. Os principais constituintes são lactonas sesquiterpênicas, flavonóides, triterpenos, esteróides, lignóides e carotenóides, além de alcalóides e taninos. As classes de compostos das lactonas sesquiterpênicas, principalmente, e flavonóides são consideradas marcadores quimiotaxonômicos do gênero (ZANON et al., 2008; TOYANG e VERPOORTE, 2013).

A espécie *Vernonia amygdalina Delile* (V.A), representada na Figura 6, é nativa da África, trazida para o Brasil na época colonial pelos escravos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). As folhas e os galhos apresentam um gosto amargo quando mastigados, por isso conhecida como “folha amarga africana” (ATANGWHO et al., 2013; MASABA, 2000; AWE et al., 1999). Em diversas regiões do Brasil há várias sinônimas populares como boldo, boldo-bahiano, boldo-goiano, alumã, figatil, heparém e árvore-do-pinguço. Segundo Adesanoye et

al. (2013), a espécie *Vernonia amygdalina Delile* é um arbusto ou pequena árvore que está entre 1 e 5 m de altura, ramificado, possui flores discretas, de coloração esbranquiçadas.



Figura 6. *Vernonia amygdalina Delile*

Fonte: TOYANG e VERPOORTE, 2013.

Avaliações fitoquímicas revelaram teores elevados de vitaminas antioxidantes (A, C, E e riboflavina), elementos minerais (Fe, Se, Zn, Cu, Cr e Mn) e fitocompostos em diversas partes da planta *Vernonia amygdalina Delile*, especialmente nas folhas (ATANGWHO et al., 2013). Os fitocompostos presentes nas folhas são as saponinas do tipo vernaliosides A1, A2, A3, A4, B2, B3, C, D e E; saponinas esteróides; lactonas sesquiterpênicas, classe abundantemente encontrada, vernolide, vernodalol, vernolepin, vernodalin, hidroxiverrolide (ERASTO et al., 2006); flavonóides, luteolina, luteolina 7-O- β -glucoroniside e luteolina 7-O- β -glucósido (KOSHIMIZU et al., 1994), apigenina; e outros presentes como os terpenos, cumarinas, ácidos fenólicos, lignanas, xantonas e antraquinonas (AWE et al., 1999; NTIE-KANG et al., 2014; ADEDAPO et al., 2014).

De acordo com Toyang e Verpoorte (2013), a espécie *Vernonia amygdalina Delile* está associada ao tratamento e ao controle de mais de vinte doenças e como paliativo na medicina popular. Além de ser utilizada na medicina humana está associada também à medicina

veterinária e zoofarmacognósia¹. Considerando as doenças que são rotineiramente tratadas com *Vernonia amygdalina*, pode-se verificar a utilização das folhas contra doenças do trato gastrintestinal, tais como diarréia, constipação, dor de estômago, vermes intestinais e infecções bacterianas. Extensos estudos farmacológicos têm indicado o uso do extrato da planta para o tratamento de diabetes (MICHAEL et al., 2010; ATANGWHO et al., 2013), infecções do trato urinário (AWE et al., 1999), malária (NTIE-KANG et al., 2014; STANGELAND et al., 2011; KOSHIMIZU et al., 1994), tumores (NGATU et al., 2012), hipertensão (SALIU et al., 2011) atuando também como anti-inflamatório (ADEDAPO et al., 2014; NGATU et al., 2012). Na medicina veterinária, a planta é principalmente usada contra infecções parasitárias, especialmente aquelas do trato gastrointestinal, sendo que chimpanzés e gorilas, na África Central, utilizam a planta para automedicação contra parasitas (ADESANOYE et al., 2013).

Igile et al. (1994) observaram a presença de flavonóides nos extratos obtidos por maceração das folhas de *Vernonia amygdalina Delile* em metanol 30% (v.v) e identificaram, a partir de análises químicas e espectrofotométricas, a presença das flavonas luteolina, luteolina 7-O-β-glucuronide e luteolina 7-O-β-glicosídeo. A atividade oxidante foi mensurada através da oxidação conjugada de β-caroteno e ácido linoléico e o estudo mostrou que a luteolina é um antioxidante mais potente que o hidroxitolueno butilado (BHT).

Erasto et al. (2006) realizaram a análise fitoquímica das folhas de *Vernonia amygdalina Delile* e identificaram dois compostos bioativos de lactonas sesquiterpênicas: vernolide e vernodalol. Os autores verificaram nos testes microbiológicos que ambos os compostos exibiram atividade antibacteriana significativa para cinco bactérias gram-positivas, enquanto para as gram-negativas mostraram-se ineficientes. Nas análises antifúngicas, o composto vernolide exibiu alta atividade contra *Penicillium notatum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Mucor hiemalis*, enquanto que o vernodalol mostrou inibições moderadas contra o *Aspergillus flavus*, o *Penicillium notatum* e o *Aspergillus niger*. Os resultados antimicrobianos corresponderam positivamente com os usos medicinais das folhas de *Vernonia amygdalina Delile* no tratamento de doenças infecciosas.

Erasto et al. (2007) examinaram a atividade antioxidante e o teor de ácidos graxos das folhas de *Vernonia amygdalina Delile*. As folhas foram mantidas em agitação por 8 h em hexano/isopropanol (3:1). Foram identificados 12 ácidos graxos. Destes, dois ácidos graxos essenciais, linoléico e ácido α-linolênico foram encontrados em abundância no óleo. Os autores avaliaram a atividade antioxidante pelos métodos DPPH[•] e ABST de extratos obtidos

¹ Zoofarmacognósia: técnica que consiste no estudo comportamental de animais, no exame de seus métodos inatos, empregados para se defenderem naturalmente de agressores patogênicos.

com os solventes acetona, água e metanol. Os extratos de metanol exibiram alta atividade, por eliminação de 75-99,3% dos radicais DPPH e 96,2-100% dos radicais ABTS. Estes valores são maiores do que os do BHT (antioxidante sintético). O extrato aquoso foi o menos ativo. A presença de ácidos graxos essenciais nas folhas de *Vernonia amygdalina Delile* demonstrou importância na dieta humana.

Ademola e Eloff (2011) avaliaram *in vitro* a atividade antihelmíntico do extrato de *Vernonia amygdalina* obtido com o solvente orgânico acetona e frações solvete-solvete da mesma contra ovos e larvas do parasita *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. Os potenciais efeitos antiparasíticos, que inibem a eclosão dos ovos e desenvolvimento das larvas de *Haemonchus contortus* com o extrato e frações de *Vernonia amygdalina* foram observados. O estudo concluiu que há evidências de sinergismo entre as ações dos metabólitos secundários envolvidos na atividade antihelmíntica, porque todas as frações demonstraram diferentes níveis de atividade antihelmíntica. No entanto, o nível de atividade é três ordens de grandeza menor do que a atividade do albendazol (antihelmíntico químico). Assim, é de suma importância estudos experimentais de toxicologia e terapêuticos *in vivo* e *in vitro*.

Atangwho et al. (2013) estudaram as propriedades antioxidantes e anti-diabéticas dos extratos de *Vernonia amygdalina Delile* que mostraram-se mais efetivos, com base na composição química do potencial medicinal. Os extratos foram obtidos a partir da maceração das folhas secas da planta com éter de petróleo, clorofórmio, metanol e água. O extrato obtido com o uso de clorofórmio apresentou melhor resposta no teste de tolerância à glicose oral em ratos diabéticos. O estudo comprovou o efeito benéfico da *Vernonia amygdalina Delile* na nutrição humana e seu potencial frente a diabetes. A ação anti-diabética não necessariamente está relacionada diretamente com os fitoquímicos antioxidantes, mas sim ao produto de sinergismos entre as moléculas, que envolvem cadeias longas de ácidos graxos poliinsaturados.

Adedapo et al. (2014) avaliaram as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e propriedades antinociceptivas¹ e analgésicas do extrato das folhas de *Vernonia amygdalina Del.* obtido com o uso de acetona em animais de laboratório. As atividades antioxidantes foram avaliadas *in vitro* a partir dos seguintes métodos: radical ABTS, DPPH•, determinação de fenólicos totais e redução férrica. As atividades anti-inflamatórias foram conduzidas utilizando compostos para indução de edema em ratos, enquanto que as atividades analgésicas foram verificadas usando teste de contorção com ácido acético induzido e teste com formalina.

¹ Antinociceptivas: redução na capacidade de percepção a dor.

Concluiu-se que o extrato obtido a partir do uso de acetona apresentou propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antinociceptiva, o que justifica o uso da *Vernonia amygdalina Delile* como agente nutricional e medicinal.

2.2.1 Efeitos medicinais de alguns constituintes da planta *Vernonia amygdalina Delile*

2.2.1.1 Fitol

O fitol é um diterpeno, membro de álcoois insaturados de cadeia ramificada cujos elementos estruturais característicos comuns são um grupo hidroxila por molécula e uma ligação dupla de vinte átomos de carbono ($C_{20}H_{40}O$), como mostra na Figura 7. Este composto é particularmente interessante, pois se trata de um componente da molécula de clorofila, presente nas folhas verdes de várias plantas medicinais, portanto, está presente na natureza em abundância (COSTA et al., 2014). O fitol pode ser liberado da molécula de clorofila por ação enzimática ou através de processamento dos vegetais. O fitol na forma livre, quando ingerido, pode ser convertido em ácido fitânico que possui importantes efeitos biológicos, tais como atividade termogênica em mamíferos e atividade inibidora sobre efeitos teratogênicos do retinol (SCHLUTER et al., 2002).

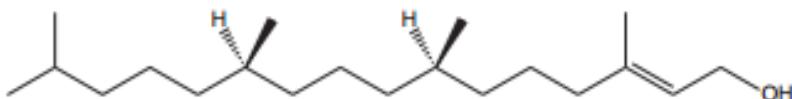


Figura 7. Estrutura química do fitol

2.2.1.2 Ácido hexadecanóico

O ácido hexadecanóico ou ácido palmítico (ácido graxo saturado) é um agente antimicrobiano potencialmente poderoso principalmente em cepas gram-positivas como: *Staphylococcus aureus* ATCC No. 25923, *Escherichia coli* ATCC No. 44102 e *Salmonella sp.* ATCC No. 50041 *in vitro*. Este composto fitoquímico caracteriza-se também pelos efeitos antioxidante, hipコレsterolêmico, anti-inflamatório, antimicrobiano, nematicida, hemolítico (SELVAMANGAI e BHASKAR, 2012). O ácido palmítico é importante fonte de energia na alimentação infantil, pois o leite materno contém de 20 a 30% desse ácido graxo. No entanto, em adultos, ácidos graxos saturados têm sido associados com o aumento do risco de doenças

cardiovasculares (MORAIS e COSTA, 2008). Sua estrutura química está apresentada na Figura 8, abaixo.

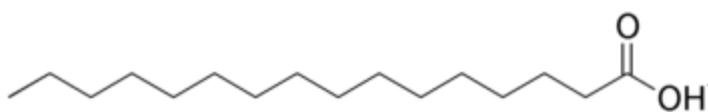


Figura 8. Estrutura química do ácido hexadecanóico

2.2.1.3 Ácido 9,12-octadecadienóico

O ácido 9,12-octadecadienóico ou linoléico (estrutura química Figura 9) pertence à família ω -6. A família ω -6 produz eicosanóides inflamatórios e cancerígenos, aumentando o risco de: câncer, morte súbita, doenças cardíacas, vasoconstrição, aumento da pressão arterial, elevação da taxa de triglicerídeos, artrite, depressão entre outras doenças inflamatórias (BORGES et al., 2014).



Figura 9. Estrutura química do ácido 9,12-octadecadienóico

2.2.1.4 Ácido α -linolênico

O ácido α -linolênico pertence à família ω -3, sua estrutura química está representada na Figura 10. Os ácidos graxos ω -3 (poli-insaturados) são anti-inflamatórios, antitrombóticos, antiarrítmicos e reduzem os lipídios do sangue, tendo propriedades vasodilatadoras. Esses efeitos benéficos foram demonstrados na prevenção de doenças cardíacas, de hipertensão, de diabetes tipo 2, de artrite reumatóide entre outras. De acordo com vários estudos, as doenças degenerativas como diabetes, artrite e o câncer, estão relacionadas à desproporção atual da concentração dos ácidos ω -6 (como o ácido linoléico) e ω -3 que constituem nossa alimentação, ou seja, uma grande concentração de ω -6 e uma escassez de ω -3 (BORGES et al., 2014).



Figura 10. Estrutura química do ácido α -linolênico

2.3 ESTADO DA ARTE

A revisão bibliográfica mostrou que existem poucos trabalhos que relatam a extração de compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* a partir de técnicas convencionais e nenhum trabalho que utilize o método da extração supercrítica. Devido ao potencial farmacológico dos compostos bioativos presentes na espécie, já foram reportados estudos que realizaram a extração com solventes orgânicos em condições subcríticas (ERASTO et al., 2006; AWE et al., 1999; SALIU et al., 2011; STANGELAND et al., 2011; ADEDAPO et al., 2014; NGATU et al., 2012). Essa ausência de informações na literatura sobre a extração da *Vernonia amygdalina Delile* em CO₂ supercrítico motivou este trabalho.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, são descritos os materiais e métodos empregados para delimitação de parâmetros no processo de extração supercrítica na obtenção de compostos bioativos da planta *Vernonia amygdalina Delile*. Primeiramente, foram realizados experimentos para definição do rendimento de extração global e cinética da extração. Concomitantemente, foram realizadas as extrações do tipo Sohxlet com solventes de polaridades distintas, a fim de verificar o rendimento global, a composição do extrato e comparar as substâncias extraídas da matriz vegetal com o método supercrítico. Em seguida, o perfil de composição dos extratos através de várias técnicas foi analisado. As técnicas empregadas foram Cromatografia em Camada Delgada (CCD) a fim de verificar a presença de flavonóides no extrato, Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM), método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) e método de determinação de fenólicos totais.

3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As folhas de *Vernonia amygdalina Delile* utilizadas neste trabalho foram cultivadas e coletadas próxima à Usina Hidrelétrica de Itaipu Foz do Iguaçu/Paraná em outubro de 2014 e foram secas na estufa de ar recirculante (MARCONI, MA035/5) a 45 °C nas dependências da Universidade Estadual de Maringá. A exsicata¹ da espécie estudada encontra-se depositada como material testemunho no Herbário Farmácias Verdes de Farmanguinhos, Fiocruz, sob número de registro FFAR 639. Após a secagem, as folhas foram separadas e moídas no microprocessador industrial seguida de classificação granulométrica. Para a classificação foram utilizadas peneiras do tipo Tyler com malhas de 8-50 mesh (2,38 mm a 0,297 mm) utilizando um sistema de agitação (AS 200 tipo Magnético). As folhas ficaram retidas entre as malhas de 16-32 (#16=1,19 mm e #32=0,635 mm). Essa granulometria das folhas permite a execução da extração supercrítica sem provocar o entupimento da unidade. Em sequência, as partículas das folhas selecionadas foram acondicionadas em sacos plásticos herméticos e armazenadas a temperatura ambiente.

¹ Exsicata: fragmento ou exemplar vegetal, dessecado, acompanhado de etiqueta com informações diversas sobre o espécime (nome da espécie, local e data de coleta, nome do coletor etc.), e conservado em herbário para estudo.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

3.2.1 Extração supercrítica (ESC)

A unidade de extração supercrítica pode ser visualizada na Figura 11 e o esquema do aparato experimental é mostrado na Figura 12. A unidade de escala laboratorial consta de: um cilindro de CO₂ (Gama gases especiais – IBG, 99% de pureza,); dois banhos termostáticos, o primeiro (THERMO SCIENTIFIC, A-10) é utilizado para resfriar o solvente antes de entrar na bomba e o segundo (TECNAL, TE-184) para manter o extrator aquecido na temperatura desejada; uma bomba do tipo seringa (ISCO, modelo 500D) e um extrator com volume interno de cerca 63 mL (altura 20,5 cm e diâmetro do leito 1,98 cm).



Figura 11. Imagem do aparato experimental utilizado na extração com CO₂ em condições supercríticas.

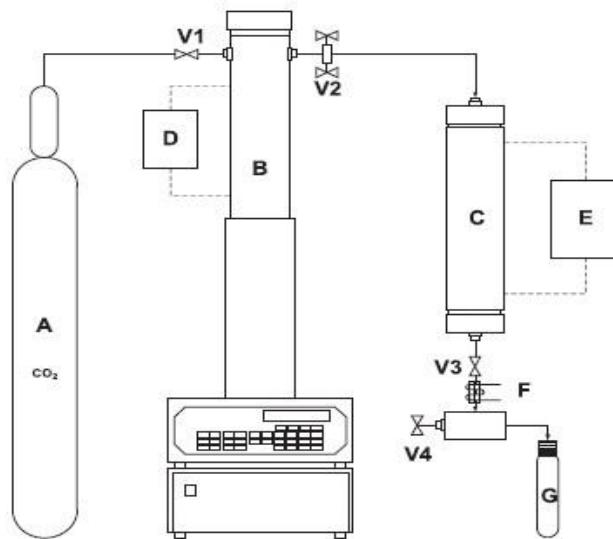


Figura 12. Esquema do aparato experimental utilizado na extração com CO₂ em condições supercríticas: (A) Cilindro de CO₂; (B) Bomba de alta pressão; (C) Extrator; (D, E) Banho termostatizado; (F) Controlador de temperatura na válvula de expansão; (V1, V2) Válvulas gavetas; (V3) Válvula macrométrica; (V4) Válvula de expansão micrométrica; (G) Frasco de coleta.

Fonte: SILVA et al., 2014.

Para extrair substâncias biologicamente ativas, segundo Cardozo-Filho (1999), as pressões e temperaturas de trabalho são respectivamente 150 a 400 bar e 40 a 60 °C. Assim, para análise preliminar foram realizadas extrações nas temperaturas 40, 50 e 60 °C, pressões 100, 150, 200 e 250 bar, tempo de pré-extração 30 e 60 min. Portanto, foram determinados combinações de parâmetros que foram obtidos maior rendimento em massa total, apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições experimentais dos ensaios em meio supercrítico.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Vazão (mL/min)
1	40	200	3
2	40	250	3
3	50	200	3
4	50	250	3
5	60	150	3
6	60	200	3

O material vegetal triturado foi colocado uniformemente no extrator, com objetivo de apresentar boa permeabilidade, permitindo assim maior exposição do soluto ao solvente. O restante do leito foi preenchido com esferas de vidro ($\varnothing = 4$ mm). O fluido percolou inicialmente pelo leito inerte e em sequência pelo material vegetal.

