

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
EXTRATOS DE *Hibiscus tiliaceus* L:
ESTUDO COMPARATIVO DE
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**

MARIA INÊS SOARES MELECCHI

Tese de Doutorado

PORTO ALEGRE

Outubro 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
EXTRATOS DE *Hibiscus tiliaceus* L:
ESTUDO COMPARATIVO DE
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**

MARIA INÊS SOARES MELECCHI

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFRGS como
parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química*

PORTO ALEGRE
Outubro de 2005

DECLARAÇÃO DE AUTORIA

Este trabalho foi realizado pela autora, orientado pela Prof^a Dra. Elina Bastos Caramão. Todo o trabalho foi desenvolvido no laboratório de pesquisa E-202 e central analítica, do Instituto de Química da UFRGS e nos laboratórios de Bioquímica e Biociências da UFRGS.

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final, pela orientadora e pela banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Elina Bastos Caramão

Banca Examinadora:

Profa Dra. Nilva Ré Poppi (UFMS/Campo Grande)

Profa. Dra. Rosana de Cássia de Souza Schneider (UNISC/Santa Cruz do Sul)

Prof. Dr. Pedro José Sanches Filho (CEFET/Pelotas)

Profa. Dra. Márcia Martinelli (IQ-UFRGS/Porto Alegre)

Prof. Dr. Adriano Lisboa Monteiro
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química

DEDICATÓRIA

Ao Fernando, que compartilhou comigo todos os momentos deste trabalho.

Aos meus filhos, Carolina e Felipe.

A ti Elina, professora, orientadora e amiga que acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elina Bastos Caramão, por seu comprometimento profissional, e orientação deste trabalho.

Aos professores Dra. Claudia Alcaraz Zini, Dra. Márcia Martinelli e Dr. Ricardo Baumhardt Neto pelo apoio e incentivo

Às professoras Dra. Ana Lúcia de Paula Ramos e Dra. Jenifer Saffi, pela colaboração e suporte técnico.

Aos professores Dr. José Vladimir e Dr. Cláudio Dariva, pela orientação da etapa desenvolvida em Erechim, na Universidade Regional Integrada.

Aos professores Dr. Carlos Alexandre Neto, do Departamento de Bioquímica da UFRGS e Dra. Ionara Rodrigues Siqueira, da UNIVATES – Lajeado, pelo suporte técnico.

Àos colegas, agora já doutores, Maria Regina Alves Rodrigues, Pedro José Sanches Filho, Irajá do Nascimento Filho, Eniz Conceição Oliveira, Maria Cecília Vaz de Campos, Rosângela Assis Jacques e Valéria Flores Péres, pelo carinho e amizade.

Aos queridos companheiros de jornada, Fernanda Contieri Abad, Lisiane dos Santos Freitas, Priscila Peterlevitz Zini, Laiza Canielas Krause, Rafael Dutra Soares e Carin von Mühlen, que com sua juventude, me davam forças para continuar na caminhada.

A todos os alunos de iniciação científica do laboratório E-202 da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela colaboração.

Ao amigo Carlos Alberto Gravina.

Aos colegas do Colégio Militar de Porto Alegre, pelo incentivo e apoio.

A todos os demais professores do Instituto de Química e a seus funcionários.

ÍNDICE GERAL

		pág.
	Índice Geral	v
	Índice de Tabelas	viii
	Índice de Figuras	xi
	Lista de Abreviaturas e Siglas	xiv
	Resumo	Xvii
	Abstract	xviii
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Objetivo geral e objetivos específicos	4
1.2	Novidade do trabalho	4
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	Gênero <i>Hibiscus</i>	5
2.1.1	Generalidades	5
2.1.2	Descrição botânica da espécie <i>H. tiliaceus</i> L.	6
2.1.3	<i>Hábitat</i> e distribuição geográfica da família <i>Malvacea</i> , da espécie <i>H. tiliaceus</i> L.	7
2.1.4	Composição química da espécie <i>H. tiliaceus</i> L.	8
2.2	Métodos de extração e caracterização de produtos naturais	11
2.2.1	Maceração	12
2.2.2	Extração com Soxhlet	13
2.2.3	Extração com ultra-som	13
2.2.4	Extração com fluido supercrítico (SFE)	15
2.2.4.1	Gás carbônico supercrítico	23
2.2.4.2	Princípios de extração com fluido supercrítico	24
2.2.4.3	Extração de sólidos com fluido supercrítico	25
2.2.4.4	Extração de líquidos com fluido supercrítico	25
2.2.4.5	Vantagens e desvantagens da extração com fluido supercrítico	26
2.2.4.6	Interação de solventes modificadores em soluções para fluido supercrítico	27
2.2.5	Extração com líquido pressurizado (PLE)	28
2.3	Métodos de caracterização dos extratos	35
2.3.1	Métodos cromatográficos	35
2.4	Planejamento e análise de experimentos	37
2.4.1	Planejamentos fatoriais	38
2.4.2	Metodologia de superfície de resposta	39
2.5	Atividade biológica	39
2.5.1	Uso na medicina tradicional	40
2.5.2	Atividade antioxidante	41
2.5.2.1	Potencial antioxidante total <i>in vitro</i> (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR)	43
2.5.2.2	Potencial antioxidante total <i>in vivo</i> : levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1	Solventes e reagentes	47
3.2	Coleta e processamento do material vegetal	47

	pág.	
3.3	Secagem, trituração e armazenamento do material vegetal	48
3.4	Determinação dos parâmetros de qualidade das flores	48
3.4.1	Determinação do conteúdo de umidade residual	48
3.4.2	Determinação de cinzas totais	48
3.5	Análise dos macro e micro nutrientes das flores de <i>H. tiliaceus</i> L.	49
3.6	Estudo fitoquímico	49
3.7	Estudo comparativo dos métodos de extração	52
3.7.1	Extração por maceração	52
3.7.2	Extração com Soxhlet	52
3.7.3	Extração por ultra-som	53
3.7.4	Extração com fluido supercrítico (SFE)	56
3.7.5	Extração com líquido pressurizado (PLE)	57
3.8	Fracionamento cromatográfico dos extratos metanólicos	60
3.8.1	Procedimento	60
3.8.2	Derivatização com metanol/BF ₃	61
3.9	Análise dos extratos pelo sistema acoplado cromatografia gasosa / espectrometria de massas (GC-MS)	62
3.10	ANÁLISE QUANTITATIVA	63
3.11	Avaliação do efeito antioxidante dos extratos	65
3.11.1	Determinação de TRAP E TAR	66
3.12	Avaliação mutagênica do extrato aquoso	67
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	69
4.1	1ª PARTE: CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS FLORES DE <i>H. tiliaceus</i> L.	70
4.2	2ª PARTE: OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	74
4.2.1	Extração por ultra-som	74
4.2.1.1	Estudo de alguns parâmetros que influem no processo de extração	74
4.2.1.2	Estudo analítico do extrato metanólico fracionado	82
4.2.1.2.1	Frações separadas com n-hexano	82
4.2.1.2.2	Frações separadas com n-hexano-benzeno	83
4.2.1.2.3	Frações separadas com diclorometano	85
4.2.1.2.4	Frações separadas com acetato de etila	86
4.2.1.2.5	Frações separadas com metanol	89
4.2.2	Extração com fluido supercrítico (SFE)	91
4.2.2.1	Estudo de alguns parâmetros que influem no processo de extração com fluido supercrítico	91
4.2.2.2	Estudo cromatográfico dos extratos obtidos no processo de extração com fluido supercrítico	98
4.2.3	Extração com líquido pressurizado (PLE)	107
4.2.3.1	Estudo de alguns parâmetros que influem no processo de PLE	107
4.2.3.2	Estudo cromatográfico dos extratos obtidos	119
4.3	3ª PARTE: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	129
4.3.1	Comparação entre os rendimentos percentuais em massa	129
4.3.2	Análise cromatográfica (GC-MS) dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração	132

	pág.
4.3.2.1 Extrato obtido com CO ₂ supercrítico	132
4.3.2.2 Extratos obtidos com n-hexano	134
4.3.2.3 Extratos obtidos com acetato de etila	138
4.3.2.4 Extratos obtidos com metanol	142
4.4 4ª PARTE: ESTUDO BIOQUÍMICO DA QUALIDADE DOS EXTRATOS: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA MUTAGENICIDADE	146
4.4.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos: Determinação de TAR e TRAP	146
4.4.2 Estudo toxicológico: avaliação da atividade genotóxica (Ensaio de Ames)	148
5 CONCLUSÕES	150
5.1 Conclusões gerais	150
5.2 Conclusões específicas	150
6 REFERÊNCIAS	154
7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	193
8 PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA NO PERÍODO	194
8.1 Resumos em anais de eventos	194
8.2 Artigos completos	197

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela I	14
Tabela II	17
Tabela III	18
Tabela IV	18
Tabela V	19
Tabela VI	20
Tabela VII	28
Tabela VIII	31
Tabela IX	33
Tabela X	34
Tabela XI	55
Tabela XII	55
Tabela XIII	57
Tabela XIV	58
Tabela XV	59
Tabela XVI	59
Tabela XVII	63
Tabela XVIII	64
Tabela XIX	70
Tabela XX	71
Tabela XXI	73
Tabela XXII	76
Tabela XXIII	78

		pág.
Tabela XXIV	Influência do tempo de extração sobre o rendimento em massa para a extração por ultra-som usando metanol como solvente extrator	80
Tabela XXV	Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com n-hexano a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração	83
Tabela XXVI	Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com hexano/benzeno a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração	84
Tabela XXVII	Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com diclorometano a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração	86
Tabela XXVIII	Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com acetato de etila a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração	87
Tabela XXIX	Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com acetato de etila, derivatizadas com BF ₃ em metanol a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração	88
Tabela XXX	Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com metanol, derivatizadas com BF ₃ em metanol a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração(*)	90
Tabela XXXI	Variação do rendimento das extrações de acordo com as condições experimentais para a extração supercrítica das flores de <i>H. tiliaceus</i> L.	95
Tabela XXXII	Identificação dos picos assinalados na Figura 4.12	98
Tabela XXXIII	Identificação dos picos assinalados na Figura 4.13	102
Tabela XXXIV	Identificação dos picos assinalados na Figura 4.14	102
Tabela XXXV	Cálculo dos fatores de resposta e da repetibilidade para a análise quantitativa dos extratos de SFE	104
Tabela XXXVI	Análise quantitativa dos extratos obtidos por extração supercrítica	105
Tabela XXXVII	Estudo da influência dos fatores que interferem no processo de extração por PLE estudados aplicando-se um modelo de experimento 2 ⁴⁻¹	110
Tabela XXXVIII	Estudo da influência dos fatores que interferem no processo de extração por PLE estudados aplicando-se um modelo de experimento 2 ³	114
Tabela XXXIX	Estudo da influência das variáveis aplicando-se um modelo de superfície de resposta - modelagem	116
Tabela XL	Estudo da influência das variáveis aplicando-se um modelo de superfície de resposta - deslocamento	117
Tabela XLI	Identificação dos picos assinalados na Figura 4.20	120
Tabela XLII	Cálculo dos fatores de resposta e da repetibilidade da análise quantitativa	121

		pág.
Tabela XLIII	Análise quantitativa dos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE), usando n-hexano nas condições otimizadas para cada planejamento experimental aplicado (2^{4-1} , 2^3 e superfície de resposta)	122
Tabela XLIV	Análise quantitativa dos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE), usando acetato de etila nas condições otimizadas para cada planejamento experimental aplicado (2^{4-1} , 2^3 e superfície de resposta)	123
Tabela XLV	Análise quantitativa dos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE), usando metanol nas condições otimizadas para cada planejamento experimental aplicado (2^{4-1} , 2^3 e superfície de resposta)	124
Tabela XLVI	Resultados do rendimento (% de massa) para os procedimentos de extração aplicados às flores de <i>H. tiliaceus</i> L.	130
Tabela XLVII	Identificação dos picos assinalados na Figura 4.25	133
Tabela XLVIII	Identificação dos picos assinalados nas Figuras 4.26 a 4.30	137
Tabela XLIX	Identificação dos picos assinalados nas Figuras 4.31 a 4.35	141
Tabela L	Identificação dos picos assinalados nas Figuras 4.36 a 4.40	145
Tabela LI	Valores de TAR e TRAP para os extratos estudados	147
Tabela LII	Resultados da aplicação do Teste de AMES ao extrato metanólico de <i>H. tiliaceus</i> L.	149

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 2.1	Fotografias da espécie <i>H. tiliaceus</i> L.: detalhes da flor (a) e do arbusto (b) 6
Figura 2.2	<i>Hábitat</i> brasileiro da espécie <i>H. tiliaceus</i> L. estudada 7
Figura 2.3	Estrutura química de alguns componentes isolados de <i>H. tiliaceus</i> L. na madeira, raízes, flores e frutos 9
Figura 2.4	Diagrama de fases do dióxido de carbono 22
Figura 2.5	Equipamento ASE®300 30
Figura 2.6	Esquema da extração por líquido pressurizado com solvente (PLE) 30
Figura 2.7	Gráfico da variação da quimiluminescência (Q_i) do ABAP com o tempo de indução (t_i) para a adição de Trolox 44
Figura 3.1	Esquema da extração sucessiva do material vegetal para a aplicação de técnicas no estudo fitoquímico 50
Figura 3.2	Esquema das análises realizadas no extrato etéreo 50
Figura 3.3	Esquema das análises realizadas no extrato alcoólico 51
Figura 3.4	Esquema das análises a serem realizadas no extrato aquoso 51
Figura 3.5	Esquema usado para a extração por ultra-som 53
Figura 3.6	Esquema representativo do sistema de extração a altas pressões utilizado 56
Figura 3.7	Esquema do fracionamento cromatográfico em sílica gel 61
Figura 3.8	Reação genérica de esterificação de um ácido orgânico 62
Figura 4.1	Comparação entre os valores obtidos para o rendimento em massa do processo ultrassônico e aqueles previstos segundo o modelo teórico 77
Figura 4.2	Comparação gráfica entre os resultados experimentais e teóricos para o planejamento fatorial 2^3 79
Figura 4.3	Variação do rendimento em massa com o tempo de extração, para o processo de extração de <i>H. tiliaceus</i> L. usando ultra-som com metanol 81
Figura 4.4	Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com n-hexano a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de <i>H. tiliaceus</i> L., com 140 minutos de extração 92
Figura 4.5	Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com hexano-benzeno a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de <i>H. tiliaceus</i> L., com 140 minutos de extração 92
Figura 4.6	Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com diclorometano a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de <i>H. tiliaceus</i> L., com 140 minutos de extração 93
Figura 4.7	Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com acetato de etila a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de <i>H. tiliaceus</i> L., com 140 minutos de extração 93
Figura 4.8	Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com acetato de etila, derivatizada com BF_3 /metanol, a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de <i>H. tiliaceus</i> L., com 140 minutos de extração 94

	pág.
Figura 4.9	Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com metanol, derivatizada com BF ₃ /metanol, a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de <i>H. tiliaceus</i> L., com 140 minutos de extração 94
Figura 4.10	Comparação entre os rendimentos da extração supercrítica obtidos em diferentes condições de extração 96
Figura 4.11	Curvas de extração obtidas para flores de <i>H. tiliaceus</i> L. usando CO ₂ a altas pressões com 6mL de solventes modificadores 97
Figura 4.12	Cromatograma do íon total (TIC) para os extratos das flores de <i>H. tiliaceus</i> L. obtidos com CO ₂ supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão 99
Figura 4.13	Cromatograma do íon total (TIC) para os extratos das flores de <i>H. tiliaceus</i> L. obtidos com CO ₂ supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão, e usando metanol como solvente modificador (3 mL) 100
Figura 4.14	Cromatograma do íon total (TIC) para os extratos das flores de <i>H. tiliaceus</i> L. obtidos com CO ₂ supercrítico nas condições mais drásticas de extração (P = 200 bar e T = 40 °C), e usando diferentes solventes modificadores 101
Figura 4.15	Distribuição quantitativa dos hidrocarbonetos saturados de 18 a 34 átomos de carbono nos extratos obtidos por SFE 106
Figura 4.16	Distribuição quantitativa dos ésteres metílicos, vitamina E e derivados do estigmasterol nos extratos obtidos com SFE 107
Figura 4.17	Comparação gráfica entre os resultados experimentais e teóricos para o planejamento fatorial 2 ⁴⁻¹ 111
Figura 4.18	Comparação gráfica entre os resultados experimentais e teóricos para o planejamento fatorial 2 ³ 115
Figura 4.19	Comparação gráfica entre os resultados experimentais e teóricos para o planejamento fatorial com o modelo de superfície de resposta 118
Figura 4.20	Cromatogramas do íon total (TIC) para os extratos obtidos aplicando-se o modelo da superfície de resposta, utilizando como solvente extrator n-hexano 119
Figura 4.21	Resultados da análise quantitativa de hidrocarbonetos saturados nos extratos obtidos por PLE das flores de <i>H. tiliaceus</i> L. 125
Figura 4.22	Resultados da análise quantitativa de vitamina E e fitol nos extratos obtidos por PLE das flores de <i>H. tiliaceus</i> L. 126
Figura 4.23	Resultados da análise quantitativa dos fitosteróis nos extratos obtidos por PLE das flores de <i>H. tiliaceus</i> L. 127
Figura 4.24	Resultados da análise quantitativa dos ésteres metílicos nos extratos obtidos por PLE das flores de <i>H. tiliaceus</i> L. 127
Figura 4.25	Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. obtido por SFE com CO ₂ (P = 200 bar; T = 40 °C). 132
Figura 4.26	Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. extraído com n-hexano com Soxhlet. 134