Segue-se o procedimento experimental da extração supercrítica:

- 1 – Colocou-se a amostra no extrator;
- 2 – Ligou-se o banho de resfriamento a 0 °C na bomba seringa, para prevenir a vaporização do solvente;
- 3 – Averiguou-se se todas as válvulas estavam fechadas;
- 4 – Ligou-se os controladores de temperatura e da bomba tipo seringa;
- 5 – Abriu-se a válvula do cilindro de CO₂ e a válvula tipo agulha de entrada na bomba (V1), conforme Figura 12;
- 6 – Fez-se um refil para preenchimento do reservatório da bomba com o solvente (gás CO₂). Aguardou-se um tempo de cerca de 10 minutos para completa acomodação de CO₂ em estado líquido e obter o volume máximo de gás;
- 7 – Fechou-se as válvulas do cilindro e de entrada na bomba (V1). A seguir, abriu-se a válvula de alimentação do sistema (V2) e pressurizou-se a bomba no extrator até a pressão de operação (aproximadamente em intervalos de pressão de 10 bar);
- 8 – Aguardou-se um tempo mínimo de 30 minutos, para que os gradientes de temperatura e pressão fossem praticamente anulados (chamado tempo de pré-extração). Os tempos usados foram de 30 e 60 min;
- 9 – Esperou-se que o controlador da bomba indicasse um valor igual a zero para a vazão volumétrica e anotou-se o volume de gás da bomba;
- 10 – Regulou-se o controlador de temperatura (modelo N1100), interligado ao bloco de aquecimento na saída do extrator (mantido a 90 °C), para evitar o congelamento do extrato na saída do sistema devido ao abaixamento de temperatura (efeito Joule-Thompson) provocado pela expansão do gás;
- 11 – Conectou-se o frasco coletor;
- 12 – Abriu-se a válvula macrométrica completamente e a micrométrica vagarosamente, até que se alcançasse a vazão de solvente de operação. As válvulas V3 e V4 foram fechadas no momento da medida da massa do frasco de coleta;

13 – A medida de massa do frasco foi obtida a cada 10 min na primeira hora de extração e nas demais horas a cada 20 min. A extração encerrou-se a partir do momento que os compostos a serem extraídos fossem esgotados da matriz sólida, ou seja, a partir do momento que massa do frasco coletor não mais se alterasse. Devido à despressurização, ocorreu a separação entre o extrato e o solvente;

14 – Decorrido o tempo de extração, o sistema foi despressurizado.

3.2.2 Extração à baixa pressão com solvente orgânico (Soxhlet)

A extração de compostos bioativos a baixa pressão com solvente orgânico foi executada segundo métodos químicos e físicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2004). O aparelho consiste em um extrator do tipo Soxhlet, um condensador tipo bola e um balão de fundo chato equipado com juntas esmeriladas (Figura 13). Uma determinada massa de folhas secas (4 g) foi acondicionada em papel de filtro dobrado e costurado com fios limpos, de maneira a prevenir perda da amostra. A abertura da parte superior do equipamento foi tampada para evitar perda do solvente para o ambiente. Em seguida, o cartucho poroso com a matriz sólida foi colocado no aparelho de extração. O banho de refrigeração acoplado ao condensador manteve a temperatura a 15 °C e a manta de aquecimento permaneceu a temperatura superior ao ponto de ebulação do solvente orgânico selecionado. Foram utilizados 400 mL de cada solvente orgânico, sendo eles etanol (SYNTH, pureza 99,5%), diclorometano (SYNTH, pureza 99,5%) e hexano (SYNTH, pureza 98,5%). A escolha dos solventes orgânicos foi devido às diferenças de polaridades. O etanol é um solvente polar prótico, o diclorometano é polar aprótico e o hexano apolar e suas constantes dielétricas são, respectivamente, iguais a 30, 9,1 e 1,88.

O sistema ficou em refluxo durante 8 h. Em seguida foi realizado o processo de separação do solvente do extrato de interesse com o rotaevaporador (IKA RV10 digital) na rotação de 120 rpm. O material remanescente foi mantido em estufa até peso constante (+/- 0,01 g) nas seguintes temperaturas: a 90 °C quando a extração foi realizada com etanol, 50 °C com diclorometano e 80 °C com hexano. A seguir, a amostra foi acondicionada no dessecador. Os resultados foram definidos em relação à massa da amostra inicial.

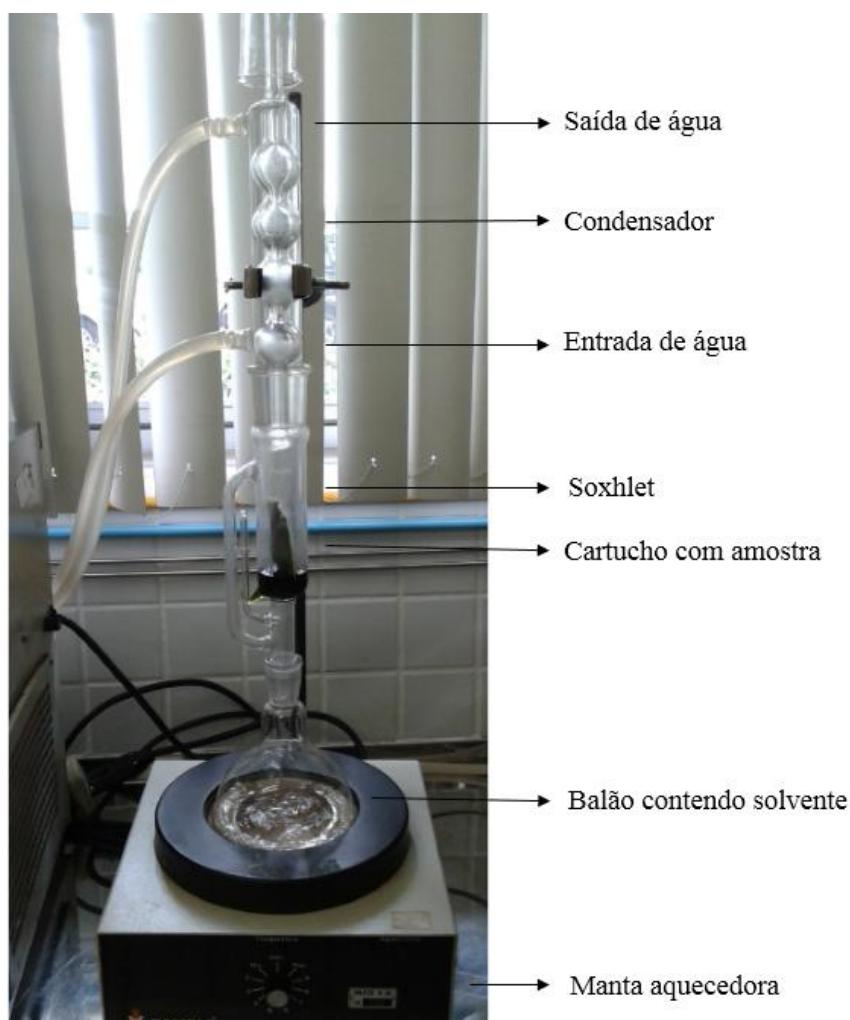


Figura 13. Extrator Soxhlet

3.2.2.1 Densidade do CO₂ supercrítico

A densidade do fluido supercrítico CO₂ foi obtido através das tabelas termodinâmicas internacionais do dióxido de carbono (Angus, Dereuck e Armstrong, 1976) adotadas pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) baseada em dados experimentais.

3.2.2.2 Solubilidade

A solubilidade da matéria-prima no fluido supercrítico foi calculada para cada tempo através da Equação 1. Na extração, os componentes solúveis diminuem no decorrer do tempo,

assim, no final do processo de extração a solubilidade é mínima ou zero. Para determinar o valor da solubilidade de cada ensaio, fez-se a média das solubilidades dos pontos da curva.

$$S = \frac{m_{extraída}}{m_{gás}} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

$m_{extraída}$ = massa de extrato a cada tempo, ou seja, não acumulada;

$m_{gás}$ = massa de CO_2 consumido a cada instante.

3.2.2.3 Rendimento global das extrações supercríticas

O rendimento global da extração supercrítica relaciona a quantidade de extrato obtido com a quantidade de matéria-prima alimentada (Equação 2).

$$R(\%) = \frac{m_E}{m_{alim}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Sabendo que:

m_E = massa total de extrato;

m_{alim} = massa de matéria prima alimentada no extrator.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS

3.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

No Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da UFU, foi analisada a composição de flavonóides e fenólicos totais dos extratos de *Vernonia amygdalina Delile* por cromatografia em camada delgada (CCD). A fase estacionária foi composta de cromatofolhas de alumínio contendo uma fina camada de gel de sílica 60G com indicador de fluorescência. No extremo inferior da placa foram demarcados pontos paralelos para aplicação de gotas das soluções da amostra (concentração de 1 mg/mL em metanol) a serem analisadas. Para aplicação das soluções fez-se uso de capilares. A quercertina foi utilizada como padrão. Aguardou-se um tempo para a secagem da solução na placa. Em seguida, colocou-se a placa em um recipiente com a fase móvel, somente a base da placa ficou mergulhada na mistura de solventes, mostrada na Tabela 5. A polaridade da mistura de solventes foi relacionada com a

substância de interesse que são os flavonóides e fenólicos totais. A fase estacionária subiu por capilaridade. Após a eluição, aguardou-se até que a placa estivesse seca e aplicou-se o revelador em toda a placa. Os reagentes (descritos na Tabela 5) utilizados na solução eluente foram todos grau P.A. A detecção das substâncias foi realizada através de luz ultravioleta. O ensaio foi realizado em duplicata. A coloração específica revelou a presença de antioxidantes.

Tabela 5. Fase móvel e revelador utilizado para identificação de flavonóides e fenólicos totais.

Compostos	Revelador
Flavonóides e Fenólicos Totais Eluente: (1,1:1,1:10:2,6) ácido fórmico (VETEC, 98-100%); ácido acético glacial (DINÂMICA, 99,7%); acetato de etila (ALPHATEC P.A ACS, 99,5%); água.	Flavonóides: NP/PEG Fenólicos totais: Vanilina Sulfúrica

Preparação do revelador

O revelador de produtos naturais com reagente NP (difenilboriloxietilamina)/ PEG (polietilenoglicol) foi preparado nas seguintes etapas: a placa de alumínio foi borrifada com 10 mL de solução ácido β -etilaminodifenilbórico ester 1% (v/v) em metanol (NP) seguido de 8 mL de solução de polietilenoglicol (PEG 4000) 5% (v/v) em etanol.

O revelador vanilina sulfúrica foi preparado com solução de vanilina 1% (v/v) em etanol (solução I) e ácido sulfúrico 10% (v/v) em etanol (solução II). A placa foi pulverizada com 10 mL de solução I, imediatamente, logo após 10 mL da solução II (WAGNER; BLADT, 1996).

3.3.2 Espectrofotometria UV-visível

Extratos de *Vernonia amygdalina Delile* foram analisados no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da UFU, obtendo-se curvas espectrofotométricas UV/VIS através do espectrofômetro (HITACHI, modelo U-2000). Para preparação das amostras, 1 mg de cada extrato foi diluído em 2,5 mL de metanol. A finalidade da análise foi a presença de duas bandas no intervalo de 240-450 nm (FAN et al., 2012) e absorção na faixa de 220-350 nm, as quais estão associadas à presença de flavonóides e fenólicos, respectivamente. As curvas foram comparadas com a literatura.

3.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) do extrato de *Vernonia amygdalina Delile*

3.3.3.1 Derivatização do extrato

A derivatização dos extratos foi necessária para viabilizar a análise no cromatógrafo gasoso, pois a amostra a ser analisada pela espectrometria de massas (CG-EM) possui metabólitos não voláteis. A técnica utilizada para derivatização da amostra foi a sililação, a qual consiste na substituição do hidrogênio ativo do grupo funcional da molécula, nesse caso, hidroxila (-OH), pelo grupo trimetilsilil (TMS – Si(CH₃)₃).

Em um tubo com tampa de rosca, foram adicionados 150 µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) (MSTFA/1% TMCS, Acros Organics) em 20 mg de amostra. A mistura foi homogeneizada e levada à estufa por 1 h a temperatura de 70 °C para reação. O reagente foi evaporado e o produto da derivatização foi diluído novamente em 300 µL de clorofórmio (F.MAIA P.A ACS, 99,8% de pureza), sendo homogeneizado e o sobrenadante injetado no CG-EM. Dessa forma, a amostra foi analisada como derivado trimetil.

3.3.3.2 Metodologia para análise

Os extratos foram analisados quanto à composição química em cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (Agilent, modelo 19091S-433) equipado com coluna capilar HP-5MS (0,25 mm X 30 m X 0,25 µm) e interface com detector seletivo de massa, segundo a metodologia de Atangwho et al. (2013). A programação de aquecimento da coluna foi conduzida da seguinte forma: iniciou-se com a temperatura de 70 °C por 2 min, aumentando-se para 280 °C a uma taxa de 20 °C/min por 20 min. A temperatura do injetor foi de 220 °C e a razão de split de 10:1. O gás carreador foi o hélio, a uma vazão de 1,2 cm³/min. O volume de injeção foi 1 µL de solução de extrato.

Os constituintes dos extratos foram caracterizados baseados na interpretação e comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis no banco de dados do equipamento. Esta análise foi realizada no laboratório do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá (PR).

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os extratos foram avaliados quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH[•] e fenólicos totais. As análises foram realizadas em duplicita.

3.4.1 Método de redução do radical estável livre DPPH[•]

Os reagentes utilizados foram DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) (SIGMA ALDRICH CO) e rutina hidrato (SIGMA ALDRICH CO) como padrão; as soluções foram preparadas com o solvente metanol (VETEC, pureza 99,8%) e para diluição do extrato foi adicionado acetato de etila (ALPHATEC P.A ACS, com pureza 99,5%).

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o radical livre estável DPPH[•], que sofre redução na presença de antioxidantes, segundo método descrito por Brand-Williams et al. (1995) com modificação.

Inicialmente, 0,024 g de DPPH[•] foram dissolvidos em 100 mL de metanol, denominada como solução estoque. Esta solução estoque foi armazenada em meio refrigerado a -20 °C. Para cada análise foi retirada uma alíquota de 10 mL da solução estoque e 45 mL de metanol foi adicionado, esta solução foi referida como solução trabalho. Posteriormente, a medida de absorbância da solução de trabalho foi realizada com valor próximo de 1,1.

As soluções referentes ao antioxidante (Rutina) foram preparadas em diferentes concentrações de 0,8267 µg/mL a 5,7863 µg/mL, os solventes foram acetato de etila 20% em metanol. Os extratos que foram obtidos em condições supercríticas foram preparados de forma similar nas concentrações 123,33 µg/mL a 1.213,25 µg/mL e aqueles extraídos pela adição de solventes orgânicos foram 8,66 µg/mL a 1.115,26 µg/mL. Após a etapa de preparo das soluções seguiu-se para a determinação da atividade anti-radical livre. Em tubos de vidro transparente foram adicionados 140 µL das soluções de extrato nas diferentes concentrações, 140 µL do padrão rutina, como o controle positivo¹ e 140 µL de água destilada como o controle negativo², seguido de 2860 µL da solução trabalho de DPPH[•]. Aguardou-se um tempo de 1 h na ausência de luz para ocorrência da reação. Em seguida, medidas de absorção foram realizadas no espectrofotômetro (Pró-análise, modelo V-1200) a 515 nm. As medidas de

¹ Controle positivo: solução com o padrão antioxidante.

² Controle negativo: solução sem a presença de antioxidantes.

absorção foram obtidas em duplicata e a porcentagem da atividade antioxidante foi calculada a partir da Equação 3.

Para investigar a possível interferência do acetato de etila na redução do radical DPPH[•], preparou-se 200 µL de acetato de etila em 2860 µL da solução trabalho de DPPH[•] e mediou-se a absorbância. A seguir, esta solução foi colocada em ambiente com ausência de luz por 1 hora e mediou-se a absorbância.

$$\% \text{ AA} = (1 - \text{Abs. amostra} / \text{Abs. controle negativo}) \times 100$$

Equação 3

Um gráfico dos valores da porcentagem da atividade antioxidante em função das concentrações dos extratos foi realizado. A partir da equação da curva foi determinada a CE₅₀, estimativa da concentração em µg/mL de extrato necessária para reduzir 50% do radical estável livre DPPH[•]. Portanto, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante das substâncias presentes.

3.4.2 Método para determinação do teor de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado segundo a metodologia de Meda et al. (2005). Os reagentes utilizados foram o Folin-Ciocalteau (SIGMA-ALDRICH) e ácido gálico (VETEC, 99%) como padrão; como solventes o metanol (DINÂMICA, 99,8%), o acetato de etila e o carbonato de sódio anidro (VETEC, 99,5%). As soluções dos extratos obtidos por extração em condições supercríticas contendo acetato de etila 20% em metanol foram preparados na concentração de 4 mg/mL. Os extratos obtidos pela extração com solventes orgânicos foram preparados de forma semelhante, exceto a concentração do extrato etanólico que foi de 0,4 mg/mL. A seguir, retirou-se 0,5 mL da solução de extrato e adicionou-se 2,5 mL de solução Folin-Ciocalteau 10% em água ultrapura e aguardou-se um tempo de 5 minutos, após o qual adicionou-se 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 14% em água ultrapura. A solução foi mantida na ausência de luz por 2 h. As medidas de absorbância no espectrofotômetro (Pró-análise, modelo V-1200) no comprimento de onda de 760 nm foram realizadas. Para controle negativo, utilizou-se a mesma mistura preparada para os extratos, porém com metanol puro ao invés da solução de extrato. Os ensaios foram realizados em duplicata. O teor de fenóis totais foi determinado a partir da curva de calibração do padrão

(ácido gálico), em concentrações finais 0,4 µg/mL a 3,2 µg/mL e expressas em g de equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100g de extrato.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores do rendimento obtidos na extração supercrítica foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os métodos de extração que apresentaram a melhor resposta foram identificados a partir de comparação entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de significância fazendo uso do software Statistica®versão 7.0 (StatSoft, EUA).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste item serão apresentados os resultados e discussões sobre extração, identificação dos compostos bioativos e atividades antioxidantes.

4.1 EXTRAÇÕES

4.1.1 Extração com fluido supercrítico

A extração de soluto, a partir de uma matéria sólida, com fluido supercrítico pode envolver três etapas distintas: transferência de massa interna, equilíbrio de fases e transferência de massa externa. Assim, o rendimento de extração da planta medicinal *Vernonia amygdalina Delile* pode ser afetada por parâmetros operacionais, tais como: o pré-tratamento do sólido, pressão, temperatura, natureza do fluido, vazão de solvente e solubilização dos compostos visados (REBOLLEDA et al., 2012). A manipulação do poder de solvatação do CO₂ supercrítico através da modificação da temperatura e/ou pressão é uma das vantagens da extração supercrítica.

A partir dos dados disponíveis na literatura (MEIRELES, 2009b; CARDOZO-FILHO, 1999; POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007) e a execução de testes preliminares, foi possível determinar as condições de operação do processo (temperatura e pressão) para a extração dos compostos bioativos da planta *Vernonia amygdalina Delile* com CO₂ supercrítico, atentando à limitação da pressão (258 bar) do equipamento experimental.

A Tabela 6, a seguir, mostra o rendimento global dos extratos em função das variáveis temperatura, pressão e tempo de pré-extração. A seleção das condições de temperatura e pressão levou em consideração o intervalo de valores expressa na Figura 4 (CARDOZO-FILHO, 1999), e consequentemente no poder de solvatação do solvente.

Tabela 6. Testes preliminares para escolha das condições de operação.

Experimento	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Tempo de pré-extracção (min)	Rendimento total (%) [*]
1	40	100	30	0,78
2			60	0,67
3		150	30	0,89
4			60	0,86
5		200	30	0,92
6			60	0,90
7		250	30	1,02
8			60	1,13
9	50	100	30	0,11
10			60	0,17
11		150	30	0,94
12			60	0,90
13		200	30	0,83
14			60	0,92
15		250	30	1,23
16			60	1,30
17	60	100	30	0,18
18			60	0,2
19		150	30	0,96
20			60	1,03
21		200	30	0,74
22			60	0,73
23		250	30	1,47
24			60	1,41

*Rendimento (%) = ($m_{\text{extraída}}/m_{\text{alimentada}}$) * 100

Pôde-se observar que nas condições operacionais de pressão de 100 bar combinada às temperaturas de 50 e 60 °C, apresentaram os menores percentuais em rendimento global (0,11 a 0,20). As combinações de parâmetros (temperatura e pressão), 150 bar a 60 °C, 200 bar a 40, 50 e 60 °C e 250 bar a 40, 50 e 60 °C, foram os pontos escolhidos para as análises posteriores. Nestas condições foram avaliadas a atividade antioxidante, presença de classes de antioxidantes e foram identificados os possíveis compostos majoritários dos extratos.

A Tabela 7, a seguir, apresenta o efeito das variáveis independentes (pressão, temperatura e vazão) sobre o rendimento global em base seca obtidos nos ensaios escolhidos a partir dos testes preliminares. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados são apresentados como média mais ou menos desvio padrão.

Tabela 7. Rendimento global de extrato de *Vernonia amygdalina Delile* obtido por extração supercrítica.

Experimentos	Condições de Operação				
	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Tempo pré- extração (min)	Densidade CO ₂ (kg/m ³)	Rendimento* (% massa)
1	150	60	30	605,42	0,98 ± 0,20
2			60		1,01 ± 0,10
3		40	30	840,60	0,91 ± 0,30
4			60		0,93 ± 0,20
5	200	50	30	785,17	0,87 ± 0,10
6			60		0,89 ± 0,10
7		60	30	724,55	0,78 ± 0,04
8			60		0,71 ± 0,10
9		40	30	880,22	1,03 ± 0,10
10			60		1,11 ± 0,20
11	250	50	30	834,94	1,25 ± 0,10
12			60		1,29 ± 0,10
13		60	30	787,20	1,48 ± 0,04
14			60		1,39 ± 0,10

*Rendimento (%) = (m_{extraída}/m_{amostra seca}) * 100

Como demonstrado na Tabela 7, o aumento da pressão e temperatura, exceto para os ensaios na pressão 200 bar, aumentou o rendimento total. A 200 bar, os rendimentos diminuíram com o aumento da temperatura, e os mesmos foram menores em relação às demais condições experimentais. O vazão de CO₂ e a granulometria das folhas secas da planta foram constantes a 3 mL/min e 16-32 mesh, respectivamente. Foi trabalhado com variados valores de densidade (605,42 a 880,22 kg/m³). Nota-se que com o aumento da pressão e diminuição da temperatura os valores da variável dependente densidade aumentaram. O efeito do tempo de pré-extração (30 e 60 min) não mostrou variação significativa quanto aos valores de rendimento nas mesmas condições experimentais. Enfim, os maiores rendimentos em massa global (1,39 e 1,48%) das extrações foram obtidas para a pressão de operação mais elevada (250 bar) e maior temperatura de trabalho (60 °C).

Estudos realizados por Lemos et al. (2012) sobre a extração supercrítica de neolignanas de *Piper regnelli* var. *pallescens* com dióxido de carbono pressurizado a 109,2,

244,1 e 250,0 bar e 40 e 60 °C e condições experimentais combinadas respectivamente, resultaram em rendimentos totais de 0,65 a 2,39% de extratos das folhas da planta medicinal. Portanto, pode-se visualizar quantidades significativas (0,71 a 1,48%) de material extraído das folhas da planta medicinal *Vernonia amygdalina Delile*.

Mazzutti et al. (2012) realizaram a extração de compostos bioativos do cogumelo *Agaricus brasiliensis* utilizando CO₂ supercrítico puro. O rendimento global de massa de extrato foi 0,5 a 1,19% nas condições experimentais 100 e 300 bar e 40, 50 e 60 °C. Deste modo, é possível afirmar que os resultados obtidos com a planta *Vernonia amygdalina Delile* foram bastante significativos.

Observou-se que as amostras obtidas a diferentes pressões, obtiveram colorações diferentes. Como mostra na Figura 14, os extratos adquiridos a pressões mais baixas apresentaram coloração amarelo escuro. Porém, os extratos obtidos a pressão de 250 bar apresentaram uma coloração marrom escuro. Pode-se ressaltar que tal comportamento observado foi devido ao aumento da pressão, pois pode levar à diminuição da seletividade, como resultado da coextração de compostos que minimizam o grau de pureza e fornecem cor ao extrato. O rendimento de extração e a solubilidade dos compostos aumentam com o aumento da densidade, a temperatura constante, com exceção na pressão de *cross-over* (200 bar), levando a uma maior variedade de compostos extraídos (LEMOS et al., 2012).

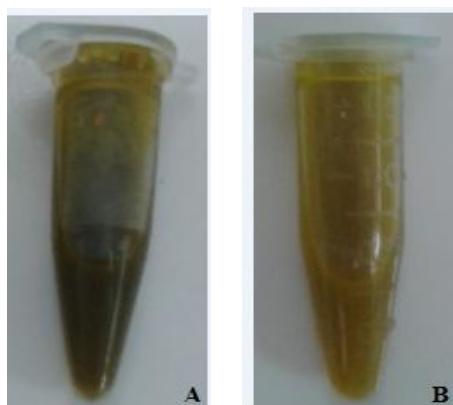


Figura 14. Extratos diluídos em metanol obtidos por extração supercrítica a 250 bar (A) e 200 bar (B).

Na Figura 15 tem-se as curvas cinéticas de extração, dos ensaios cujos rendimentos foram superiores a 0,86%, para os testes das folhas nos tempos de pré-extração de 30 min para os ensaios realizados com dióxido de carbono puro. Elas retratam o comportamento da massa acumulada de extrato obtida em base seca para cada um dos ensaios. Em todos os

ensaios, pôde-se observar que em até 280 min de extração foram suficientes para causar a exaustão de solutos presentes na matriz vegetal.

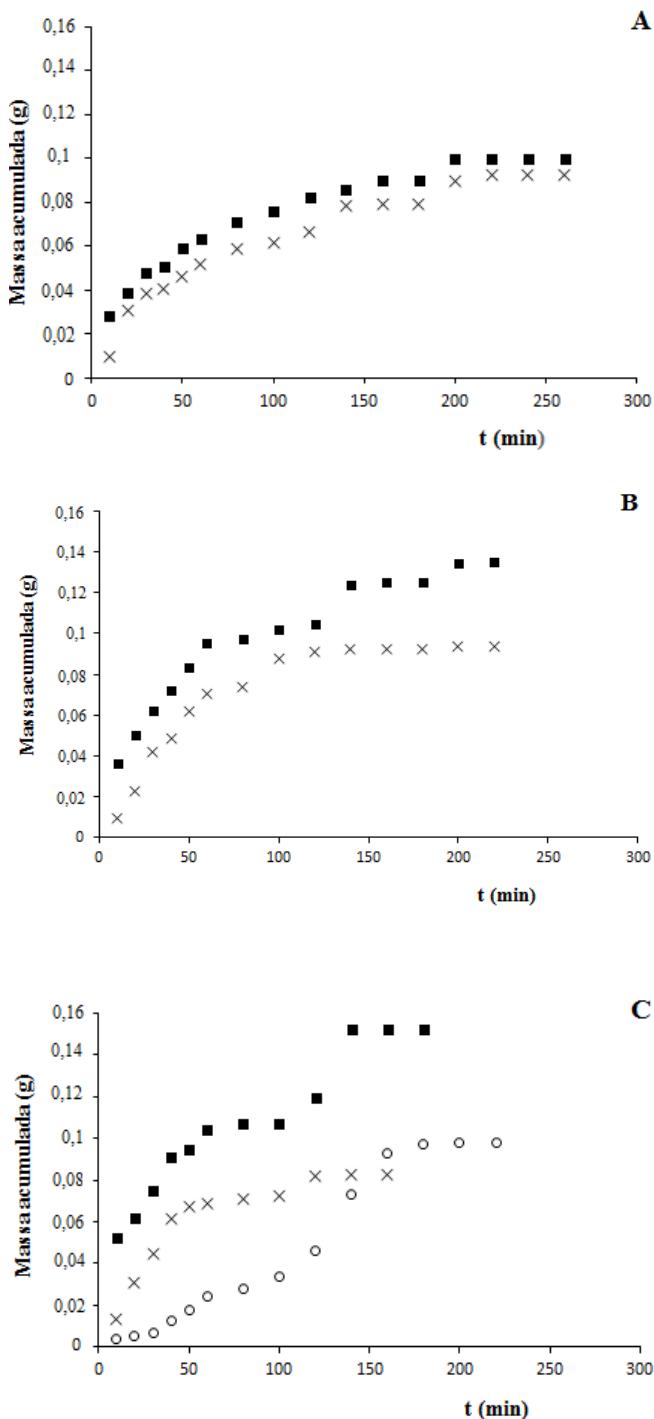


Figura 15. Curva de extração em condições supercríticas para as folhas de *Vernonia amygdalina Delile* no tempo de pré-extração de 30 min. em diferentes valores de temperaturas: (A) 40 °C; (B) 50 °C; (C) 60 °C. Os valores de pressão utilizados nas extrações foram: (○) P = 150 bar; (×) P= 200 bar; (■) P=250 bar.

O processo de extração supercrítica não é linear em relação ao tempo de extração e, em geral, possui três períodos. Para cada condição operacional avaliada foi possível observar a formação de etapas diferentes na curva: o período de taxa de extração constante (CER), na qual as partículas sólidas estão parcialmente cobertas pelo extrato; período de taxa constante (FER), onde a camada superficial dos sólidos mostram imperfeições; e o terceiro é o período difusional (SILVA, 2004), pode ressaltar conforme indicado também nas Figuras 2. Geralmente, de 50 à 90% dos compostos extraíveis são obtidos na etapa FER, assim, de forma a reduzir os custos do processo, a otimização da operação deve focar nesta região (MOURA et al., 2012).

Quanto à cinética de extração experimental, a extração com tempo de pré-extração de 60 min (Apêndice A – Figura A) mostrou-se mais eficaz nos primeiros tempos (30 min) de extração, como por exemplo: a 150 bar e 60 °C, com tempo de pré-extração de 30 min a massa acumulada de extrato foi 0,0126 g, em 60 min foi de 0,0224 g e a 200 bar e 50 °C, em 30 min 0,0488 g, 60 min 0,0671 g. Mas, o tempo total de extração foi o mesmo para ambos os tempos de pré-extração.

As curvas de extração não seguiram exatamente a conformação do modelo geral da curva de extração supercrítica, pois o processo completo de extração é descontínuo. Para cada extração foi realizada uma interrupção, momento em que o reservatório da bomba foi preenchido com o solvente CO₂ (refil). Portanto, nesse tempo (aproximadamente 20 min) as válvulas que controlam a saída de extrato foram completamente fechadas. Após ocorrido o tempo de preenchimento, as válvulas foram abertas e uma quantia maior de extrato foi expelido, pois o extrato foi acumulando no extrator ao longo do tempo.

As isotermas de rendimento global da ESC da planta *Vernonia amygdalina Delile* em função da pressão e da densidade do CO₂ são mostradas nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

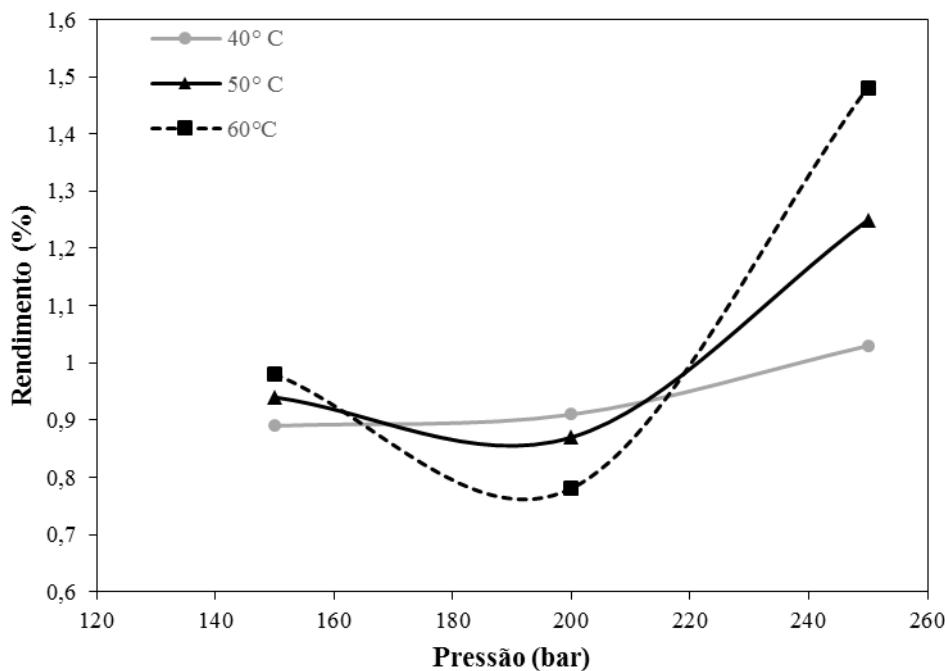


Figura 16. Isotermas de rendimento global do sistema *Vernonia amygdalina Delile* + CO₂.

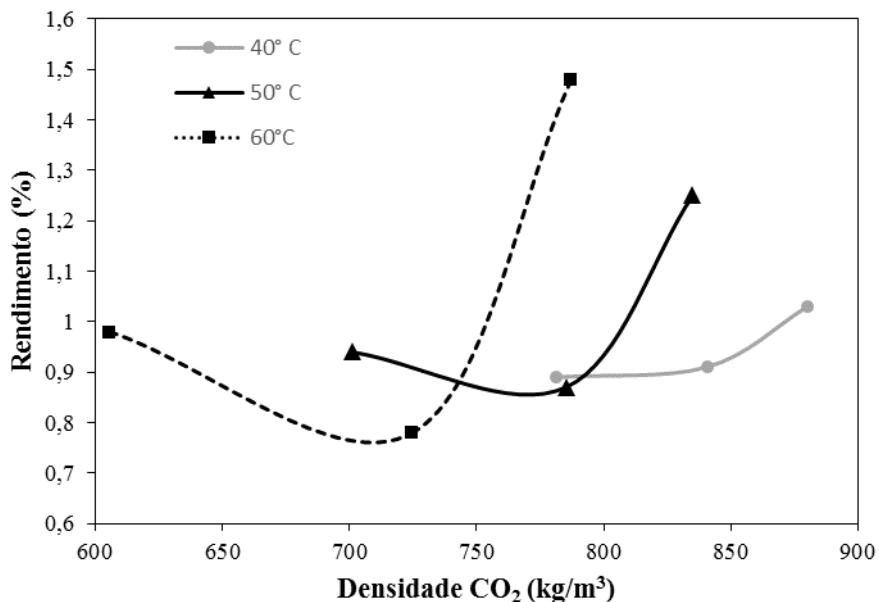


Figura 17. Isotermas de rendimento global do sistema *Vernonia amygdalina Delile* + CO₂.