	pág.
Figura 4.27 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. extraído com n-hexano por maceração	135
Figura 4.28 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. extraído com n-hexano com ultra-som	135
Figura 4.29 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. obtido por SFE com CO ₂ (P = 200 bar; T = 40 °C) e n-hexano como solvente modificador	136
Figura 4.30 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. obtido por PLE com n-hexano	136
Figura 4.31 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. extraído com acetato de etila com Soxhlet	139
Figura 4.32 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. extraído com acetato de etila por maceração	139
Figura 4.33 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. extraído com acetato de etila com ultra-som	140
Figura 4.34 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. obtido com SFE com CO ₂ (P= 200 bar; T = 40 °C) e acetato de etila como solvente modificador	140
Figura 4.35 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. obtido por PLE com acetato de etila	141
Figura 4.36 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. extraído com metanol por maceração	143
Figura 4.37 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. extraído com metanol com Soxhlet	143
Figura 4.38 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. extraído com metanol com ultra-som	144
Figura 4.39 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. obtido por SFE com CO ₂ (P = 200 bar; T = 40 °C) e metanol como solvente modificador	144
Figura 4.40 Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de <i>H. tiliaceus</i> L. obtido por PLE com metanol	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

H.	<i>Hibiscus</i>
TAR	Reatividade antioxidante total (do inglês <i>Total Antioxidant Reactivity</i>)
TRAP	Potencial de reatividade antioxidante total (do inglês <i>Total Reactivity Antioxidant Potential</i>)
SFE	Extração com fluido supercrítico (do inglês <i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
PLE	Extração com líquido pressurizado (do inglês <i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
PLC	Cromatografia líquida preparativa (do inglês <i>Preparative Liquid Chromatography</i>)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês <i>Gas Chromatography/ Mass Spectrometry</i>)
SAE	Extração assistida por ultra-som (do inglês <i>Sonication Assisted Extraction</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LC	Cromatografia líquida (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
sub-FC	Extração com fluido subcrítico (do inglês <i>Subcritical Fluid Extraction</i>)
EFC	Cromatografia de fluidez aumentada (do inglês <i>Enhanced Fluid Chromatography</i>)
ASE	Extração acelerada por solvente (do inglês <i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
MAE	Extração assistida por microondas (do inglês <i>Microwave Assisted Extraction</i>)
UV-VIS	Ultravioleta visível
NMR	Ressonância magnética nuclear (do inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
RSM	Metodologia de superfície de resposta (do inglês <i>Response Surface Methodology</i>)
ERO	Espécies reativas de oxigênio

SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GP _x	Selênio dependentes
ABAP	2-2'-azo-bis(2-amidino propano)
SODMN	Superóxido dismutase mitocondrial
SODCuZn	Superóxido dismutase citoplasmática
p.a.	Puro para análise
W	Watt (unidade de potência)
W/cm ²	Watt / cm ²
SIM	Monitoramento de ions simples (do inglês <i>Single Ion Monitoring</i>)
SCAN	Varredura de espectro de massas
MIC	Cromatograma de monitoramento de ions (do inglês <i>Monitoring Ion Chromatogram</i>)
TIC	Cromatograma do íon total (do inglês <i>Total Ion Chromatogram</i>)
S9	Extrato de fígado de rato, descrito pela Corporação de Toxicologia Molecular, Maryland, EUA
NB	Meio líquido completo
FEC	Fase estacionária de crescimento
AAS	Espectrometria de absorção atômica
PCBs	Bifenilas policloradas
PAHs	Hidrocarbonetos polinucleares aromáticos
PCDDs	Dibenzo-p-dioxinas policloradas
PCDFs	Dibenzofuranos policloradas
T _c	Temperatura crítica
P _c	Pressão crítica
δ	densidade
FR _i	Fator de resposta do composto i
C _i (sp)	Concentração do composto i na solução padrão

$A_i(sp)$	Área do pico cromatográfico correspondente ao composto i na solução padrão
FRR_i	Fator de resposta relativo do composto i
FR_{pi}	Fator de resposta do padrão interno
C_i	Concentração do composto i na planta analisada
m_i	Massa do composto i no extrato analisado
m_{droga}	Massa de droga (planta) usada para obter o extrato
A_i	Área do pico cromatográfico correspondente ao composto i no extrato
m_{pi}	Massa de padrão interno usado em cada extrato analisado
A_{pi}	Área do pico cromatográfico correspondente ao padrão interno colocado no extrato analisado
n_i	Número de radicais livres por molécula de antioxidante
$[x]_i$	Concentração de antioxidante no fluido testado
k_i	Reatividade dos compostos em relação aos radicais armazenados
i_0	Intensidade de luminescência antes da varredura
i	Intensidade de luminescência depois da varredura
DMSO	Dimetilsulfóxido
FEC	Fase estacionária de crescimento
MM	Mistura do meio
NB	Meio líquido completo
NRSP	Natural Resources Support Project

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar a composição química das flores de *Hibiscus tiliaceus* L usando diferentes técnicas de extração.

Os métodos de extração usados foram maceração, Soxhlet, ultra-som, extração com fluido supercrítico e extração com líquido pressurizado. Foram investigadas as variáveis que podem influenciar no processo de extração tais como temperatura, pressão, polaridade do solvente, tempo de extração e massa de amostra, entre outras. A identificação dos compostos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada com detector de espectrometria de massas.

Os métodos de extração utilizados mostraram-se eficientes para a obtenção dos extratos, com algumas diferenças qualitativas. Quantitativamente, os compostos majoritários, em todas as técnicas de extração usadas, foram ácidos carboxílicos (C16 e C18), hidrocarbonetos com número ímpar de carbonos (C27, C29 e C31) e fitosteróis. Entre os métodos de extração que utilizam solventes orgânicos, a extração com líquido pressurizado apresentou maior rendimento em massa de extrato e maior concentração de alguns dos compostos presentes nas flores de *Hibiscus tiliaceus* L., com as vantagens de redução de solventes e do tempo de extração.

A variável que se mostrou mais importante nos procedimentos de extração foi a polaridade do solvente.

A composição química das flores *Hibiscus tiliaceus* L apresentou além dos compostos citados, álcoois, aldeídos e vitamina E.

A determinação do potencial antioxidante da planta, utilizando o método por quimiluminescência, permitiu encontrar valores para TAR e TRAP superiores ao trolox, utilizado como padrão, indicando a presença de antioxidantes nos extratos.

A avaliação da atividade genotóxica, do extrato metanólico, não apresentou efeito mutagênico nem tóxico.

ABSTRACT

The objective of the present work was the study of the chemical composition of the flowers of *Hibiscus tiliaceus* L. using different extraction techniques.

The extraction methods used were maceration, Soxhlet, sonication, supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction. The investigated variables, which can influence in the extraction process, were temperature, pressure, solvent polarity, extraction time and sample amount, among others. The identification of the compounds was accomplished by gas chromatography with mass spectrometry detection.

The methods showed equal efficiency with respect of the amount and quality of the extracts, presenting only some qualitative differences. Quantitatively, the major compounds, in all the extraction techniques used, were carboxylic acids (C16 and C18), hydrocarbons with odd number of carbons (C27, C29 and C31) and phytosterols. Among the extraction methods that use organic solvents, pressurized liquid extraction presented larger mass yield and higher concentration of some of the present compounds, with the advantage of reduction of solvent consume and extraction time.

The variable which showed more influence in the extraction procedures was the solvent polarity.

The chemical composition of the flowers of *Hibiscus tiliaceus* L presented beyond the mentioned compounds, alcohols, aldehydes and vitamin E.

The determination of the antioxidant potential of the plant, using the method for chemiluminescence, allowed finding values for TAR and TRAP superiors to the Trolox, used as reference, indicating the presence of antioxidants in the extracts.

The evaluation of the genotoxic activity, of the methanol extract didn't present effect mutagenic nor toxic activity.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas desde tempos remotos como medicamentos para o tratamento de uma série de doenças.

Em países desenvolvidos, como Alemanha, cerca de 25 % da população faz uso de fitoterápicos (Roberts *et al.*,1998; Blumenthal *et al.*,1998). O interesse na terapia natural, fundamentalmente de origem vegetal, tem aumentado muito — não somente em países subdesenvolvidos, mas também em países desenvolvidos (Shu,1998).

As plantas medicinais são uma importante fonte de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais têm servido como modelos para a síntese de um grande número de fármacos, propiciando importantes avanços na terapêutica de várias enfermidades (Dohadwalla, 1985).

Segundo Souza Brito (1993), o número de estudos que se realizam na área de plantas medicinais tem aumentado, com um crescimento médio de 10 % ao ano quanto à variedade de espécies estudadas. Entretanto, somente 15 a 17 % das plantas existentes no mundo têm sido pesquisadas do ponto de vista medicinal (Soejarto, 1996).

O Brasil é hoje um dos países que mais exporta plantas medicinais. Possui aproximadamente 120.000 espécies de plantas superiores, sendo um verdadeiro império vegetal (Gottlieb,*et al.*,1996). Entretanto, a investigação brasileira de plantas medicinais é ainda insuficiente se comparada à de outros países. Apesar da biodiversidade brasileira, ainda são poucos os grupos de investigação que trabalham neste campo, existindo, em geral, falta de interdisciplinaridade (Elisabetsky *et al.*, 1996; Brito *et al.*, 1997).

A utilização da flora como fonte de matéria prima para a obtenção de fitomedicamentos somente poderá ser efetivamente implementada a partir da total caracterização de suas espécies. Envolvendo complexa mistura de compostos orgânicos, essa caracterização requer técnicas adequadas de fracionamento para a análise devida de seus componentes.

Hibiscus (H.) tiliaceus L. é uma planta típica de clima tropical encontrada, em quantidades significativas, nas regiões de mangues. Suas flores são amplamente utilizadas como anticoncepcionais na medicina tradicional dos países asiáticos e africanos (Brondegaard, 1973) embora, no Brasil, se desconheça esse uso.

Uma das diretrizes da Organização Mundial de Saúde é realizar investigações na área de plantas medicinais que permitam um maior conhecimento das mesmas para avaliar seu emprego na medicina tradicional. Uma das vias para se alcançar esse objetivo é o desenvolvimento de técnicas de extração e análise dos princípios ativos presentes nestas plantas. Assim, objetivando normatizar o registro de fitomedicamentos no Brasil, o Ministério da Saúde, através de seus órgãos de vigilância sanitária, tem publicado uma série de regulamentações (Marques et al., 2001).

A extração é um dos processos mais utilizados para o isolamento de produtos ativos presentes em uma planta medicinal (Marcano, 1991). Dentre os métodos de extração sólido-líquido mais comumente empregados, destacam-se os tradicionais: maceração, percolação e a extração com Soxhlet; e os não convencionais: ultra-som, extração com fluido supercrítico (SFE) e extração com líquido pressurizado (PLE).

O ultra-som é um procedimento que utiliza a energia de ondas sonoras e pode ser usado como técnica de extração alternativa ao processo Soxhlet, tendo sido empregado para extração de compostos orgânicos (Koh, 1983). Ainda que a eficiência desta técnica tenha sido citada como igual, ou melhor, que a obtida com o extrator Soxhlet, são muito escassos os trabalhos que referem seu uso para a extração de produtos naturais a partir de plantas (Tena *et al.*, 1997; Sargenti *et al.*, 2000). São citadas como vantagens desta técnica a sua alta reprodutibilidade, a possibilidade de utilização para uma ampla variedade de tamanhos de amostra,

rapidez no processamento da amostra e baixo custo, envolvido em todo o procedimento analítico.

A extração supercrítica com dióxido de carbono (CO₂) é outra técnica que tem sido proposta como alternativa (Moyler, 1992; Stahl *et al.*, 1980; Reverchon, 1992) para extração de fragrâncias naturais. CO₂ tem sido usado como fluido supercrítico, pois apresenta como vantagens a não inflamabilidade, o fato de não ser tóxico, seu custo relativamente baixo e a facilidade de remoção na descompressão. Por sua baixa temperatura crítica (31,1 °C), a possibilidade de decomposição térmica de amostra é bastante reduzida.

Porém, CO₂ puro não é um fluido de extração apropriado para analitos polares. Para aumentar o poder de solvatação do CO₂, recomenda-se a adição de solventes modificadores (List, *et al.*, 1989; McNally, *et al.*, 1996).

A extração com líquido pressurizado (PLE) é uma técnica recente na obtenção de produtos naturais. Sua eficácia tem sido comparada a outras técnicas modernas e a procedimentos clássicos quanto à composição dos extratos obtidos. Entretanto, o alto custo do equipamento talvez explique o reduzido número de trabalhos sobre produtos naturais resultantes de sua aplicação. (Kikucchi *et al.*, 1997; Wenzel *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 2000; Papagiannopoulos *et al.*, 2002; Pecorelli *et al.*, 2003 e Choi *et al.*, 2003).

Entre as principais técnicas analíticas de separação, identificação e quantificação aplicadas ao estudo de extratos de plantas, encontram-se as cromatográficas, destacando-se, dentre elas, a cromatografia líquida preparativa (PLC – *Preparative Liquid Chromatography*), a cromatografia gasosa (GC – *Gas Chromatography*), e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS - *Gas Chromatography / Mass Spectrometry*) (Ryan *et al.*, 1999, Silverstein *et al.*, 1981).

A medicina tradicional atribui várias propriedades farmacológicas às substâncias extraídas das plantas do gênero *Hibiscus* em geral, algumas delas coincidentes na maioria das espécies. Para *H. elatus*, considerada como subespécie de *H. tiliaceus*, Roig (1988) confere propriedades aperitivas, emolientes, sudoríferas e laxantes.

1.1 Objetivo geral e objetivos específicos

O **objetivo geral** deste trabalho é o estudo comparativo de métodos de extração das flores de *H. tiliaceus* L. A partir do objetivo geral, apresentam-se os seguintes **objetivos específicos**:

- a) estabelecer condições ótimas para a extração dos componentes presentes nas flores de *H. tiliaceus* L., através de metodologias clássicas como Soxhlet e maceração, utilizando solventes de diferentes polaridades;
- b) estabelecer condições ótimas para a extração dos componentes presentes nas flores de *H. tiliaceus* L. empregando a extração assistida com ultra-som (SAE), extração com fluido supercrítico (SFE) e extração com líquido pressurizado (PLE), utilizando solventes com diferentes polaridades;
- c) caracterizar e identificar os extratos utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;
- d) realizar um estudo comparativo dos métodos de extração por ultra-som, fluido supercrítico e líquido pressurizado, considerando a capacidade extratora dos mesmos e dos solventes empregados, a atividade de extrato obtido e a composição química destes extratos.
- f) avaliar a atividade antioxidante nos extratos;
- g) avaliar a qualidade dos extratos obtidos através da determinação da toxicidade e da mutagenicidade;

1.2 Novidade do trabalho

A novidade deste trabalho consiste em:

- a) demonstrar a possibilidade do uso das técnicas de extração estudadas para o isolamento e caracterização dos componentes químicos presentes na espécie *H. tiliaceus* L.;
- b) contribuir para o conhecimento da composição química e das propriedades antioxidantes das flores desta espécie de planta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Hibiscus*

2.1.1 Generalidades

A família vegetal das *Malváceas* está composta por aproximadamente 82 gêneros e 1500 espécies, distribuídas pela maior parte do planeta, sendo particularmente abundante na América Tropical. Os membros desta família, de ocorrência espontânea nas Américas, são constituídos por 27 gêneros e aproximadamente 200 espécies, incluindo-se nestas o gênero *Hibiscus* (Webber, 1934). A espécie *H. tiliaceus* L. é conhecida no Brasil pelos os nomes vulgares de “Algodoeiro da Praia”, “Guaxima do Manguê”, “Embira do Manguê” (Soave *et. al.*, 1990). A classificação taxonômica desta espécie foi feita por Schultz (1963), que a considerou dentro da **ordem Malvales**, **família Malváceas**, **gênero Hibiscus** e **espécie Hibiscus tiliaceus**. É uma árvore típica da vegetação de ecossistemas costeiros, crescendo também na margem dos rios e em solos muito úmidos (**Figura 2.1**).



Figura 2.1: Fotografias da espécie *H. tiliaceus* L.: detalhes da flor (a) e do arbusto (b)

2.1.2 Descrição botânica da espécie *Hibiscus tiliaceus* L.

Segundo Correa (1984), *H. tiliaceus* L. é um arbusto ou árvore de tronco tortuoso, de até 5 m de altura e 10 cm de diâmetro, fortemente ramificado desde a base, com casca um pouco rugosa e de cor variável, entre branco acinzentado e castanho claro. A planta apresenta ramos longos, de até 6 m, estendidos lateralmente e conservando as cicatrizes das folhas antigas, com estípulas grandes, falcado-lanceoladas. Suas folhas são alternadas, simples, largo-pecioladas (pecíolo com tamanho de 10 cm ou mais, de cor violeta na base), ovado-cordiforme, curto-abrupto-acuminadas ou agudas, às vezes obtusas, com até 19 cm de comprimento e 17 cm de largura, crinadas, trilobadas ou palmi-nervadas, polinervadas (9 a 11 nervuras), coriáceas, vernicosas, de cor verde intensa — a parte superior sendo um pouco mais clara que a inferior — e pilosas (pelos em forma de estrela).