A inversão das isotermas pode ocorrer em sistemas em condições supercríticas. As pressões de inversão para o sistema *Vernonia amygdalina Delile* + CO₂ foram verificadas nas proximidades de 165 bar a 219 bar. Este fenômeno deve ser analisado em termos da pressão

de vapor do soluto e da densidade do solvente no rendimento total de extração segundo as Figuras 16 e 17. Observa-se na Figura 16 que, para a pressão de 250 bar, o rendimento global aumenta com a temperatura devido ao aumento da pressão de vapor da mistura de solutos. A 200 bar, o rendimento global é maior a 40 °C do que a 50 e 60 °C e nesta pressão, a densidade do CO₂ é influenciada pela temperatura, sendo a pressão de vapor do soluto menos importante do que o efeito da densidade do solvente (TELLO et al., 2011). Segundo Brunner (1994), em altas pressões, a mudança da massa específica com a temperatura é moderada, então o aumento na pressão de vapor é o fator dominante. Já a baixas pressões, a perda do poder de solvatação do solvente induzido pela massa específica mais baixa prevalece (HEZAVE et al., 2011; ZHAO e ZHANG, 2014). Estes dois efeitos contrários resultam na inversão das isotermas de rendimento, fenômeno conhecido como retrogradação, condensação retrógrada, ou *cross-over*. A pressão de vapor do soluto aumenta com a temperatura ao passo que a densidade diminui. Os efeitos dos parâmetros temperatura e pressão são semelhantes aos efeitos na solubilidade do extrato de *Vernonia amygdalina Delile* em dióxido de carbono supercrítico. A 40 °C o fator predominante na solubilidade da matéria-prima no solvente supercrítico é a densidade do CO₂, uma vez que o rendimento global aumenta com a densidade. Na isoterma obtida a 50 °C a pressão de vapor, na pressão 200 bar, é o fator que mais influencia a solubilidade dos componentes. Tendo em vista que o extrato contém uma diversidade de classes de compostos, as solubilidades destes compostos podem ser distintas para as diversas condições de pressão e temperatura. Esse fato explica o comportamento do aumento de rendimento global de extrato de 200 bar para 250 bar e a diminuição do rendimento com o aumento da pressão de 150 bar para 200 bar. Portanto, tanto a pressão de vapor quanto a densidade são efeitos importantes para a determinação da solubilidade do extrato. O maior rendimento total obtido foi no ensaio a 250 bar e 60 °C ($1,48 \pm 0,04\%$) com tempo de pré-extração de 30 min.

Nota-se a partir da Figura 18 que na isoterma medida a 40 °C em densidades superiores a 840,6 kg/m³ e na isoterma obtida a 50 °C em densidades superiores a 785,17 kg/m³, um aumento da pressão aumentou a solubilidade dos constituintes da planta no solvente. O efeito contrário foi em virtude da temperatura, e o efeito da temperatura sobre a solubilidade é o mais complexo. Pode-se concluir que a região de *cross-over* foi na pressão 200 bar. A solubilidade das folhas secas da planta *Vernonia amygdalina Delile* no CO₂ supercrítico, a 50 °C, aumentou à medida que a densidade aumentou acima de 200 bar,

enquanto que a solubilidade, a 40 °C, diminuiu. E a 60 °C, a solubilidade aumentou linearmente com o aumento da densidade.

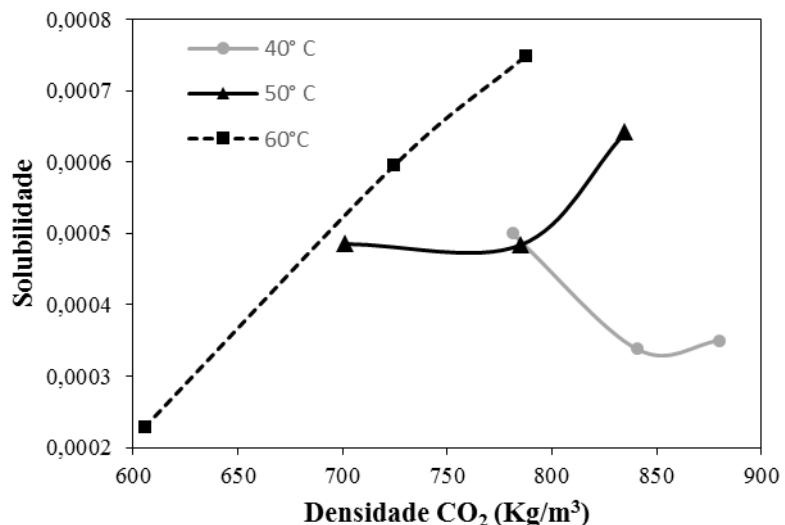


Figura 18. Curvas de solubilidade em função da densidade a temperaturas constantes de 40, 50 e 60 °C.

4.1.2 Extração com solventes orgânicos do tipo Soxhlet

A extração com o uso de solventes orgânicos utilizando um extrator do tipo Soxhlet foi realizada com o intuito de comparar os rendimentos com aqueles obtidos com o uso de CO₂ em condições supercríticas. A Tabela 8 apresenta os dados de rendimento global de cada extração para avaliar a influência do solvente no processo a baixa pressão. O hexano, diclorometano e etanol foram escolhidos neste estudo como solventes de extração devido aos diferentes índices de polaridade, como mostra a Tabela 9. Os índices de polaridade dos solventes são apresentados em relação ao da água. Desta maneira, quanto menores os índices em relação à água, maior será o grau apolar da substância.

Tabela 8. Rendimento global de extrato de *Vernonia amygdalina Delile* obtido por solventes orgânicos.

Solvente	Rendimento (%)*
Hexano	10,4 ± 0,25
Diclorometano	12,4 ± 0,03
Etanol	31,8 ± 0,03

*Rendimento (%) = ($m_{extraída}/m_{alimentada}$) * 100

Pela análise da Tabela 8, o solvente que obteve efeito mais significativo sobre o rendimento de extrato foi o etanol (31,8%), seguido do diclorometano (12,4%) e hexano (10,4%) para um tempo de extração de 8 h. A temperatura do processo foi: etanol (90 °C), diclorometano (50 °C) e hexano (80 °C). A polaridade dos solventes foi o parâmetro que atribuiu maior efeito sobre o rendimento.

As colorações dos extratos foram distintas de acordo com o solvente usado na extração. Notou-se que os extratos de diclorometano e etanol apresentaram coloração verde mais intensa comparado ao solvente hexano. As diferentes colorações podem ter sido ocasionadas pela presença de clorofila nos extratos.

Tabela 9. Propriedades relevantes dos solventes utilizados nas extrações Soxhlet.

	Solvente	Índice de Polaridade (unidades)	Ponto de Bolha (°C)	Densidade a 25 °C (cm ³ /mL)
1	Hexano	0,1	69,0	0,659
2	Diclorometano	3,1	39,8 - 40,0	1,325
3	Etanol	5,2	78,0	0,789
	Água (somente para comparação)	10,2	100,0	1

Fonte: RAMLUCKAN et al., 2014.

Avaliando-se os valores obtidos na extração supercrítica (Tabela 7) com as extrações por Soxhlet (Tabela 8), pode-se constatar que os extratos ESC apresentaram um rendimento menor que os extratos obtidos com solventes orgânicos, confirmando a seletividade dos compostos de acordo com a polaridade do solvente CO₂. Os diferentes valores de rendimentos globais indicam que a polaridade do solvente utilizado influencia e aumenta o valor do

rendimento global. Os valores superiores de rendimento total de extração também estão associados ao tempo de extração prolongado na técnica convencional, uma vez que aumenta o tempo de contínuo contato solvente/soluto.

Apesar dos valores de rendimentos utilizando solventes orgânicos serem superiores, cabe salientar que os extratos obtidos por métodos convencionais necessitam do processo de purificação pós extração, além do calor aplicado para remover o solvente pela etapa de evaporação, que pode promover a degradação de alguns compostos antioxidantes termolábeis (GONZALEZ e GONZALEZ, 2010). Assim, a escolha do melhor processo de extração deve levar em conta o processo total, caracterizado pela extração e separação. A extração com fluido supercrítico apresenta vários atrativos para o processamento de produtos de ocorrência natural de fácil oxidação, decorrente das várias características distintas, tais como a facilidade de recuperação do soluto, a possibilidade de direcionar a separação pela escolha a priori das condições termodinâmicas de temperatura e/ou a pressão e, com isso, a sintonia do poder de solvência do fluido usado na extração para uma determinada extração e/ou separação, e o controle da seletividade do processo pela escolha apropriada do solvente. O uso do CO₂ como solvente, fluido inerte, não tóxico, não inflamável, não agressivo ao meio ambiente e com temperatura crítica baixa, apresenta a possibilidade da realização da extração e do fracionamento sem o risco de deixar resíduos indesejáveis e/ou degradar termicamente os produtos obtidos. Por isso, a tecnologia de ESC é uma alternativa viável de extração para as indústrias de alimentos e farmacêuticas (JOKIC et al., 2012b; JOKIC et al., 2011).

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Existem inúmeros métodos e técnicas analíticas para identificação de compostos, os quais são escolhidos analisando-se as propriedades físicas, químicas e biológicas das mesmas, a disponibilidade, viabilidade, simplicidade, adequação técnica, etc. A cromatografia em camada delgada analítica (CCD) é um método bastante utilizado para estudar o perfil das substâncias químicas presentes em extratos de matriz vegetal, em virtude da adequação aos fatores referentes à substância, à viabilidade financeira, simplicidade, e no auxílio prévio na identificação de componentes presentes. As fases móveis foram escolhidas de modo a possibilitar uma boa separação dos compostos e o revelador para identificar os compostos de interesse.

Nesta etapa do trabalho, pretendeu-se avaliar a existência ou não de compostos antioxidantes, como os flavonóides e fenólicos totais, com intuito de efetuar análise posterior em cromatografia líquida de alta eficiência de compostos específicos da classe. A presença de bandas nas cores laranja e verde indicam a presença de flavonóides fazendo uso dos eluentes e do revelador descritos anteriormente (WAGNER et al., 1985).

A análise cromatográfica em camada delgada em gel de sílica mostrou que o perfil obtido para o extrato supercrítico não foi semelhante qualitativamente com o padrão quercetina. Uma banda de coloração verde foi verificada na placa, de modo sutil sem a presença de fluorescência, quando observada sob irradiação de 254 nm. Para o extrato em etanol, observou-se que a banda de coloração verde pôde ser melhor visualizada com fluorescência, porém em alturas diferentes ao comparar com o padrão.

A resposta da análise de fenólicos totais mostrou-se bastante similar ao dos flavonóides, porém com uma fluorescência mais intensa para o extrato etanólico. Segundo Gonzalez e Gonzalez (2010), a solubilidade de substâncias polares, como alguns compostos fenólicos, no CO₂ supercrítico pode ser baixa e esses compostos podem não ser extraídos com a eficiência desejada.

4.2.2 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

A faixa de comprimento de onda (λ) na qual os compostos fenólicos absorvem luz é de 220-350 nm. Enquanto os flavonóides são caracterizados pela presença de duas bandas na faixa de 240-450 nm, a banda I (300-380 nm) representa absorção devido ao anel B (sistema cinamoil) e a banda II (240-280 nm) está relacionada à absorção devido ao anel A (apresentando principalmente o sistema benzoíla), mostrado na Figura 19 (NASEEM et al., 2010). Os flavonóides absorvem no UV-visível devido à presença de insaturações dos anéis aromáticos.

Nota-se que os espectros referentes aos extratos supercríticos a diferentes pressões (Figura 21) não correspondem exatamente com a configuração da geometria para flavonóides e fenólicos, que pode ser observada na Figura 20. O espectro do extrato etanólico apresentou absorção nas proximidades de 270 a 400 nm. Dessa forma, pode-se dizer que nos extratos obtidos com CO₂ supercrítico apresentam pequenas quantidades desses compostos antioxidantes. Pressupõe-se que as moléculas carreadas entraram em sinergismo, existência de estruturas de cadeia formada com os antioxidantes e outras classes de compostos presentes

nas folhas da planta que apresentam afinidade química com o solvente dióxido de carbono (LÉVAI et al., 2015). O extrato obtido com o solvente etanol apresenta quantidade significativa destes compostos. Assim, pode-se afirmar que as moléculas de antioxidantes são polares.

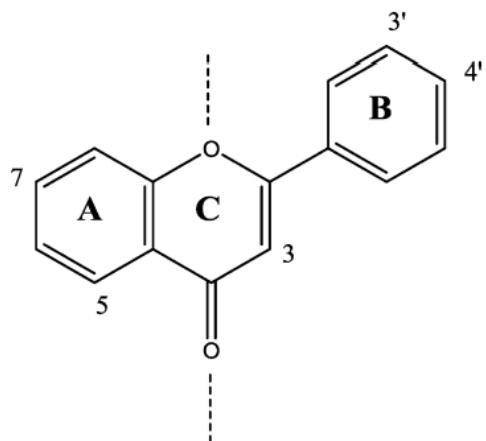


Figura 19. Estrutura molecular de flavonóides.

Fonte: NASEEM et al., 2010.

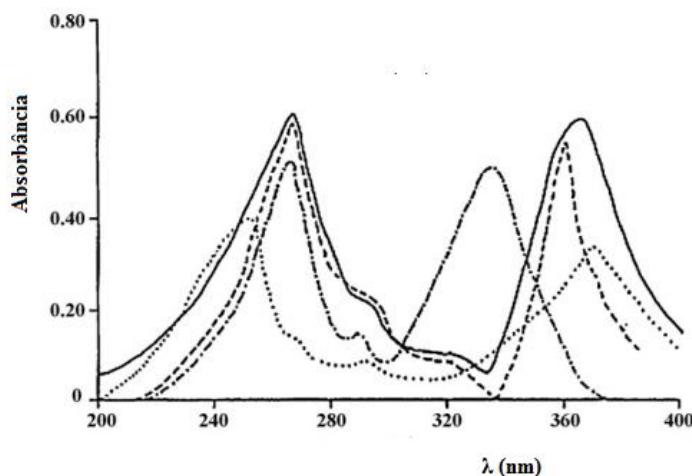


Figura 20. Espectros UV-visível de flavonóides em metanol obtidos da literatura.

Fonte: NASEEM et al., 2010.

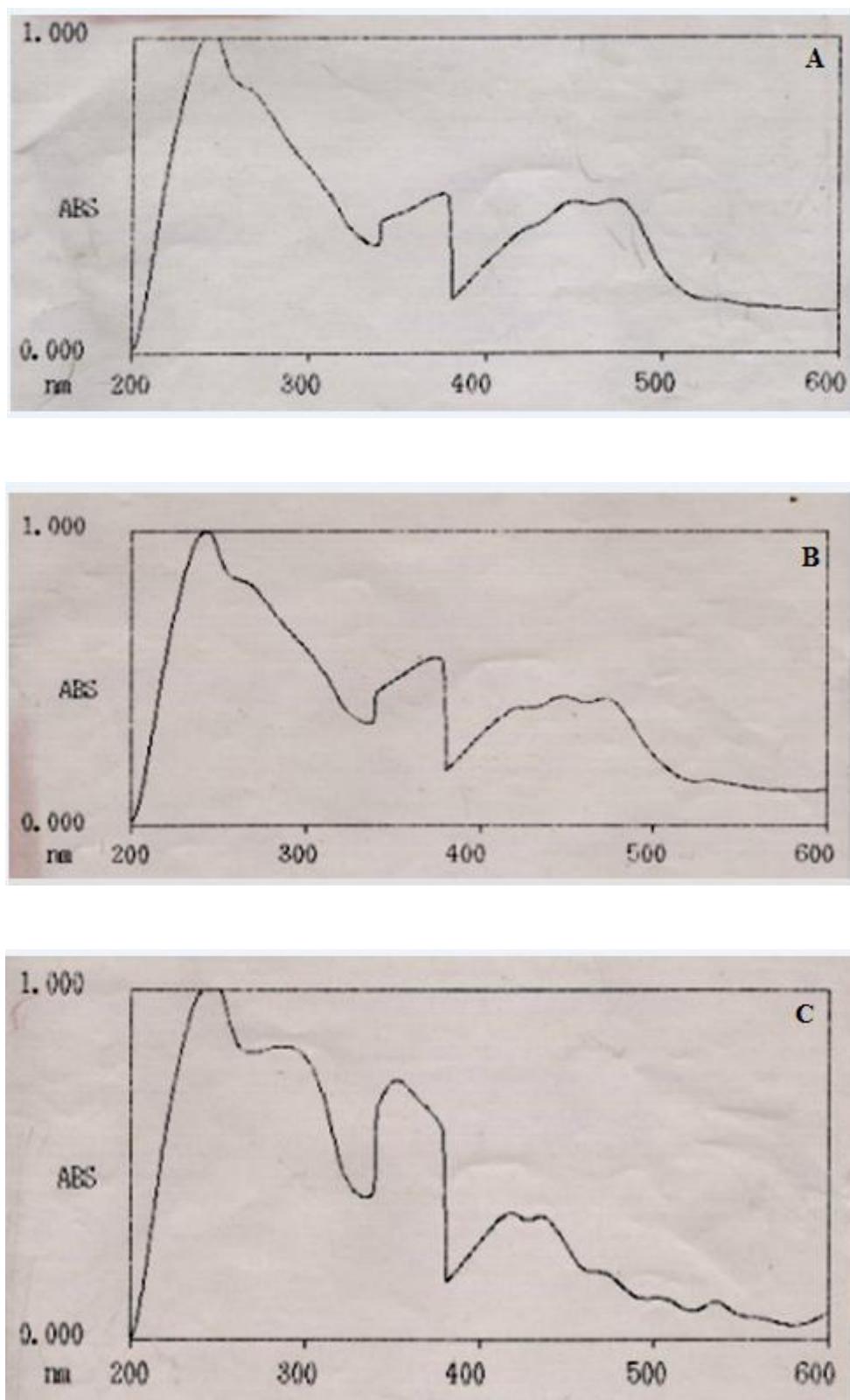


Figura 21. Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos supercríticos a (A) 200 bar e (B) 250 bar e (C) extrato etanólico.

4.2.3 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

4.2.3.1 Constituintes majoritários encontrados no extrato da planta

A Tabela 10 apresenta os resultados referentes à composição dos substâncias extraídas com o uso de CO₂ em condições supercríticas de *Vernonia amygdalina Delile*. Estes compostos foram obtidos em diferentes condições de operação nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C na faixa de pressão de 150 a 250 bar.

Tabela 10. Composição do extrato ESC (% em área) da planta em diferentes condições de extração (°C/bar).