Suas flores são grandes, de cor amarelo sulfuroso, sem mácula alguma na base das pétalas, e apresentam corola bem aberta, de 8 cm, com 2 ou mais dias de

duração, nunca desabrochando completamente e obscurecendo até a coloração marrom antes de cair do pedúnculo dispostas em racimos terminais e sub-auxiliares; cálice de 20 a 25 mm; os bractéolos afinam na direção do ápice; o ovário é piloso (pelos esbranquiçados). Seus frutos são em forma de cápsula ovóide-aguda velutina, medindo de 20 a 25 mm, com 5 sulcos, 5 valva, 10 divisões e são denso-pubescentes; apresentam sementes sub-reniformes, sulcadas e negras (Correa, 1984).

2.1.3 *Hábitat* e distribuição geográfica da família *Malvácea*, da espécie *Hibiscus tiliaceus* L.

A família *Malvácea* apresenta-se em áreas distribuídas por todo o Brasil, sendo a espécie *H. tiliaceus* L. encontrada ao longo de toda a costa e agrupando-se, devido a seus longos ramos entrelaçados, em bosques impenetráveis nos terrenos sedimentários sujeitos aos fenômenos do mar (**Figura 2.2**).



Figura 2.2: *Hábitat* brasileiro da espécie *H. tiliaceus* L. estudada.

Esta planta desempenha uma função geológica de alta relevância, como a de fixar os terrenos, dessecando-os, trasladando-se a outro lugar à medida que desempenha sua função (Schultz, 1963 e Correa, 1984). Segundo Santiago (2000), esta espécie está associada geralmente a ecossistemas costeiros, onde o aumento da salinidade do solo diminui a condutância dos estomas, o que aumenta o uso eficiente da água; este autor também demonstrou que a salinidade diminui o processo fotossintético, não atuando sobre o crescimento da planta.

2.1.4 Composição química da espécie *Hibiscus tiliaceus* L.

A **Figura 2.3**, apresenta as estruturas dos principais compostos identificados para a espécie, de acordo com a literatura consultada.

As primeiras informações sobre a composição química do gênero *Hibiscus* foram publicadas por Visweswara *et al.*, 1946 (a, b), que conseguiram separar das flores de *H. vitifolius* o glicosídeo flavonol gossipin como componente majoritário e a quercetina como componente minoritário, também comunicando os autores ser o gossipin um novo glicosídeo da gossipetina.

Chen *et al.* (1993) informaram o isolamento de nove componentes a partir das flores secas de *H. mutabilis*, identificados como nonacosano, β -sitosterol, ácido betulínico, éster hexílico do ácido esteárico, estigmastan-3,7-diona (novo componente), estigmasta-4-en-3-ona, álcool tetratriacontílico, quercetina e kaempferol. Estes autores comprovaram, também, as atividades anticancerígenas e antiinflamatórias do ácido betulínico.

Trabalhos recentes de Seca *et al.*, 2001 a e b relatam a presença, no extrato cetônico da casca e da madeira de *H. cannabinus*, de esteróis, triterpenos e ésteres de ácidos graxos de cadeia grande, assim como de quatro novos lignanos, designados boehmenano H-1; boehmenano K₂, treo-carolignano K₃ e treo-carolignano H'4, além de mais 16 componentes, dentre os quais outros lignanos, aldeídos e derivados de treonina.

Figura 2.3: Estruturas químicas de alguns componentes isolados de *H. tiliaceus* L. na madeira, raízes, flores e frutos. (Gros *et al.*, 1985)

Para os frutos da planta, Subramanian *et al.* (1961, 1973) identificaram o β -sitosterol (C₆), kaempferol-3-O-galantósido, kaempferol, quercetina, quercetina 3-O- β -D-galactósido e ácido p-coumárico.

Lowry (1976) realizou um estudo sobre antocianinas de espécies de *H.* e informou que para as espécies maderáveis, dentro das quais citou a *H. tiliaceus*, a cianidina-3-glucósido (C₅) estava entre os componentes mais comuns encontrados nas flores.

Sadaquat *et al.* (1980) fizeram um estudo comparativo de *H. elatus* e *H. tiliaceus* L., considerando que, para alguns taxonomistas, a primeira é uma subespécie da segunda. O estudo foi realizado nas madeiras do tronco de árvores procedentes de Fiji e Sri Lanka e nas raízes de árvores encontradas no Brasil. Na extração com clorofórmio aplicada à madeira de *H. tiliaceus* L. de Fiji foi encontrada uma série de quatro hibisconas, também presentes em *H. elatus* e ainda o lapachol, não descrito em *Malváceas*. Para o material procedente de Sri Lanka, a extração com clorofórmio revelou a presença das hibisconas antes mencionadas, bem como de quatro hibiscoquinonas e uma hibiscolactona.

A investigação das raízes de *H. tiliaceus* L. provenientes do Brasil não revelou a presença de nenhum desses compostos. Entretanto, delas se isolaram quatro pigmentos relacionados: gossipol (B₁) (opticamente inativo) e mansanonas (B₂). Como o gossipol aparece em *Gossypium* e outros gêneros de *Malváceas* (Bell *et al.* 1978; De-Eknamkul *et al.*, 2003), não foi surpresa sua constatação em *H. Sterculéaceas* (Alí *et al.*, 1980) e *Ulmaceae* (Chen *et al.*, 1972; Rowe *et al.*, 1972 e Nishikawa *et al.*, 1973).

Para as folhas, Thayer *et al.* (1990) investigaram a quantidade de xantofilas e assinalaram altos conteúdos dessas substâncias presentes na espécie.

Jaroszewki *et al.* (1992), realizando uma análise de 90 espécies do gênero *Hibiscus* e utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa, assinalaram que a espécie *H. tiliaceus* L. não contém, na casca da madeira, gossipol — composto que tem demonstrado propriedades anticancerígenas e capacidades de inibir a maturação do espermatozóide humano.

Também para a espécie *H. tiliaceus* L. foi informada a presença de íons inorgânicos e ácidos orgânicos por Popp (1984). Ele assinala que a planta, apesar de crescer em água salobra, não armazena íons inorgânicos (sódio e cloreto) nas folhas jovens, nem apresenta aumento significativo da presença de sulfato e magnésio nas folhas velhas; entretanto, encontrou oxalatos livres, malatos e citratos não tendo constatado presença importante dos ácidos orgânicos contidos nos ânions.

Soto (1992) realizou, para diferentes espécies do gênero *Hibiscus*, um estudo da concentração de nutrientes das folhas maduras verdes, antes de se soltarem da árvore e de suas folhas amarelas, depois de caírem dela. Constatou que, para o *H. tiliaceus* L., as concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio eram menores nas folhas amarelas que nas verdes, o que sugeria sua transferência a outra parte da planta, antes de caírem. Além disso, o nível de outros nutrientes como o magnésio, ferro, manganês, zinco e cobre foi aumentado, sendo mais incrementados os de ferro e manganês.

2.2 Métodos de extração e caracterização de produtos naturais

O estudo fitoquímico geralmente compreende quatro etapas bem definidas (Lock de Ugaz, 1994):

- a) coleta e classificação botânica da espécie a estudar;
- b) extração, separação e purificação dos constituintes químicos;
- c) determinação estrutural;
- d) ensaios biológicos e farmacológicos.

Os métodos de extração e caracterização geralmente aplicados, determinantes para a aplicação posterior dos ensaios biológicos, dependerão da composição química do material vegetal a ser estudado.

Do ponto de vista farmacêutico, a extração refere-se à separação — a partir dos tecidos das plantas e animais, mediante o uso de solventes seletivos e utilizando-se procedimentos estabelecidos — de suas porções farmacologicamente ativas (Bombardelli, 1991; Miranda *et al.*, 2001). As partes em estudo da planta (folhas, flores, frutos, raízes) determinarão, fundamentalmente, os procedimentos a serem utilizados, podendo-se aplicar métodos contínuos ou descontínuos, à temperatura ambiente ou com aplicação de calor (Marcano *et al.*, 1991).

2.2.1 Maceração

A maceração é um método de extração muito utilizado. Consiste em por em contato a droga com a quantidade de solvente preestabelecida, à temperatura ambiente, em recipiente fechado, durante 2 a 14 dias. É um processo não seletivo que resulta num equilíbrio de concentração entre a droga e o solvente, e é influenciado por fatores que dependem da droga (sua natureza, tamanho de partícula, grau de umidade e quantidade em peso), e do solvente (sua seletividade e quantidade em volume). A velocidade com que se obtém o equilíbrio é função do tamanho de partícula e do grau de inchamento das células, bem como da viscosidade e da polaridade do solvente (Farmacopéia Brasileira, 1996).

A maceração é o método escolhido quando os princípios ativos podem sofrer alteração pelo calor ou pelo ar e são solúveis a temperatura ambiente, em um solvente que não deve ser volátil (Miranda *et al.*, 2001).

Dentre as desvantagens do processo estão a lentidão, a impossibilidade de extrair totalmente os princípios ativos da droga e a possibilidade de contaminações, quando se empregam solventes com grande quantidade de água. A operação de maceração (estática ou dinâmica) pode repetir-se várias vezes, sendo o processo

conhecido como maceração múltipla. Este processo é bastante utilizado para a extração em pequena escala, tanto por químicos quanto por farmacêuticos.

2.2.2 Extração com Soxhlet

A extração com Soxhlet é um método contínuo, considerado um caso particular da lixiviação.

Ainda que seja um método muito utilizado na extração de compostos orgânicos, ele apresenta restrições ligadas ao elevado tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas (Miguel *et al.*, 1989). Neste processo, o solvente extrai o material orgânico retido na amostra, à temperatura próxima à do ambiente; mas o material extraído permanece em contato com o solvente em ebulição durante todo o procedimento e, em algumas ocasiões, isto pode provocar transformações químicas nos componentes extraídos.

Na maioria dos casos, o processo de extração não é seletivo e, basicamente, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução (Snyder *et al.*, 1979; Vale, 1997).

2.2.3 Extração com ultra-som

O ultra-som é um processo de extração que utiliza a energia de ondas sonoras geradas em frequência superior à capacidade auditiva do ser humano. Estas ondas sonoras criam uma variação na pressão do líquido empregado no processo, gerando cavitação.

O primeiro registro de transmissão de ondas sonoras na água do mar foi realizado em 1917 por Paul Langevin, que é considerado o pai do ultra-som (Wender, 1985). Richards *et al.* e Wood *et al.*, em 1927, observaram, pela primeira vez, os efeitos das ondas ultra-sônicas em sistemas químicos e biológicos.

A utilização de ondas ultra-sônicas de alta frequência (20 a 100 kHz) causa mudanças físicas e químicas permanentes por produzirem cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na interface de sistemas líquido - líquido e líquido - gás. (Kirk-Ohmer, 1981; Barboza *et al.*, 1992; Berlan *et al.*, 1992).

A tecnologia adotada na utilização do ultra-som pode ser dividida em duas principais áreas: alta potência e baixa potência. O ultra-som de alta potência caracteriza-se pela elevada frequência, pequenas translocações, moderada velocidade e alta aceleração. Sua principal utilidade está nos banhos de limpeza, soldas, reações químicas, emulsificações, dentre outras. A **Tabela I** mostra algumas destas aplicações (Barboza *et al.*, 1992).

Tabela I: Principais aplicações das ondas ultra-sônicas de alta potência

área	aplicação
biologia	homogeneização, rompimento de células, esterilização, extração de componentes em tecidos de plantas ou animais
engenharia	limpeza de metal, solda, refinamento de metal em pedaços, perfuração
geologia	localização de minerais e depósitos de óleos, estabelecimento de profundidade
indústria	filtração, cristalização, dispersão de sólidos, crescimento de cristais, desgaseificação, emulsificação
medicina	esterilização, fisioterapia, inalações
física	cavitação, fenômeno das ondas acústicas, velocidade do som
polímeros	polimerização, despolimerização, degradação de peso molecular

As ondas ultra-sônicas de baixa frequência e baixa amplitude de propagação são usadas em muitos campos da ciência, engenharia e medicina, para ensaios e diagnósticos técnicos.

A eficiência desta técnica de extração é citada como sendo igual ou melhor do que a obtida com o extrator Soxhlet, apresentando as vantagens de alta

reprodutibilidade, possibilidade de utilização para uma ampla gama de tamanhos de amostra, rapidez de processamento da amostra e baixo custo (Koh,1983; Sargenti *et al.*, 2000).

Os principais efeitos do ultra-som, empregado como técnica de extração, são: (List e Schmidt,1989)

- a) aumento da permeabilidade da parede celular;
- b) a produção de cavitação (formação espontânea de bolhas num líquido abaixo do seu ponto de ebulição, resultante do esforço dinâmico);
- c) aumento da tensão mecânica das células (também denominado interface de fricção).

O ultra-som tem sido empregado como método de extração alternativo ao Soxhlet, aplicado na extração de diferentes compostos orgânicos: de partículas atmosféricas coletadas em vidro ou fibras de quartzo, de partículas de carbono, de solo, de alcatrão e de gorduras de material biológico (Lee *et al.*, 1980; Eiceman *et al.*, 1980; Koh, 1983; Willians, 1983; Luche *et al.*, 1987; Miguel,1983 e 1989; Marvin *et al.*, 1992; Blanco *et al.*, 1992; Vale, 1997; Valachovic *et al.*, 2001; Mzoughi *et al.*, 2002; Miège *et al.*, 2003; Hromádkova *et al.*, 2003; Luque-García *et al.*, 2003)

Os efeitos do ultra-som no processo de extração dependem da frequência e capacidade do equipamento e do tempo empregado para a extração. Alguns autores têm informado a ocorrência de transformações químicas nos extratos, resultante da utilização de longos tempos de extração (Ovadia *et al.*, 1965; Suss, 1972; Vinatoru *et al.*, 2001; Toma *et al.*, 2001; Schinor *et al.*, 2004).

2.2.4 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

A observação experimental do aumento da solubilidade de substâncias químicas com o aumento simultâneo de pressão e da temperatura, feita por Hannay e Hogarth em 1879, conduziu a um importante avanço científico e tecnológico: o uso de fluidos supercríticos.

As técnicas para a extração de componentes ativos de substratos naturais evoluíram consideravelmente (Kerrola,1995). Nos últimos anos, o processo de extração de matérias primas por diversos solventes — n-hexano, benzeno, álcoois metílico, etílico e propílico, acetona, pentano e diversos solventes clorados — passou a ser muito usado. Após a extração, o solvente é removido por evaporação ou destilação à pressão reduzida, deixando, como resultado, um extrato denso e resinoso.

Cada um desses processos pode produzir ingredientes de aromas e odores de muita qualidade. Entretanto, a temperatura elevada da destilação e o uso de solventes orgânicos podem deteriorar esta qualidade original. Há dois problemas associados às elevadas temperaturas: os danos causados aos componentes altamente sensíveis (como aromas e fragrâncias) e princípios ativos farmacêuticos; e a perda de componentes altamente voláteis, de baixo peso molecular, que não podem mais ser recuperados e reincorporados aos extratos (Kerrola, 1995; Maul,1996 e 1998).

Já em relação aos solventes, é praticamente impossível remover, sem um grande dispêndio de energia e custos, todo o solvente residual, podendo este causar alterações químicas nas moléculas e provocar efeitos tóxicos nos consumidores.

A extração de matérias primas naturais com dióxido de carbono supercrítico resolve eficazmente as questões associadas às altas temperaturas e ao uso de solventes orgânicos (Pellerin, 1991), pois este processo emprega temperaturas bastante baixas e o único solvente usado, o gás carbônico, dissipa-se totalmente no final da extração, após a descompressão, sendo um componente do ar atmosférico.

Apesar de bem conhecidos a partir dos experimentos realizados por Buchner (1906), até o início da década de 80 o uso de fluidos supercríticos era ainda muito limitado. Uma das principais razões dessa limitação devia-se às dificuldades em se operar, com segurança, temperaturas e pressões elevadas (às vezes superiores a 1000 atm) (Allada,1984). A extração com fluido supercrítico em escala industrial teve início na Alemanha no final dos anos 70, com o processo da remoção da cafeína do café (Adams, 1991; Anklam, 1995; McNally, 1996).

Hirata (1989) usou com êxito a extração por fluidos supercríticos como um método rápido e simples para obtenção de aditivos de polímeros e posterior análise por micro-LC (cromatografia líquida usando colunas em escala micro). Posteriormente, surgiram trabalhos demonstrando a utilidade do acoplamento direto SFE a outras técnicas cromatográficas GC (cromatografia gasosa), LC (cromatografia líquida) e SFC (cromatografia com fluidos supercríticos) (Ashraf-Khorassani e Levy, 1990; Ryan *et al.*, 1990; Ashraf-Khorassani *et al.*, 1990).