Composto	TR (min)	40		50		60	
		250	200	250	150	200	250
Ácido Hexadecanóico^a	11,349	11,14	19,01	10,02	14,49	10,39	12,92
Fitol	11,956	4,63	10,49	6,06	11,82	8,20	10,37
9,12-Octadecadienóico^b	12,164	11,53	17,27	9,84	13,42	20,49	-
Ácido α-linolênico	12,196	11,45	22,43	10,89	-	-	28,04
Ácido Octadecanóico^c	12,242	2,71	4,04	2,13	15,20	2,37	2,85
Ácido Eicosanóico	13,134	1,55	-	1,52	1,34	1,37	1,47
Ácido Docosanóico	14,233	0,85	-	0,90	-	0,92	-

TR (Tempo de Retenção)

Ácido Palmítico^a

Ácido Linoléico^b

Ácido Esteárico^c

Por meio da análise de cromatografia gasosa realizada com os extratos de *Vernonia amygdalina Delile* verificou-se a presença de compostos com estruturas complexas de alta massa molecular. Os compostos majoritários da fração pesada (fração ESC) encontrados foram: ácido hexadecanóico ou ácido palmítico (10,02 – 19,01%), fitol (4,63 – 11,82%), ácido 9,12-octadecadienóico (9,84 – 20,49%), ácido α-linolênico (10,89 – 28,04%) e ácido octadecanóico (2,37 – 15,20%). Os compostos referentes aos índices de retenção de 15,77, 16,42 e 19,12 também foram majoritários (3,84 – 4,8%), (3,91 – 5,89%), (6,67 – 9,94%) respectivamente, porém não foi possível a identificação exata destas substâncias.

Como na literatura disponível, as informações sobre a composição de extratos ESC de folhas de *Vernonia amygdalina Delile* são escassas, não foi possível a comparação e identificação dos compostos obtidos neste trabalho. No entanto, há trabalhos que relataram a presença de compostos obtidos por processos convencionais. No trabalho de Atangwho et al. (2013), os constituintes listados na Tabela 10 foram obtidos da extração das folhas de

Vernonia amygdalina Delile a partir do solvente orgânico clorofórmio, e Erasto et al. (2007) identificaram estes fitoconstituintes nos extratos de *Vernonia amygdalina Delile* obtidos com hexano/ isopropanol (3:1).

As amostras de extrato obtidos através da extração Soxhlet (usando hexano, diclorometano e etanol) foram caracterizadas em termos de sua composição (% área) apresentados na Tabela 11. Os principais compostos detectados foram: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido linoléico (C18:2n-6), ácido α -linolênico (C18:3n-3) e o fitol, para os extratos hexânicos e diclorometânicos. Já o extrato etanólico, os fitocompostos são: ácido fosfórico, inositol e α -D-glucopiranose.

Tabela 11. Composição dos extratos (% em área) obtidos com os solventes hexano, diclorometano e etanol.

Composto	TR (min)	Hexano	Diclorometano	Etanol
Ácido 2-Butenóico	3,728	-	-	0,25
Ácido Fosfórico	6,782	-	-	2,08
Ácido Butanedióico	7,070	-	-	0,45
L-prolina	6,984	-	-	0,77
Ácido Propanóico	7,207	-	-	0,23
Inositol	10,991	-	-	5,73
Ácido Hexadecanóico^a	11,358	20,00	11,97	-
Ácido 2-Propenoíco	11,840	-	-	0,71
Fitol	11,962	3,58	2,52	-
9,12-Octadecadienóico^b	12,162	14,14	13,83	2,59
Ácido α-linolênico	12,208	18,09	13,85	-
Ácido Octadecanóico^c	12,265	3,37	4,28	-
α-D-glucopiranose	14,518	-	-	10,44

TR (Tempo de Retenção em min)

Ácido Palmítico^a

Ácido Linoléico^b

Ácido Esteárico^c

A análise da Tabela 10 e dos cromatogramas (Apêndice B - Figuras B.1 a B.6) dos extratos obtidos em condições supercríticas e via uso de solventes orgânicos (Tabela 11; Apêndice B – Figuras B.7 a B.9), mostrou que os constituintes fitoquímicos identificados em

todas as condições operacionais nas condições supercríticas foram idênticos, porém o percentual da área de composição aumentou à medida que se elevou a pressão do sistema. Os cromatogramas dos extratos obtidos com o uso de solventes orgânicos hexano e diclorometano mostraram-se semelhantes aos obtidos com o uso de solvente supercrítico. O extrato etanólico apresentou compostos bioativos distintos e maior diversidade em relação aos demais solventes utilizados. Embora o extrato etanólico tenha promovido maior solubilização do extrato, este não se mostrou seletivo para nenhum composto, quando comparadas às amostras obtidas com o CO₂ isolado.

Segundo Erasto et al. (2007), a presença de ácidos graxos essenciais nas folhas de *Vernonia amygdalina Delile* demonstra sua importância para consumo humano. O papel desempenhado por esta planta na saúde humana é enorme, especialmente a sua utilização no tratamento de diabetes. Os ácidos linoléico e α-linolênico têm melhorado a secreção de insulina em pacientes diabéticos e também contribuiu para combater doenças associadas a ela, tais como retinopatia e outras complicações.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Em complementação ao estudo do processo de extração supercrítica, os extratos também foram caracterizados quantitativamente com relação à presença de flavonóides e fenólicos totais e a atividade antioxidante utilizando os métodos DPPH[•] e fenólicos totais.

Os antioxidantes podem ser importantes para a prevenção ou no prolongamento do tempo para adquirir doenças (CHEN et al., 2013), como o estresse oxidativo responsável por uma variedade de doenças incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson, envelhecimento, câncer, desordens neuronais, e doenças cardiovasculares. A eficácia da capacidade antioxidante dos componentes bioativos depende de sua estrutura química, da concentração destes fitoquímicos na matéria-prima e do meio no qual encontram-se.

4.3.1 Método de redução do DPPH[•]

A atividade antioxidante dos extratos obtidos com o uso de solventes orgânicos e CO₂ supercrítico foi determinada pelo método DPPH[•]. O método DPPH[•] está associado à habilidade dos compostos presentes no extrato de *Vernonia amygdalina Delile* por ESC e Soxhlet de doar íons de hidrogênio ou elétrons. A capacidade ou a atividade de atuar como um antioxidante é visível quando há descoloração das soluções preparadas. Os resultados

foram comparados com o composto de referência, a rutina, pois ela apresenta alta atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•], conforme a Tabela 12. O CE₅₀, é a concentração eficiente de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH[•] em 50%, e foi determinado a partir da equação da reta gerada do gráfico da % A.A em função das concentrações da amostra ($\mu\text{g/mL}$). Quanto maior o consumo de DPPH[•] por uma amostra, menor será a sua CE₅₀. Portanto, valores baixos de CE₅₀ representam alta atividade antioxidante.

A análise estatística ANOVA foi aplicada ao nível de 5% de significância, para identificar os métodos de extração com as melhores respostas e se há diferença significativa entre as respostas.

Tabela 12. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *Vernonia amygdalina Del.* usando o método DPPH.

Experimento	Extratos	CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)*
Soxhlet		
1	Hexano	1091,44 ± 0,11
2	Diclorometano	381,93 ± 0,14
3	Etanol	31,84 ± 0,08
Supercrítico		
4	60 °C/ 150 bar	937,88 ± 0,16
5	40 °C/ 200 bar	929,70 ± 0,12
6	50 °C/ 200 bar	916,53 ± 0,15
7	60 °C/ 200 bar	920,13 ± 0,11
8	40 °C/ 250 bar	622,62 ± 0,18
9	50 °C/ 250 bar	649,99 ± 0,15
10	60 °C/ 250 bar	814,30 ± 0,12
Padrão		
	Rutina	4,24 ± 0,07

De acordo com Garmus et al. (2015), os extratos podem ser classificados em 4 grupos de acordo com o seu valor de CE₅₀, como se segue: (1) extratos muito ativos com CE₅₀ < 50 $\mu\text{g/mL}$; (2) extratos moderadamente ativos com CE₅₀ entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$; (3)

extratos ligeiramente ativos com CE₅₀ entre 100 e 200 µg/mL; e (4) extratos inativos com CE₅₀> 200 µg/mL. Os melhores valores de CE₅₀ foram obtidos para os extratos com solventes orgânicos polares (diclorometano e etanol). Esses dados indicam que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante presentes nas folhas de V.A possuem mais afinidade por solventes polares. Em seguida, foram apresentados os resultados dos extratos supercríticos e por fim o extrato hexânico. Porém, o único extrato que enquadra na classificação em atividade relacionando o CE₅₀ é o etanólico, no grupo de extratos muito ativos, os demais o CE₅₀ é superior a 200 µg/mL.

Os baixos valores de atividade antioxidante por esse método de análise podem ser causados por alguns fatores, como: inexistência de substâncias doadoras de hidrogênio ou elétrons nos extratos da planta; presença de uma vasta diversidade de compostos que interagem com o meio contendo radicais DPPH[•]. Além disso, a interação das substâncias entre si pode levar à doação de hidrogênio ou elétrons quando puras, tornando-as incapazes de fazê-lo quando compõem uma mistura complexa. Em sistemas complexos o estado de excitação das moléculas interfere diretamente na atividade antioxidante, pois a presença de compostos de alta massa molecular e forma estrutural complexa, como no caso dos triterpenos e sesquiterpenos podem apresentar dificuldade de reagir com o radical DPPH[•] devido ao impedimento estérico que este apresenta e que lhe confere uma alta estabilidade (ITO et al., 2002).

Os extratos obtidos por solventes polares (diclorometano e etanol) apresentaram maior potencial antioxidante, analisando o CE₅₀ das amostras na Tabela 12. Portanto, estes extratos exibem inúmeras moléculas fenólicas (MENSOR et al., 2001). Este efeito se confirmou nos extratos por Soxhlet das folhas secas de V.A, principalmente para o solvente polar prótico (etanol), como pode-se observar na Tabela 12. O hexano apresentou o maior valor de CE₅₀, assim o seu extrato exibe menor potencial antioxidante. Para os extratos obtidos com solventes orgânicos já era esperada a diferença em termos de atividade antioxidante, visto que extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades apresentam uma composição distinta, e consequentemente uma atividade antioxidante bem diferente.

Os extratos ESC foram obtidos a diferentes condições de pressão e temperatura. Estes parâmetros influenciam na densidade do CO₂ e no processo devido à transferência de massa entre o soluto e o solvente. A variação da pressão de 200 bar para 250 bar apresentou um efeito acentuado sobre os valores de CE₅₀, conforme Tabela 12 em que o aumento da pressão mantendo a temperatura constante ocasionou a diminuição dos valores de CE₅₀. Porém, para a

variação de pressão de 150 a 200 bar este efeito não foi verificado. Estes resultados indicam que com o aumento da pressão, aumentou-se a concentração dos compostos extraídos com atividade antioxidante. Pode-se observar que a temperatura também mostrou efeito significativo nos ESC, pois ao aumentar a temperatura, mantendo a pressão constante, os resultados de CE₅₀ aumentaram, ou seja, ocorreu a diminuição da concentração dos componentes com potencial antioxidante.

Analizando a Tabela 12, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% (Apêndice C – Tabela C2), não houve diferença significativa entre as médias dos valores de CE₅₀ do grupo (1) compreendido com os experimentos 4, 5 e 6, entre o grupo (2) o qual engloba os ensaios 2, 7 e 8, e o experimento 9 em relação aos dois grupos. Porém, houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2 e o experimento 3 em relação a todos os outros experimentos.

A atividade antioxidante para extratos supercríticos de folhas de *Vernonia amygdalina Delile* não são reportadas em literatura. Silva et al. (2013) avaliaram o potencial antioxidante das folhas de *Vernonia condensata Baker* com extratos obtidos com solvente orgânico etanol. Após, o extrato etanólico foi suspenso em água: etanol (9:1) seguida por partição líquido/líquido com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Por fim, foram obtidos frações destes solventes. O extrato etanólico exibiu atividade antioxidante frente a ensaios com DPPH[•] onde o CE₅₀ determinado apresentou 35,44 µg/mL (desvio ± 0,76), a fração com hexano 147,14 µg/mL, diclorometano 51,69 µg/mL, acetato de etila 18,44 µg/mL, e butanol 48,45 µg/mL. Estes valores de CE₅₀ são inferiores aos dos extratos de *Vernonia amygdalina Delile* supercríticos, hexânico e diclorometânicos, e semelhante ao etanólico.

Mazzutti et al. (2012) averiguaram a atividade antioxidante, pelo método DPPH[•], de extratos do cogumelo *Agaricus brasiliensis*. O CE₅₀ para os extratos supercríticos, com CO₂ puro, foi 2.527 a 7.001 µg/mL, a 100, 200, 300 bar e 40, 50 e 60 °C. Os extratos obtidos via Soxhlet com os solventes hexano (2.647 µg/mL), diclorometano (1.632 µg/mL) e etanol (1.053 µg/mL). Assim, é possível afirmar que os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos valores dos extratos de *Vernonia amygdalina Delile*.

A curva de calibração foi preparada com rutina, 20% de acetato de etila e metanol, como solventes (Apêndice C – Figura C.1). O CE₅₀ do padrão rutina foi 4,24 µg/mL, valor semelhante ao CE₅₀, 4,8 µg/mL, da curva construída sem a presença do acetato de etila, portanto esse solvente não interfere no composto químico antioxidante.

4.3.2 Compostos fenólicos totais

Para determinação do teor de fenólicos totais dos extratos de *Vernonia amygdalina* Del., obtidos por extração supercrítica e Soxhlet, foi realizado o método de Folin-Ciocalteau, utilizando o ácido gálico como padrão de referência. O teor de fenóis para as extrações foi avaliado pelo reagente de Folin-Ciocalteu, o qual tem sido extensamente usado na determinação de diversos extratos. O reagente é constituído dos ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico. Estes sofrem redução na presença de compostos fenólicos de extratos formando colorações azuladas da solução devido à redução do estado de oxidação dos metais molibdênio e tungstênio. A quantidade total de fenóis nos extratos foi quantificada por meio de uma curva de calibração preparada através da reação entre o ácido gálico e o reagente de Folin-Ciocalteu como ilustra a Figura 22. O valor da concentração de fenóis totais do extrato etanólico foi estimado, pois a solução foi diluída 10 vezes em relação aos outros extratos.

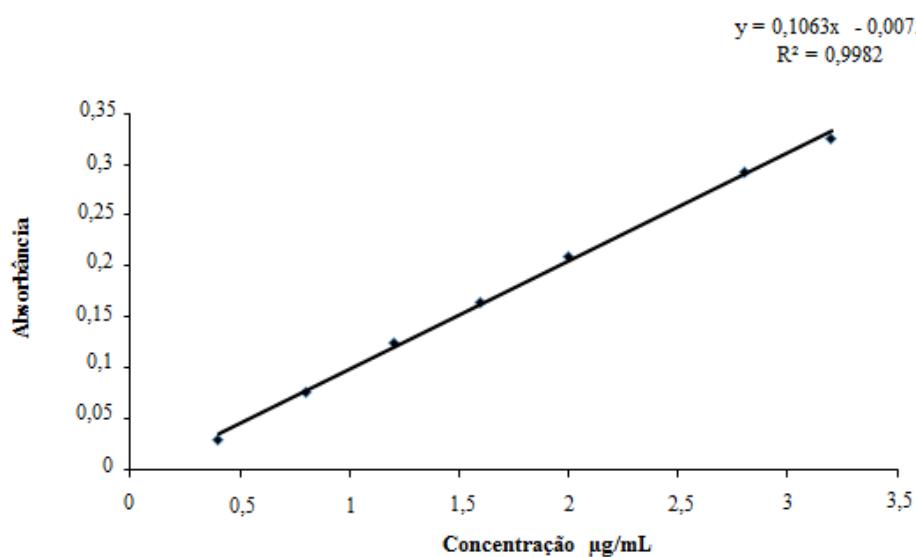


Figura 22. Curva padrão de ácido gálico

A Tabela 13 mostra os valores médios dos teores de compostos fenólicos expressos em gEAG/100g de extrato.

Tabela 13. Teores de compostos fenólicos dos extratos de folhas de *Vernonia amygdalina Delile* expressos em gEAG/ 100g de extrato.

Experimento	Extratos	Concentrações* (gEAG/ 100g de extrato)
Supercríticos		
1	T = 60 °C/P = 150 bar	6,91 ± 0,02
2	T = 50 °C/P = 200 bar	8,77 ± 0,19
3	T = 60 °C/P = 200 bar	8,57 ± 0,03
4	T = 40 °C/P = 250 bar	11,29 ± 0,02
5	T = 50 °C/P = 250 bar	10,13 ± 0,05
6	T = 60 °C/P = 250 bar	10,02 ± 0,05
Soxhlet		
7	Hexano	10,88 ± 0,03
8	Diclorometano	15,05 ± 0,02
9	Etanol	81,80 ± 0,02

A quantidade de compostos fenólicos obtida nos extratos por extração supercrítica apresentou um aumento, porém não significativo, com o efeito da temperatura e pressão. Com o aumento da pressão, mantendo a temperatura constante, a concentração dos extratos equivalentes a ácido gálico aumenta. Em contrapartida, aumentando a temperatura, a pressão constante, a concentração diminui. Os resultados das concentrações variaram de 6,89 a 11,29 (g ácido gálico/ 100 g de extrato). Assim, a condição, com fluido supercrítico, que favorece a extração de fenóis totais é a de 250 bar e 40 °C (11,29 g). No caso dos extratos obtidos por extração com solventes orgânicos, verifica-se que o etanol apresentou maior valor de compostos fenólicos (81,80 g), seguido do diclorometano e hexano.

Levando-se em consideração a análise estatística (Apêndice C – Tabela C4) dos dados apresentados na Tabela 13, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%, não houve diferença significativa entre as médias das concentrações de fenólicos totais do grupo (1) compreende os experimentos 2 e 3, entre o grupo (2) representado pelos ensaios 4, 5 e 6, e o experimento 6 com o 2. Entretanto, existe diferença significativa entre os grupos 1 e 2, exceto o experimento 6 e 2, e os experimentos 1, 8 e 9 em relação a todos os ensaios.