Em datas mais recentes, atividades de desenvolvimento comercial, de pesquisa e mesmo acadêmicas, envolvendo a extração com fluido supercríticos, têm crescido continuamente. Como exemplos comerciais, podem citar-se: para a indústria da cerveja, a extração de princípios amargos e aromáticos do lúpulo (Maul, 1998; McNally, 1996; Queckenber, 1994); a descafeinação do café (Adams, 1991; Anklam, 1995) e do mate; para produção de cigarros “light”, a remoção da nicotina do tabaco (Kerrola, 1995); a obtenção comercial de carotenos da cenoura (Vega, 1996); a produção de bases para cosméticos a partir do resíduo das cervejarias (King, 1996; Lim, 1996); a extração de óleos essenciais de plantas (Gopalakrishnan, 1991; Queckenberg, 1994; Trease, 1996, Rodrigues, 2003); a retificação e desodorização de óleos comestíveis em geral (Reverchon, 1994); e, para a indústria farmacêutica, a extração de matérias-primas das plantas medicinais (Degnan, 1991; Fontana, 1998; Kerrola, 1995; Maul, 1998; Trease, 1996). As **Tabelas II a VI**, nas páginas seguintes, apresentam um resumo da literatura com os principais estudos envolvendo aplicações dos processos de SFE.

Tabela II: Aplicação dos processos de SFE com CO₂ na obtenção de extratos na área de fármacos

matéria prima	extrato	processo tradicional	referência
óleo de peixe	ácidos graxos PCBs	1) extração com solventes 2) destilação a vácuo	Krukonis (1989); Nilsson et al. (1989); Staby <i>et al.</i> (1993)
borra de soja	tocoferol	destilação a vácuo	Lee <i>et al.</i> (1991)
plantas, frutas, raízes, fungos e bactérias	β-caroteno (vitamina A)	síntese química; fermentação	Cygnaronicz et al. (1992); Brunner <i>et al.</i> (1995)

Tabela III: Aplicações dos processos de SFE com CO₂ na obtenção de extratos na área de alimentos

matéria prima	extrato	processo tradicional	referência
grãos de café	cafeína	extração com diclorometano	Rizvi <i>et al.</i> (1986); Peker <i>et al.</i> (1992)
gema de ovos	colesterol	não existe	Parkinson e Johnston (1989)
produtos lácteos	colesterol	não existe	Moore <i>et al.</i> (1994)
óleo de laranja	(d-limoneno)	extração com solvente, destilação a vapor	Temeli <i>et al.</i> (1988); Richter e Sovová (1993)
azeite de oliva	ácidos graxos	refino	Gonçalves <i>et al.</i> (1991)
cardamon	óleo de cardamon	destilação a vapor	Gopalakrishman e Narayanan (1991)
soja	óleo de soja	extração com solvente	Reverchon <i>et al.</i> (1994)
hortelã pimenta	óleo de hortelã	destilação a vapor	Roy <i>et al.</i> (1996)
cenoura	de caroteno	extração por solventes orgânicos	Vega <i>et al.</i> (1996)

Tabela IV: Aplicação dos processos de SFE com CO₂ na obtenção de extratos na área de combustíveis e tabaco

matéria prima	extrato	processo tradicional	SFE	referência
resíduo da destilação a vácuo do petróleo	óleo desasfaltado	desasfaltação a propano	propano	Willians (1981)
álcool hidratado	água	destilação azeotrópica	CO ₂	Brignole (1986)
carvão mineral	asfaltenos e asfaltóides	liquefação direta do carvão	solventes orgânicos	Sunol <i>et al.</i> (1990); Rocha (1995)
tabaco comercial	nicotina	extração com solventes orgânicos	CO ₂	Willians (1981), Parkinson <i>et al.</i> (1989), Hubert <i>et al.</i> (1978)

Tabela V: Aplicação dos processos de SFE com CO₂ na obtenção de extratos na área de Aromas

matéria prima	extrato	processo tradicional	referência
pimenta do reino	óleo de pimenta	extração com solventes tóxicos	Ferreira <i>et al.</i> (1991); Moyler <i>et al.</i> (1992)
pimenta preta	óleo de pimenta	extração com solventes	Fereira <i>et al.</i> (2000, 2002)
<i>Rosmarinus officinalis</i> l.	óleo de rosemary	destilação a vapor	Reverchon <i>et al.</i> (1992,) Coelho <i>et al.</i> (1997), Sebastián <i>et al.</i> (1998)
alfavaca	óleo de alfavaca	destilação a vapor	Stuart (1995); Reverchon <i>et al.</i> (1994)
sementes de baunilha	óleo de baunilha	extração com acetona ou n-hexano	Stuart (1995); Reverchon <i>et al.</i> (1994)
flores de camomila	óleo de camomila	destilação a vapor	Reverchon <i>et al.</i> (1993, 1994)
flores de lavanda	óleo de lavanda	destilação a vapor e extração com solventes	Reverchon <i>et al.</i> (1995)
flores de laranja	fragrâncias	destilação a vapor	Reverchon (1997, 1999, 2001)
flores de camomila	extrato	destilação a vapor, Soxhlet	Scalia (1999)
flores de soja	extrato	extração com solventes	Rostagno <i>et al.</i> (2002)
produtos naturais	fragrâncias	destilação a vapor	Reverchon (1997)
casca de laranja	óleo de laranja	destilação a vapor	Berna <i>et al.</i> (2000)
orégano	óleo de orégano	destilação a vapor	Ertugrul <i>et al.</i> (1997)
<i>Origanum vulgare</i>	óleo de orégano	destilação a vapor	Simándi <i>et al.</i> (1998)
<i>Origanum munitiflorum</i>	óleo de orégano	destilação a vapor	Kose <i>et al.</i> (1998)

Tabela VI: Outras aplicações dos processos de SFE

matéria prima	extrato	SFE	processo tradicional	referência
embalagem de polietileno	flavorizantes e aromatizantes	CO ₂	extração com solventes	Sharma <i>et al.</i> (1991)
água poluída	resíduos tóxicos	H ₂ O	incineração	Parkinson <i>et al.</i> (1989); Moore <i>et al.</i> (1994)
solos e plantas	resíduos de pesticidas	CO ₂	destilação a alta temperatura	Capriel <i>et al.</i> (1986)
ervas, produtos naturais	extratos medicinais	CO ₂	destilação a vapor e extração com solventes	Lang <i>et al.</i> (2001)
<i>Ginkgo biloba</i>	extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	CO ₂	extração com solventes, Soxhlet	Chiu <i>et al.</i> (2002)
batata	análise de pesticidas	CO ₂	Soxhlet	Nunes <i>et al.</i> (2002)
milho	análise de fungos	CO ₂	solventes orgânicos	Ambrosio <i>et al.</i> (2004)

Apesar de usualmente definido a partir de diagramas de fases, onde o fluido supercrítico é conceituado como uma região física encontrada acima do ponto crítico da substância, este conceito tem pouca importância prática, uma vez que a passagem do estado gasoso ou líquido para o supercrítico ocorre de uma forma contínua e não de modo descontínuo, como sugerido por estes diagramas (Lanças, 2000).

Na prática, o estado supercrítico é obtido elevando-se a pressão e a temperatura de um gás ou de um líquido de forma que se altere o seu estado de agregação e, como consequência, modifiquem-se as propriedades da substância objeto de interesse. Esta alteração do estado de agregação de um gás ou líquido, em função de mudanças na pressão e na temperatura, conduz a uma mudança na sua densidade e no poder de solvatação, alterando o comportamento químico da substância. Por exemplo, o dióxido de carbono, apolar em condições normais de temperatura e pressão, apresenta, sob elevadas pressões, constante dielétrica equivalente a de substâncias que são polares em condições normais de temperatura e pressão; por outro lado, a água, considerada como substância altamente polar em

condições normais de temperatura e pressão, mostra constante dielétrica próxima de zero quando submetida a elevadas temperaturas e pressões (Sargenti,1994).

O estado de fluido supercrítico é apenas uma das possibilidades situadas entre os dois extremos: gases e líquidos. Assim, iniciando-se com uma substância no estado líquido e aumentando-se sua temperatura a uma pressão constante, diminui-se de forma contínua sua densidade, tendendo ela ao estado gasoso. Se a pressão for suficientemente alta, não permitindo que a substância atinja o estado gasoso, ela permanecerá em um estado intermediário (entre gás e líquido). Assim, se ambas as condições — pressão e temperatura — forem superiores à temperatura e à pressão críticas, a substância é dita no estado supercrítico. Caso esteja, pelo menos uma delas, abaixo destes valores, diz-se que a substância encontra-se no estado sub-crítico. Esta condição (a substância situada entre o estado líquido e o supercrítico) tem sido utilizada em várias técnicas instrumentais modernas, incluindo-se aí, dentre outras possibilidades, a extração subcrítica (sub-FC) e a cromatografia subcrítica (sub-FC); a extração com líquido pressurizado (PLE, de *Pressurized Liquid Extraction*) e a cromatografia com fluidez aumentada (EFC, de *Enhanced Fluidity Chromatography*) (Lanças, 2000).

A temperatura crítica de um gás é aquela temperatura acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve a pressão aplicada. Sua pressão crítica é definida como a pressão acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se diminua a temperatura. É um estado intermediário da substância, isto é, entre o líquido e o gasoso (**Figura 2.4**). Nessas condições, ela é relativamente densa se comparada a um gás convencional e suas forças de solubilização são mais intensas.