Como este trabalho de extração supercrítica de compostos bioativos das folhas de *Vernonia amygdalina Delile* é inédito, o objetivo principal foi averiguar os constituintes

fitoquímicos majoritários da planta a partir deste método. Na literatura mostra trabalhos com a extração de compostos da espécie com solventes polares e inúmeros componentes encontram-se em fase de pesquisa, não havendo assim, no mercado, padrões sintéticos para identificação. Foi possível identificar alguns componentes na espécie, e estes, apresentam importante poder medicinal. No entanto, não foi possível identificar vários componentes majoritários. E estes compostos podem estar associados a inúmeras atividades biológicas, pois muitas substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos. Os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas da espécie *Vernonia amygdalina Delile*. Os extratos podem ser interessantes para a avaliação de ensaios biológicos mais complexos, tais como toxicidade *in vitro* e testes em humanos em ensaios *in vivo*. Entretanto, mais estudos relacionados a etapas de isolamento, e caracterização dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante são necessários. Aplicações econômicas em áreas farmacêutica, cosméticas e nutricionais podem ser exploradas.

5 - CONCLUSÕES

As principais conclusões que se pode ter deste trabalho são:

- ✓ O rendimento global de extração de *Vernonia amygdalina Delile* obtido por fluido supercrítico variou de 0,78% a 1,48% para o tempo de pré-extracão de 30 min, já para 60 min foi de 0,71% a 1,39% de acordo com as condições de extração (pressão e temperatura). A condição de extração que favoreceu o maior rendimento para as folhas secas foi de 60 °C e 250,0 bar. No entanto, os rendimentos dos extratos obtidos com o uso de solventes orgânicos foram maiores quando comparados aos rendimentos apresentados pela ESC, variando de 10,4% a 31,8%;
- ✓ Para o sistema *Vernonia amygdalina Delile* + CO₂ foi possível determinar a pressão de inversão do rendimento global em torno de 200 bar;
- ✓ A cromatografia em camada delgada mostrou a presença de compostos antioxidantes, como flavonóides e fenólicos totais, porém em pequenas quantidades nos extratos supercríticos obtidos analisado nas condições de temperatura e pressão de 40 e 50 °C, 200 e 250 bar. No extrato etanólico foi confirmada a presença de bioativos antioxidantes;
- ✓ Os compostos majoritários da fração pesada (fração ESC) foram: ácido hexadecanóico ou ácido palmítico (10,02 – 19,01%), fitol (4,63 – 11,82%), ácido 9,12- octadecadienóico (9,84 - 20,49%), ácido α-linolênico (10,89 – 28,04%) e ácido octadecanóico (2,37 – 15,20%). Os compostos referentes aos índices de retenção de 15,77, 16,42 e 19,12 também foram majoritários (3,84 – 4,8%), (3,91 – 5,89%), (6,67 – 9,94%) respectivamente, porém não foi possível a identificação exata destes;
- ✓ Os resultados obtidos indicam que a *Vernonia amygdalina Delile* apresentou fraca atividade antioxidante comparada à atividade do composto de referência (rutina). Todavia, a atividade antioxidante dos extratos de *Vernonia amygdalina Delile* obtidos com o solvente orgânico etanol é promissora fonte de substâncias com alto poder inibidor dos danos causados por radicais livres, de acordo com o método de redução de DPPH•.

Conclui-se que a extração supercrítica de compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* ofereceu resultados satisfatórios de rendimento global de extrato. Além disso, a extração com fluido supercrítico apresenta vários atrativos para o processamento de produtos de ocorrência natural, como o controle da seletividade do processo pela escolha apropriada do solvente. Utilizando, principalmente, o CO₂ como solvente, em virtude das inúmeras vantagens, tais como não deixa resíduos no extrato, não reativo, não tóxico, dentre outras. Assim, é um método promissor para a obtenção de extratos ricos em compostos bioativos, com grande potencial para uso medicinal. Após extração em condições supercríticas, foi possível identificar alguns componentes na espécie como: o ácido palmítico, é um agente antimicrobiano potencialmente poderoso; fitol, possui importantes efeitos biológicos, como atividade termogênica em mamíferos; ácido 9,12-octadecadienóico, pertence a família ω-6; ácido α-linolênico, pertence a família dos ácidos graxos poliinsaturados (ω-3) e ácido octadecanóico. No entanto, não foi possível identificar vários componentes que apresentaram composições elevadas, em relação ao percentual em área, pois inúmeros componentes que estão presentes nas folhas da espécie encontram-se em fase de pesquisa. Os extratos podem ser interessantes para a avaliação de ensaios biológicos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo da extração supercrítica das folhas de *Vernonia amygdalina Delile*, as principais sugestões para trabalhos futuros são:

- ✓ Adicionar co-solventes, pois eles podem modificar as propriedades da mistura e as interações entre o soluto e a matriz sólida, especialmente os que possuem grupos polares, metanol ou etanol;
- ✓ Avaliar as mudanças estruturais antes e depois da extração supercrítica através da análise da área específica da matriz sólida pela técnica de BET;
- ✓ Realizar a identificação e quantificação dos constituintes fitoquímicos majoritários;
- ✓ Fazer equilíbrio de fase de um extrato para verificar a ocorrência;

- ✓ Fazer análises das atividades microbiológicas *in vitro* e *in vivo* e testes de citotoxicidade dos extratos;

- ✓ Análise de viabilidade econômica.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEDAPO, A. A., AREMU, O. J., OYAGBEMI, A. A. Anti-oxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of the acetone leaf extract of *Vernonia Amygdalina* in some laboratory animals. **Adv. Pharm. Bull.**, 4, pp. 591-598, 2014.
- ADEMOLA, I. O. and ELOFF, J. N. Anthelmintic activity of acetone extract and fractions of *Vernonia amygdalina* against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Trop. Anim. Health Prod.**, 43, pp. 521–527, 2011.
- ADESANOYE, O. A., MOLEHIN, O. R., DELIMA, A. A., ADEFEGHA, A. S., FAROMBI, E. O. Modulatory effect of methanolic extract of *Vernonia amygdalina* (MEVA) on tert-butyl hydroperoxide-induced erythrocyte haemolysis. **Cell Biochem. Funct.**, 31, pp. 545–550, 2013.
- ANGUS, S.; DEREUCK, K. M.; ARMSTRONG, B. International thermodynamic tables of the fluid-state: Carbon Dioxide. New York: Pergamon Press, 1976.
- ATANGWHO, I. J., EGBUNG, G. E., AHMAD, M., YAM, M. F., ASMAW, M. Z. Antioxidant versus anti-diabetic properties of leaves from *Vernonia amygdalina* Del. growing in Malaysia. **Food Chemistry**, 141, pp. 3428–3434, 2013.
- AWE, S.O., MAKINDE, J.M., OLAJIDE, O.A. Cathartic effect of the leaf extract of *Vernonia amygdalina*. **Fitoterapia**, 70, pp. 161-165, 1999.
- AZEVEDO, A. B. A., MAZZAFERA, P., MOHAMED, R. S., VIEIRA DE MELO, S. A. B., KIECKBUSCH, T. G. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Brazilian J. of Chem. Eng.**, v.25, pp. 543-552, 2008.
- BARTLETT, P. N., COOK, D. A., GEORGE, M. W., HECTOR, A. L., KE, J., LEVASON, W., REID,G., SMITH,D. C., ZHANG, W. Electrodeposition from supercritical fluids. **Physical Chemistry Chem. Physics**, 20, vol. 16, pp. 9185–9668, 2014.
- BASSALO, J. M. F. Nascimento da Física. **Rev. Bras. de Ensino de Física**, 20, 1, pp. 56-74, 1998.
- BORGES, M. C., SANTOS, F. M. M., TELLES, R. W., CORREIA, M. I. T. D., LANNA, C. C. D. Ácidos graxos poli-insaturados ω-3 e lúpus eritematoso sistêmico: o que sabemos - Artigo de revisão. **Rev. Bras. Reumatol.**, 54, 6, pp. 459–466, 2014.
- BOZAN, B. and TEMELLI, F. Supercritical CO₂ Extraction of Flaxseed. **JAOCS**, 79, 3, pp. 231–235, 2002.
- BRAND-WILLIANS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm-Wiss. u. -Technol.**, 28, n. 1, pp. 25-30, 1995.

BRUNNER, G. Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the applications to separation processes. 1^a. ed. Darmstadt. Alemanha: Steinkopff, 4, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **J. of Food Eng.**, 67, 1-2, pp. 21–33, 2005.

CALVO, M.I., CAVERO, R.Y. Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Official sources. **J. of Ethnopharmacology**, 157, pp. 268–273, 2014.

CAPUZZO, A., MAFFEI M. E., OCCHIPINTI, A. Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. **Molecules**, 18, pp. 7194-7238, 2013.

CARDOZO-FILHO L. Modelagem da extração supercrítica de óleos essenciais. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, 1999.

CHEN, Z., BERTIN, R., FROLIDI, G. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chem.**, 138, pp. 414 – 420, 2013.

COSTA, F. J., BANDEIRA, P. N., ALBUQUERQUE, M. R. J. R., PESSOA, O. D. L., SILVEIRA, E. R., BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Vernonia chalybaea mart.* **Quím. Nova**, 31, 7, 2008.

DUBA, K. S., FIORI, L. Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. **J. of Supercritical Fluids**, 98, pp. 33–43, 2015.

DUNFORD, N. T., ZHANG, M. Q. Pressurized solvent extraction of wheat germ oil. **Food Res. International**, 36, 9-10, pp. 905-909, 2003.

ERASTO P., GRIERSON, D. S., AFOLAYAN, A. J. Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of *Vernonia amygdalina* growing in South Africa. **Food Chem.**, 104, pp. 636–642, 2007.

ERASTO, P., GRIERSON, D. S., AFOLAYAN, A. J. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **J. of Ethnopharmacology**, 106, pp. 117–120, 2006.

FAN, J., ZHU, W., KANG, H., MA, H., TAO, G. Flavonoid constituents and antioxidant capacity in flowers of different Zhongyuan tree penoy cultivars. **J. of functional foods**, 4, pp. 147 – 157, 2012.

FIORI, L., LAVELLI, V., DUBAA, K. S., HARSHA, P. S. C. S., MOHAMED, H. B., GUELLA, G. Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. **J. of Supercritical Fluids**, 94, pp. 71–80, 2014.

FOROOOGHI, P. and HOOMAN, K. Experimental analysis of heat transfer of supercritical fluids in plate heat exchangers. **International J. of Heat and Mass Transfer**, 74, pp. 448–459, 2014.

GARMUS, T. T., PAVIANI, L. C., QUEIROGA, C. L., CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **J. of Supercritical Fluids**, 99, pp. 68–75, 2015.

GHOREISHI, S. M., ANSARI, K., Ghaziaskar, H. S. Supercritical extraction of toxic heavy metals from aqueous waste via Cyanex 301 as chelating agent. **J. of Supercritical Fluids**, 72, pp. 288–297, 2012.

GONZALEZ, M., GONZALEZ, V. Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 1842–1866, 2010.

HAYTA, S., POLAT, R., SELVI, S. Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey). **J. of Ethnopharmacology**, 154, pp. 613–623, 2014.

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

HEZAVE, A., MOWLA, A., ESMAEILZADEH, F. Cetirizine solubility in supercritical CO₂ at different pressures and temperatures. **J. of Supercritical Fluids**, 58, pp. 198–203, 2011.

HÜBSCH, Z., VAN ZYL, R. L., COCK, I. E., VAN VUREN, S. F. Interactive antimicrobial and toxicity profiles of conventional antimicrobials with Southern African medicinal plants. **South African J. of Botan.**, 93, pp. 185–197, 2014.

IGILE G. O., OLESZEK W., JURZYSTA M., BURDA S., FANFUNSO M., FASANMADE A. A. Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. **J. Agric. Food Chem.**, 42, pp. 2445–2448, 1994.

IJEH, I. I., EJIKE, C. E. C. Current perspectives on the medicinal potentials of *Vernonia amygdalina* Del. **J. of Medicinal Plants Research**, 5, 7, pp. 1051–1061, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: IMESP, pp. 118–119, 2004.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL-FILHO, V.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*: structure elucidation of seven new xanthones and their cancer chemopreventive activity. **J. Nat. Prod., Downers Grove**, 65, 3, pp. 267–272, 2002.

JOCHMANN, A. Extração Supercrítica de oleoresina de calêndula (*Calendula officinalis*). 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

JOKIĆ, S., SVILOVIĆ, S., ZEKOVIĆ, Z., VIDOVIC, S., VELIC, D. Solubility and kinetics of soybean oil and fatty acids in supercritical CO₂. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 113, pp. 644–651, 2011.

JOKIĆ, S., VIDOVIĆ, S., ZEKOVIĆ, Z., KUZMANOVIĆ, S. P., JEVRIĆ, L., MARIĆ, B. Chemometric analysis of tocopherols content in soybean oil obtained by supercritical CO₂. **J. of Supercritical Fluids**, 72, pp. 305–311, 2012a.

JOKIĆ, S., NAGY, B., ZEKOVIĆ, Z., VIDOVIĆ, S., BILIC, M., VELIC, D., SIMÁNDI, B. Effects of supercritical CO₂ extraction parameters on soybean oil yield. **Food and bioproducts processing**, 90, pp. 693–699, 2012b.

KOSHIMIZU, K., OHIGASHI, H., HUFFMAN, M. A. Use of *Vernonia amygdalina* by wild chimpanzee: Possible roles of its bitter and related constituents. **Physiology & Behavior**, 56, 6, pp. 1209-1216, 1994.

LEMOS, C. O. T., GARCIA, V. A. S., GONÇALVES, R. M., LEAL, I. C. R., SIQUEIRA, V. L. D., CARDOZO-FILHO, L., CABRAL, V. F. Supercritical extraction of neolignans from *Piper regnelli* var. *pallescens*. **J. of Supercritical Fluids**, 71, pp. 64–70, 2012.

LÉVAI, G., MARTÍN, Á., PAZ, E., RODRÍGUEZ-ROJO, S., COCERO, M. J. Production of stabilized quercetin aqueous suspensions by supercritical fluid extraction of emulsions. **J. of Supercritical Fluids**, 100, pp. 34 - 45, 2015.

LIN, Chih-Hsiung, LIN, Hsin-Wei, WU, Jau-Yann, HOUNG, Jer-Yiing, WAN, Hou-Peng, YANG, Tzu-Yueh, LIANG, Ming-Tsai. Extraction of lignans from the seed of *Schisandra chinensis* by supercritical fluid extraction and subsequent separation by supercritical fluid simulated moving bed. **J. of Supercritical Fluids**, 98, pp. 17–24, 2015.

MASABA, S. C. The antimalarial activity of *Venonia amygdalina* Del (Compositae). **Transactions of the royal society of trop. medicine and hygiene**, 94, pp. 694-695, 2000.

MASULLO, M., MONTORO, P., MARI, A., PIZZA, C., PIACENTE, S. Medicinal plants in the treatment of women's disorders: Analytical strategies to assure quality, safety and efficacy. **J. of Pharm. and Biomed. Analysis**, 2015.

MAZZUTTI, S., FERREIRA, S. R. S., RIEHL, C. A. S., SMANIA JÚNIOR, A., SMANIA, F. A., MARTÍNEZ, J. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. **J. of Supercritical Fluids**, 70, pp. 48–56, 2012.

MCHUGH, M. A; KRUKONIS, V. J. Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice. Boston. Butterworths. Boston. USA. 1986.

MEDA, A., LAMIEN, C. E., ROMITO, M., MILLOGO, J., NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chem.**, 91, 3, pp. 571-577, 2005.

MEIRELES, M. A. A. Extracting bioactive compounds for food products. New York, CRC Press, 2009a.

MEIRELES, M. A. A. Extraction and purification of bioactive compounds. In: Meireles, M. A. A. (Ed.). Extraction bioactive compounds for food products: Theory and applications. Boca Raton: CRC Press, pp. 1-8, 2009b.

MELO, L. V., SAWAYA, A. C. H. F. UHPLC-MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). **Rev. Bras. de Farmacognosia**, 25, pp. 105–110, 2015.

MELO, M. M. R., SILVESTRE, A. J. D., SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology – a review. **J. of Supercritical Fluids**, 92, pp. 115-176, 2014.

MENSOR, L. L., MENEZES, F. S., LEITÃO, G. G., REIS, A. S., SANTOS, T. C., COUBE, C. S., LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of dpph free radical method. **Phytother. Res.** 15, pp. 127–130, 2001.

MICHAEL, U. A., DAVID, B. U., THEOPHINE, C. O., PHILIP, F. U., OGOCHEUKWU, A. M., BENSON, V. A. Antidiabetic effect of combined aqueous leaf extract of *Vernonia amygdalina* and metformin in rats. **J. Basic. Clin. Pharm.**, 1, 3, pp. 197–202, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monografia da espécie *Vernonia condensata* (“boldo-baiano”). 139 p., 2014. Disponível em:
http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:nA5Q9RfqDkgJ:200.214.130.94/consultapublica/display/dsp_download_arquivo.php%3Farquivo%3D214+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br. Consultado em 17/04/2015.

MOHAMED, R. S. Extração e Fracionamento de Produtos de Ocorrência Natural Com Fluidos Supercriticos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 17, 4, 1997.

MONTEIRO, M. H. D., GOMES-CARNEIRO, M. R., FELZENSZWALB, I., CHAHoud, I., PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **J. of Ethnopharmacology**, 74, pp. 149–157, 2001.

MOORE, S.; SAMDANI, S; ONDREY, G.; PARKINSON, G. New roles for supercritical. **Chem. Eng.**, pp. 32-35, 1994.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas 1245 com dióxido de carbono. **Ciênc. agrotec.**, 32, 4, Lavras- July/Aug. 2008.

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. **J. of Supercritical Fluids**, 62, pp. 116-122, 2012.

NASEEM, B., SHAH, S.W.H., HASANC, A., SHAH, S.S. Interaction of flavonoids, the naturally occurring antioxidants with different media: A UV-visible spectroscopic study. **Spect. Acta Part A**, 75, pp. 1341–1346, 2010.

NGATU, N. R., OKAJIMA, M. K., YOKOGAWA, M., HIROTA, R., TAKAISHI, M., EITOKU, M., MUZEMBO, B. A., SABAH, A. B., SARUTA, T., MIYAMURA, M., KANEKO, T., SANO, S., SUGANUMA, N. anti-allergic effects of *Vernonia amygdalina* leaf extracts in hapten-induced atopic dermatitis-like disease in mice. **Allergology Int.**, 61, pp. 597-607, 2012.

NTIE-KANG, F., ONGUÉNÉ, P. A., LIFONGO, L. L., NDOM, J. C., SIPPL, W., MBAZE L. M. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids. **Malaria J.**, pp. 13-81, 2014.

PERRUT, M. Supercritical fluid applications: Industrial developments and economic issues. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 39, pp. 4531-4535, 2000.

POURMORTAZAVI, S. M. and HAJIMIRSADEGHI S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **J. of Chromatography A**, 1163, pp. 2–24, 2007.

RAMLUCKAN, K.; MOODLEY, K. G.; BUX, F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, 116, pp. 103–108, 2014.

RAVENTÓS, M., DUARTE, S., ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: An overview. **Food Sci. and Technology Int.**, 8, 5, pp. 269-284, 2002.

REBOLLEDA, S., RUBIO, N., BELTRÁN, S., SANZ, M. T., GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Supercritical fluid extraction of corn germ oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. **J. of Supercritical Fluids**, 72, pp. 270–277, 2012.

ROSA, P.T.V., PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H., MOURE, A., DÍAZ-REINOSO, B., SMITH JR., R.L., TOYOMIZU, M., FLORUSSE, L. J., PETERS, C. J., GOTO, M., LUCAS, S., MEIRELES, M. A. A. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: MEIRELES, M. A. A. (Ed.). Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications. Boca Raton: CRC Press, pp. 269-401, 2009.

SAHENA, F., ZAIDUL, I. S. M., JINAP, S., KARIM, A. A., ABBAS, K. A., NORULAINI, N. A. N., OMAR, A. K. M. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – a review. **J. of Eng.**, 95, pp. 240-253, 2009.

SALIU, J. A., ADEMILUYI, A.O., AKINYEMI, A. J., OBOH, G. In vitro antidiabetes and antihypertension properties of phenolic extracts from bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.). **J. of Food Biochem.**, pp. 1745-4514, 2011.

SCHLUTER, A., BARBERA, M. J., IGLESIAS, R., GIRALT, M., VILLAROYA, F. Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. **Biochem. J.**, 362, p.61-69, 2002.

SELVAMANGAI, G., BHASKAR, A. GC-MS analysis of phytocomponents in the methanolic extract of *Eupatorium triplinerve*. Asian Pacific **J. of Tropical Biomedicine**, pp. S1329-S1332, 2012.

SETIANTO, W. B., YOSHIKAWA, S., SMITH JR., R. L., INOMATA, H., FLORUSSE, L. J., PETERS, C. J. Pressure profile separation of phenolic liquid compounds from cashew (*Anacardium occidentale*) shell with supercritical carbon dioxide and aspects of its phase equilibria. **J. of Supercritical Fluids**, 48, pp. 203–210, 2009.

SIHVONEN, M., JÄRVENPÄÄ E., HIETANIEMI, V., HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. **Trends in Food Sci. & Technology**, 10, pp. 217-222, 1999.

SILVA, D. C. M. N. Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less). Florianópolis, 2004. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico (UFSC).

SILVA, I. C. M., SANTOS, W. L., LEAL, I. C. R., ZOGHBI, M. G. B., FEIRHMANN A. C., CABRAL, V. F., MACEDO, E. N., CARDozo-FILHO, L. Extraction of essential oil from *Cyperus articulatus* L. var. articulates (priprioca) with pressurized CO₂. **J. of Supercritical Fluids**, 88, pp. 134–141, 2014.

SILVA, J. B., TEMPONI, V. S., GASPERETTO, C. M., FABRI, R. L., ARAGÃO, D. M. O., PINTO, N. C. C., RIBEIRO, A., SCIO, E., DEL-VECHIO-VIEIRA, G., SOUSA, O. V., ALVES, M. S. Vernonia condensat Baker (Asteraceae): A promising source of antioxidants. **Oxidative Med. and Cell. Long.**, 9 p., 2013.

SMITH, R. M. Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future. **J. of Chromatography A**, 856, pp. 83-115, 1999.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-I. Modelling of extractioncurves. **Chem. Eng. Sci.**, 49, 3, pp. 409-414, 1994.

SOVOVÁ, H., KOMERS, R., KUČERA, J., JEŽ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil. **Chem. Eng. Sci.**, 49, 15, pp. 2499-2505, 1994.

STANGELAND, T., ALELE, P. E., KATUURA, E., LYEA, K. A. Plants used to treat malaria in Nyakayojo sub-county, western Uganda. **J. of Ethnopharmacology**, 137, pp. 154–166, 2011.

TAYLOR, L. T. Supercritical Fluid Extraction. New York: John Wiley & Sons Inc., 1996.

TELLO, J., VIGUERA, M., CALVO, L. Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. **J. of Supercritical Fluids**, 59, pp. 53–60, 2011.

TEMELLI, F. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils - a review. **J. of Supercritical Fluids**, 47, pp. 583–590, 2009.

TOYANG, N. J. and VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **J. of Ethnopharmacology**, 146, pp. 681–723, 2013.

URIBE, J. A. R., PEREZ, J. I. N., KAUIL, H. C., RUBIO, G. R., ALCOCER, C. G. Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO₂. **J. of Supercritical Fluids**, 56, pp. 174–178, 2011.

VELASCO, R. J., VILLADA, H. S., CARRERA, J. E. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. **Rev. Información Tecnológica**, 18, 1, pp. 53-66, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, 28, 3, 2005. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000300026. Consultado em 13/07/2015.

WAGNER, H., BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2. ed. Berlin: Springer, pp. 384, 1996.

WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKI, E. M. Plant Drug Analysis. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 1985.

YEN, Hong-Wei, YANG, Sheng-Chung, CHEN, Chi-Hui, JESISCA, CHANG, Jo-Shu. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. **Biores. Technology**, 184, pp. 291–296, 2015.

ZANON, R. B., PEREIRA, D. F., BOSCHETTI, T. K., SANTOS, M., ATHAYDE, M. L. Fitoconstituíntes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana Baker*. **Rev. Bras. de Farmacognosia**, 18, 2, pp. 226-229, 2008.

ZHAO, S., ZHANG, D. An experimental investigation into the solubility of *Moringa oleifera* oil in supercritical carbon dioxide. **J. of Food Eng.**, 138, pp. 1–10, 2014.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A

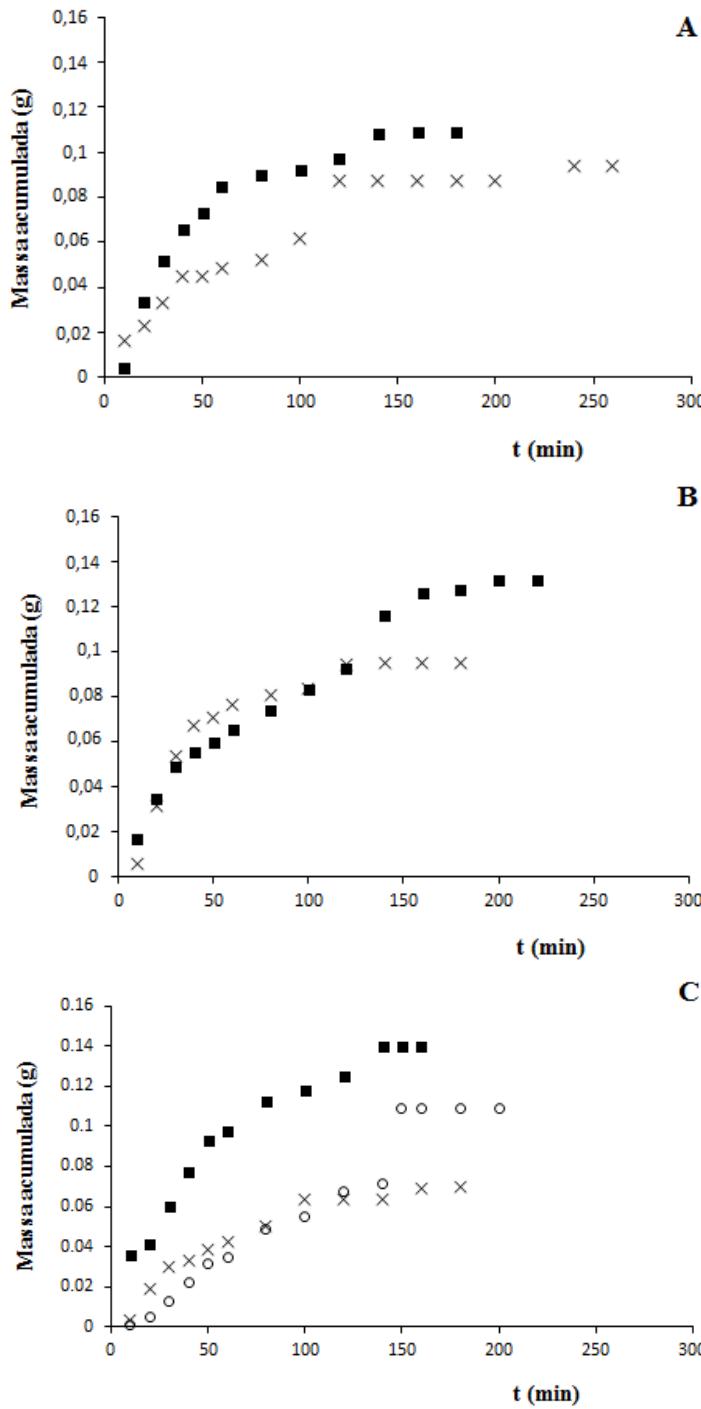


Figura A. Curva de extração em condições supercríticas para as folhas de *Vernonia amygdalina Del.* no tempo de pré-extração de 60 minutos em diferentes valores de temperaturas: (A) 40 °C; (B) 50 °C; (C) 60 °C. Os valores de pressão utilizados nas extrações foram: (o) P = 150 bar; (x) P= 200 bar; (■) P=250 bar.

APÊNDICE B

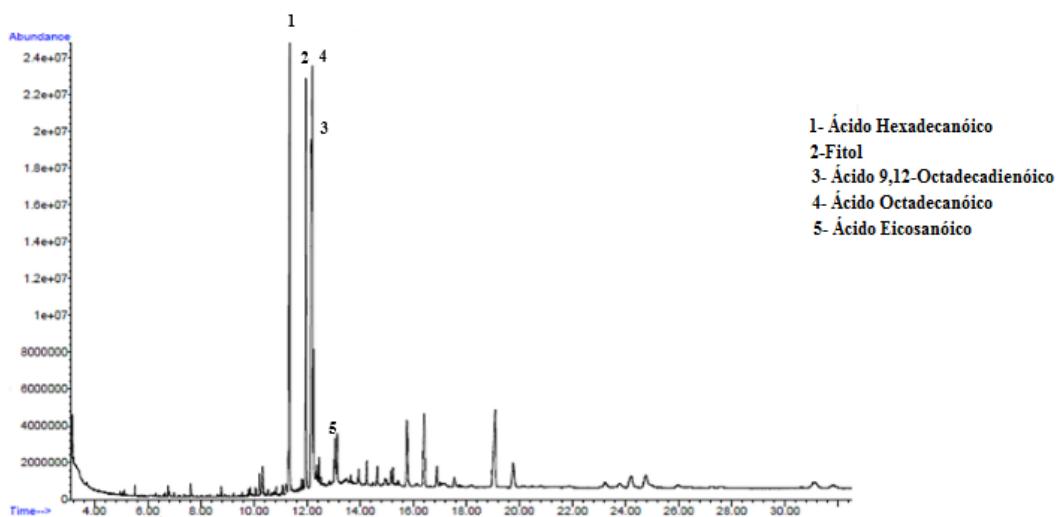


Figura B.1 Cromatogramas de massa dos compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* com fluido pressurizado a pressão de 150 bar e temperatura 60 °C.

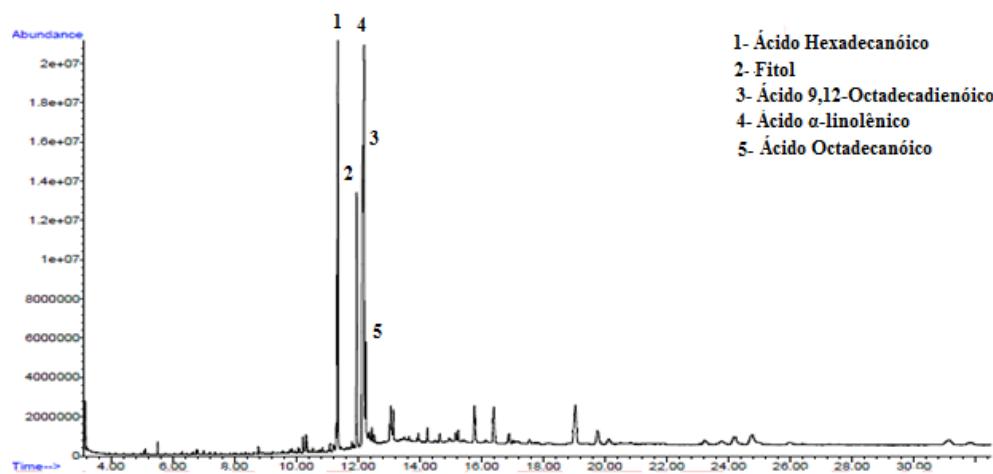


Figura B.2 Cromatogramas de massa dos compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* com fluido pressurizado a pressão de 200 bar e temperatura 50 °C.

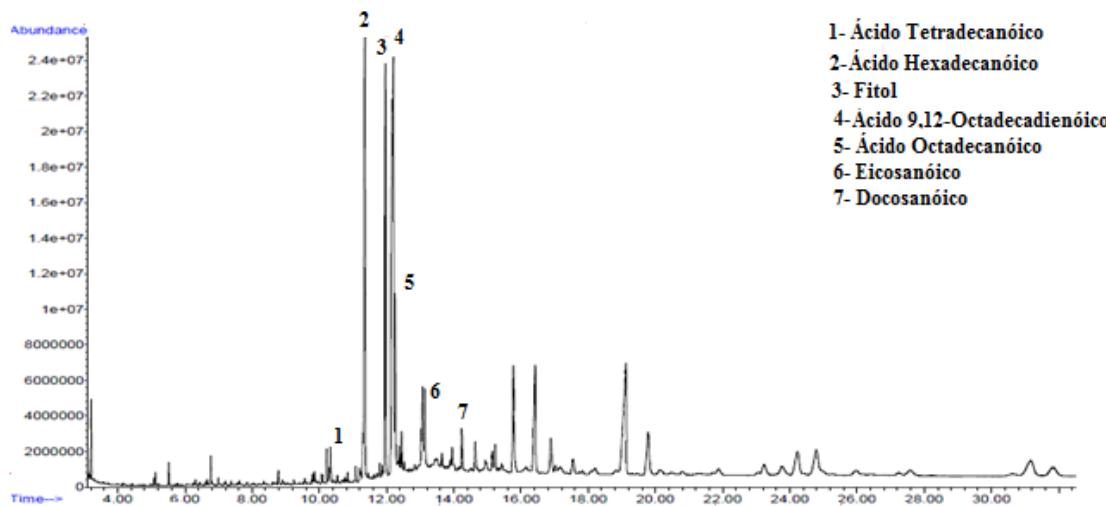


Figura B.3 Cromatogramas de massa dos compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* com fluido pressurizado a pressão de 200 bar e temperatura 60 °C.

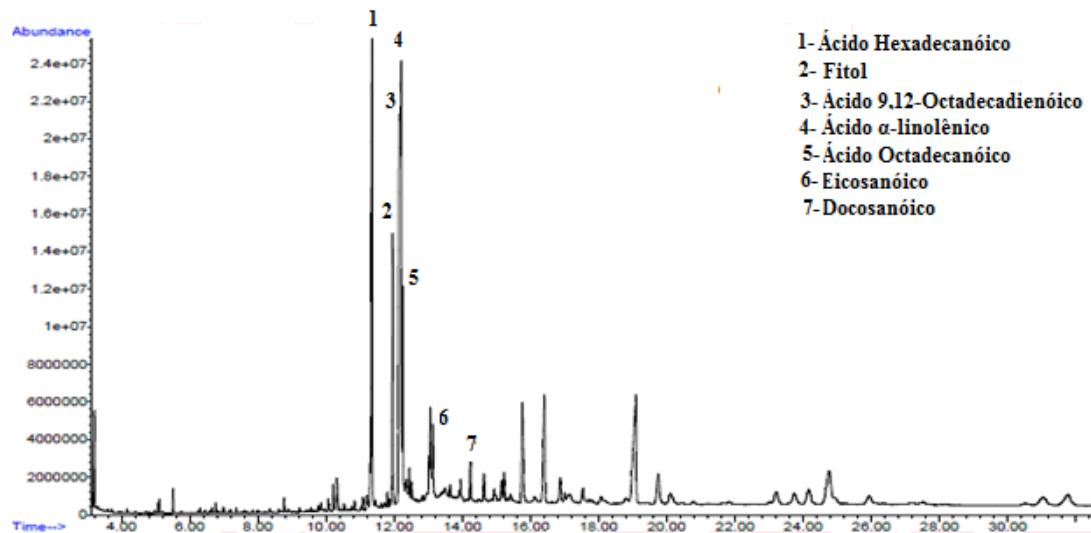


Figura B.4 Cromatogramas de massa dos compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* com fluido pressurizado a pressão de 250 bar e temperatura 40 °C.

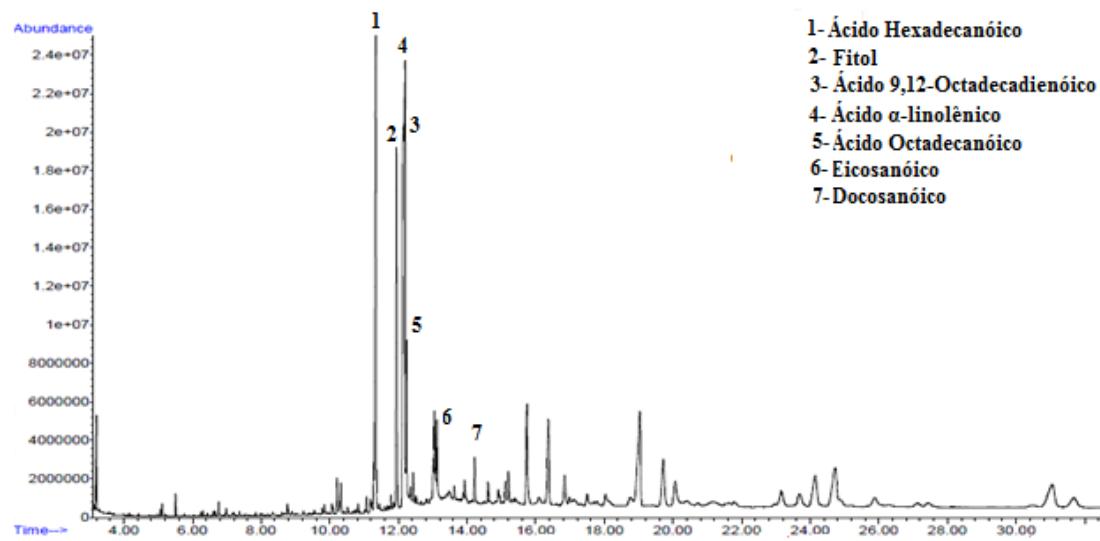


Figura B.5 Cromatogramas de massa dos compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* com fluido pressurizado a pressão de 250 bar e temperatura 50 °C.

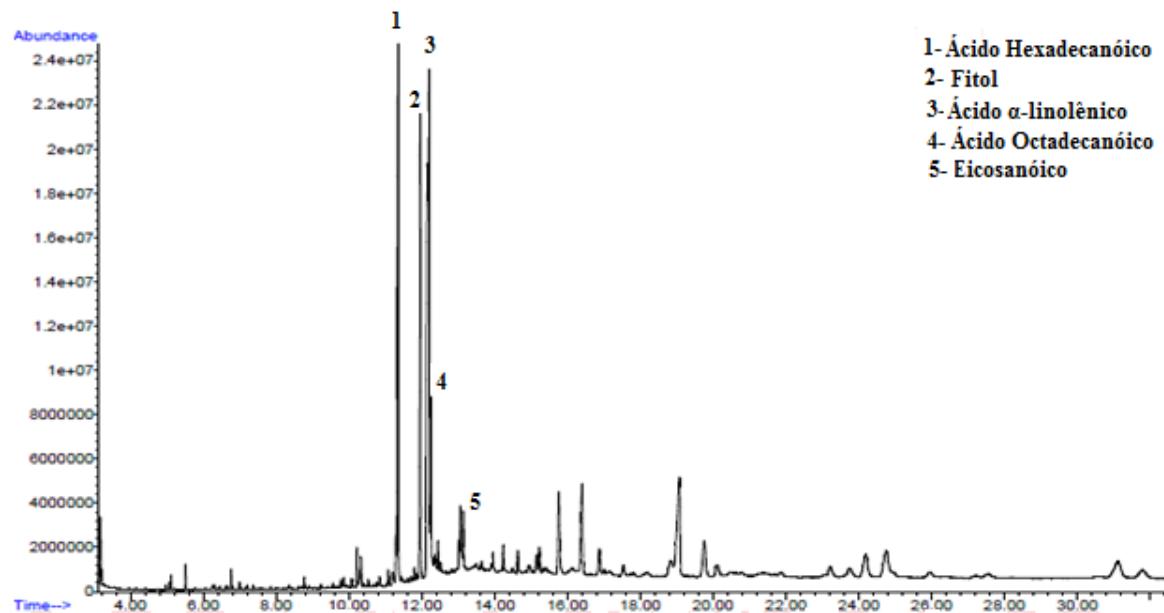


Figura B.6 Cromatogramas de massa dos compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* com fluido pressurizado a pressão de 250 bar e temperatura 60 °C.

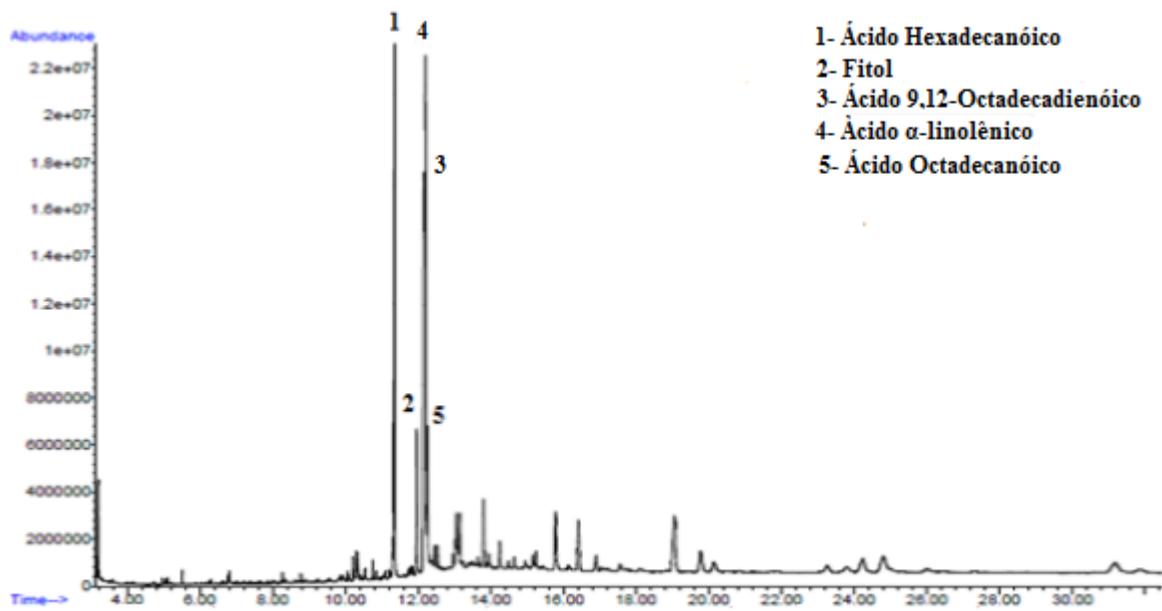


Figura B.7 Cromatogramas de massa dos compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* em condições subcríticas com o solvente orgânico hexano.

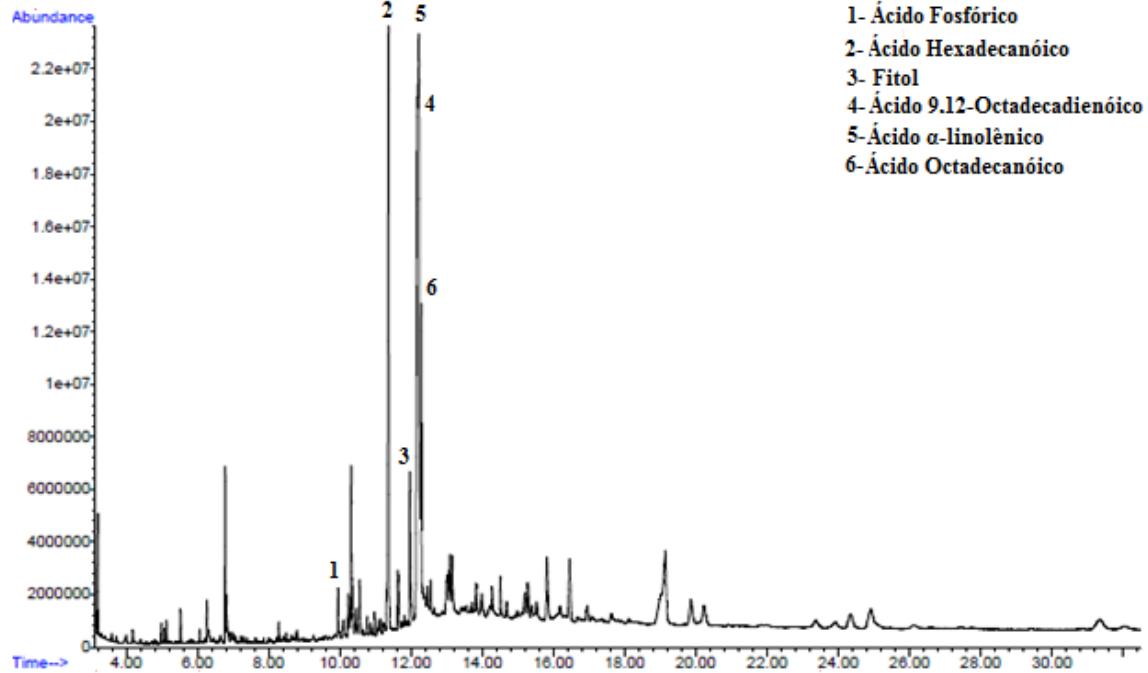


Figura B.8 Cromatogramas de massa dos compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* em condições subcríticas com o solvente orgânico diclorometano.

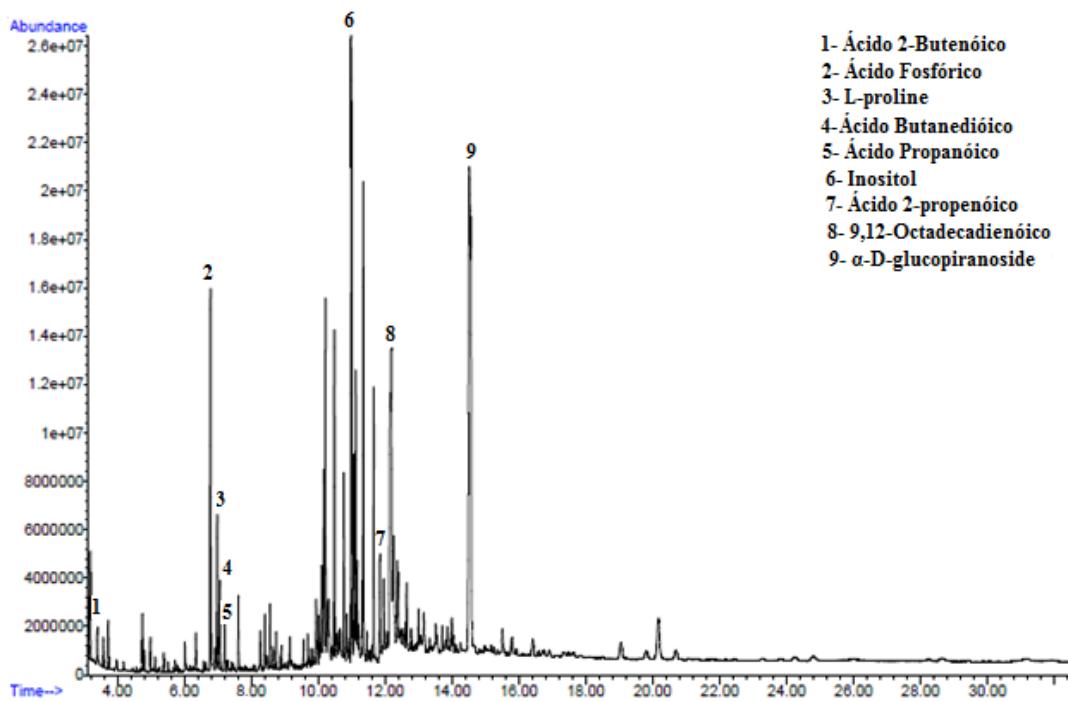


Figura B.9 Cromatogramas de massa dos compostos bioativos de *Vernonia amygdalina Delile* em condições subcríticas com o solvente orgânico etanol.

APÊNDICE C

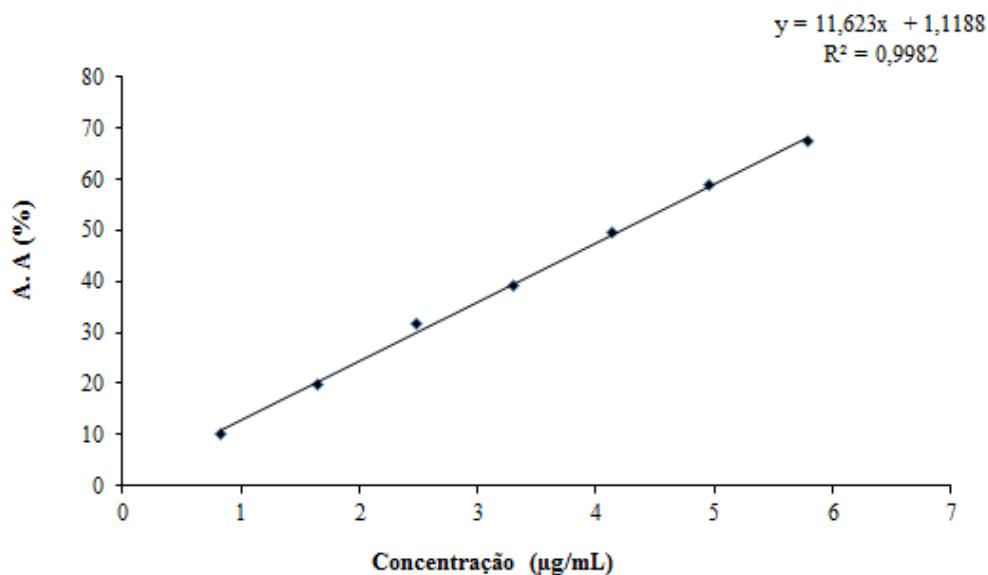


Figura C.1 Curva padrão da rutina

Tabela C1. Análise estatística aplicada para a atividade antioxidante no método DPPH•

Experimento	Grupos	Nº de análises	Soma	Média
1	150 bar/60 °C	2	1.875,759	937,8796
2	250 bar/40 °C	2	1.245,232	622,6159
3	200 bar/50 °C	2	1.833,056	916,5278
4	200 bar/60 °C	2	1.840,258	920,1289
5	250 bar/50 °C	2	1.299,999	649,9995
6	200 bar/40 °C	2	1.859,409	929,7047
7	250 bar/60 °C	2	1.628,609	814,3043
8	Hexano	2	2.182,889	1.091,445
9	Diclorometano	2	763,8522	381,9261
10	Etanol	2	63,6773	31,83865

ANOVA

Variação	SS	df	MS	F	P-valor	F-crit
Entre grupos	1836603	9	204067	53,12657	2,90344E-07	3,020383
Dentro do grupo	38411,49	10	3841,149			
Total	1875015	19				

Foi calculado o Δ a partir da fórmula :

$$\Delta = q * \sqrt{\frac{QMRes}{r}}$$

Sabendo que:

q: amplitude total *studentizado* (tabelado);

QMRes: quadrado médio dos resíduos;

r: número de repetições de análise de cada condição.

A Tabela C2 mostra a diferença entre os valores das médias do EC₅₀ do método DPPH. Os resultados superiores ao valor do Δ (em negrito), para $\Delta = 245,42$, indicam que são significativamente diferentes à 5% pelo teste de Tukey.

Tabela C2. Diferença entre os valores das médias dos CE₅₀.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	315,2638	21,352	17,7507	287,88	8,1749	123,5753	153,565	555,9535	906,041
2	315,2638	0	293,912	297,51	27,3836	307,089	191,688	468,829	240,6898	590,7772
3	21,3518	293,91195	0	3,6011	266,528	13,1769	102,2235	174,917	534,6017	884,6892
4	17,7507	297,51305	3,6011	0	270,129	9,5758	105,8246	171,316	538,2028	888,2903
5	287,8802	27,3836	266,528	270,13	0	279,705	164,305	441,445	268,0734	618,1608
6	8,1749	307,08885	13,177	9,5758	279,705	0	115,4004	161,74	547,7786	897,8661
7	123,5753	191,68841	102,224	105,82	164,305	115,4	0	277,14	432,3782	782,4656
8	153,5649	468,82865	174,92	171,316	441,445	161,74	277,1402	0	709,5184	1059,606
9	555,9535	240,6898	534,602	538,2	268,073	547,779	432,378	709,518	0	350,0875
10	906,041	590,7772	884,689	888,29	618,161	897,866	782,466	1059,61	350,087	0

Tabela C3. Análise estatística aplicada para a atividade antioxidante no método fenólicos totais.

<i>Grupos</i>	<i>Nº de análises</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>
150/60	2	13,82	6,91
250/40	2	17,53	8,765
200/50	2	17,14	8,57
250/50	2	22,58	11,29
200/60	2	20,26	10,13
250/60	2	20,03	10,015
Hexano	2	21,76	10,88
Diclorometano	2	30,1	15,05
Etanol	2	16,36	81,8

ANOVA

<i>Variação</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>
Entra Grupos	88,7677	8	11,09596	105,4415	5,55623E-08	3,229583
Dentro do Grupo	0,9471	9	0,105233			
Total	89,7148	17				

A Tabela C4 mostra a diferença entre os valores das médias concentrações (gEAG/100g de extrato). Os resultados superiores ao valor do Δ (em negrito), para $\Delta = 1,3166$ indicam que são significativamente diferentes à 5% pelo teste de Tukey.

Tabela C4. Diferença entre os valores das médias das concentrações (gEAG/100g de extrato).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0	1,855	1,66	4,38	3,22	3,105	3,97	8,14	74,89
2	1,855	0	0,195	2,525	1,365	1.25	2,115	6,285	73,035
3	1,66	0,195	0	2,72	1,56	1,445	2,31	6,48	73,23
4	4,38	2,525	2,72	0	1.16	1.275	0,41	3,76	70,51
5	3,22	1,365	1,56	1,16	0	0,115	0,75	4,92	71,67
6	3,105	1,25	1,445	1,275	0,115	0	0,865	5,035	71,785
7	3,97	2,115	2,31	0,41	0,75	0,865	0	4,17	70,92
8	8,14	6,285	6,48	3,76	4,92	5,035	4,17	0	66,75
9	74,89	73,035	73,23	70,51	71,67	71,785	70,92	66,75	0