As propriedades físicas de um fluido supercrítico são intermediárias entre as de um gás e as de um líquido típicos. Por exemplo, a densidade de um fluido supercrítico pode ser mudada pela variação da pressão aplicada sobre o fluido. Assim, o fluido supercrítico pode ter, quando comprimido a altas temperaturas, densidade oscilando entre as exibidas pelos gases e as típicas dos líquidos (Hawthorne,1993, 1995, 1998).

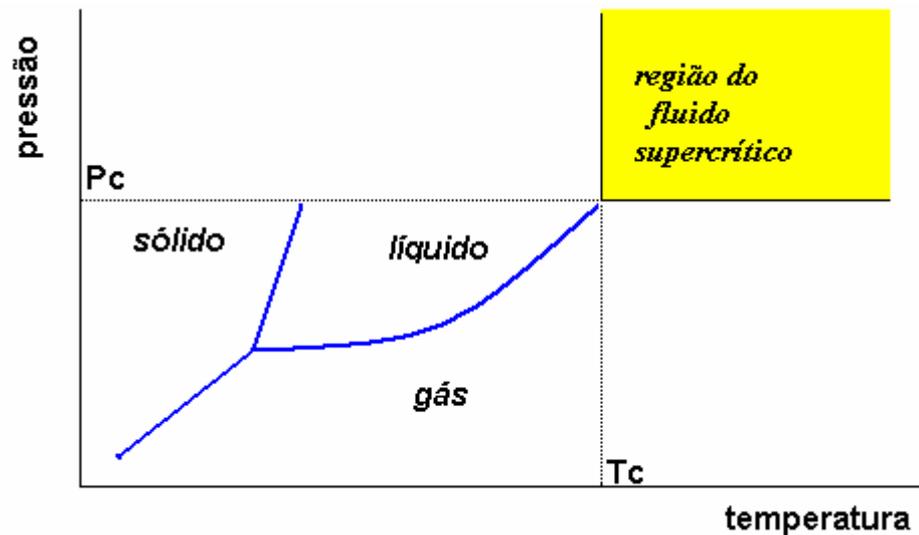


Figura 2.4: Diagrama de fases do dióxido de carbono

Um fluido supercrítico mantido a densidade relativamente alta é capaz de dissolver uma variedade de materiais, exatamente como o fazem os líquidos convencionais, mas com o poder de penetração próximo ao dos gases (Knowles,1988).

Fluidos supercríticos trazem consigo as propriedades dos gases e dos líquidos:

- a) compressibilidade semelhante à de um gás, com este preenchendo completa e uniformemente um recipiente;
- b) dissolução de solutos — como um líquido — quando suficientemente comprimidos;
- c) viscosidade baixa como a de um gás, produzindo pequenas quedas de pressão em colunas de mercúrio;
- d) difusão intermediária entre a de gases e líquidos, variando com a sua densidade.

2.2.4.1 Gás carbônico supercrítico

O gás carbônico supercrítico tem a densidade próxima à de um líquido, baixa viscosidade, e se difunde como um gás, o que lhe confere excelentes qualidades de extração. É o solvente indicado para a extração de uma grande faixa de substratos naturais. Sua seletividade de extração pode ser ajustada para cada substrato, mudando-se a temperatura e a pressão dentro da região supercrítica.

As regras gerais de extração com dióxido de carbono supercrítico podem ser assim resumidas:

- a) compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas e aldeídos, são facilmente extraídos;
- b) substâncias polares como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídios, glicosídeos e sais orgânicos, não são solúveis.
- c) o fracionamento é possível quando as substâncias apresentam diferenças na volatilidade, no peso molecular ou na pressão de vapor;
- d) temperatura crítica (31,04 °C): as extrações podem ser conduzidas a uma temperatura suficientemente baixa para não alterar as propriedades organolépticas e químicas dos extratos;
- e) pressão crítica (73,8 bar): fácil de obter e trabalhar em processo de produção industrial;
- f) inerte, não oferecendo riscos de reações secundárias como oxidações, reduções, hidrólises e degradações químicas;
- g) seguro, pois o dióxido de carbono é um material inofensivo, não explosivo, não poluente, não tóxico e de uso significativo na gaseificação de bebidas;

- h) a polaridade do gás carbônico está próxima à do pentano e do n-hexano, solventes comumente usados em extrações tradicionais por solventes;
- i) versátil, pois os parâmetros de extração do dióxido de carbono supercrítico podem ser modificados facilmente pela adição de pequenas quantidades de outros produtos, chamados de solventes modificadores, polares ou apolares, como a água e o etanol, e também pela seleção das condições de temperatura e pressão específicas, opções estas que adicionam flexibilidade ao processo e permitem a adequação das condições de extração às necessidades específicas dos produtos a serem extraídos e ao produto final desejado.

Há outros gases que também apresentam, em seu estado supercrítico, interessantes propriedades solventes. Entretanto, por razões de custo, perigo de explosão, toxicidade, inflamabilidade e propriedades físicas adversas, poucos deles são usados comercialmente.

2.2.4.2 Princípios de extração com fluido supercrítico

O princípio de extração com fluido supercrítico aproveita as propriedades físicas dos fluidos no estado supercrítico. Como a densidade de um fluido supercrítico é de 100 a 1000 vezes maior que a de um gás, comparável a de um líquido, as interações moleculares nele podem ser fortes, permitindo diminuir suas distâncias intermoleculares (Knowles *et al.*, 1988) oferecendo, portanto, maior capacidade de dissolução para várias substâncias químicas. Por conta da semelhança na viscosidade dos fluidos supercríticos e a dos gases, e por seu coeficiente de difusão ser maior que o dos líquidos, a extração das substâncias, mediante este processo, é muito facilitada. Como somente uma pequena alteração da pressão e da temperatura provoca uma grande mudança na solubilidade, o uso

do fluido supercrítico permite um isolamento altamente eficiente dos componentes a serem extraídos (Vannoort *et al.*, 1990).

2.2.4.3 Extração de sólidos com fluido supercrítico

Matérias primas sólidas podem ser maceradas ou moídas para facilitar a extração. Esse material é então colocado dentro do cilindro extrator. Em cada ponta do cilindro extrator há uma capa de metal poroso que permite a livre circulação do fluido supercrítico e das substâncias dissolvidas, enquanto mantém o resíduo sólido no seu devido lugar. Assim que o dióxido de carbono passa através das matérias-primas, os aromas, os óleos e os demais compostos existentes na amostra são dissolvidos e extraídos até um nível de solubilidade de equilíbrio (cerca de 10% p/p). A solução gasosa sai do extrator e passa através da válvula redutora de pressão; a pressão (e a força de solubilização) do CO₂ é reduzida, causando a precipitação dos componentes no separador; os aromas, óleos e demais compostos existentes na amostra são separados do dióxido de carbono, então reciclado pelo compressor, continuando o ciclo até que todos os componentes sejam extraídos e coletados no separador. A quantidade do gás, o fluxo, a temperatura, a pressão e o número de ciclos de extração são selecionados e calculados para otimizar a extração e dependem do produto e dos componentes que se queiram extrair, variando em cada caso. Devido a essa diversidade de parâmetros possíveis, uma grande variedade de matérias-primas sólidas pode ser efetivamente extraída por esse processo (Trease, 1996).

2.2.4.4 Extração de líquidos com fluido supercrítico

O extrator, neste caso, é uma coluna de extração líquida clássica, especialmente construída para uso sob alta pressão. A matéria-prima líquida é injetada na coluna, mantendo-se um fluxo em contra-corrente de dióxido de carbono

supercrítico. Como na extração de sólidos, selecionam-se os parâmetros de temperatura, pressão e reciclagem, para otimização do processo extrativo.

A extração de líquidos é um processo contínuo e tem certas vantagens operacionais inerentes sobre os processos por lote da extração de sólidos. Uma grande variedade de matérias-primas pode ser efetivamente extraída por esse processo. Como exemplo, podemos citar a extração dos óleos essenciais (Kerrola, 1995), os sucos de frutas (Adams, 1991; Kerrola, 1995), os sucos vegetais (Adams, 1991, Kerrola, 1995; Vega, 1996), os óleos comestíveis (Sun *et al.*, 1995), além de ser muito usado, pela indústria de alimentos, na desodorização de óleos fixos (Montanari, 1996; Sun *et al.*, 1995) .

2.2.4.5 Vantagens e desvantagens da extração com fluido supercrítico

Dentre as muitas vantagens particulares da extração supercrítica, as principais são:

- a) os solventes nela empregados geralmente são gasosos à pressão normal e à temperatura ambiente, permitindo que, após a extração, eles sejam facilmente eliminados dos resíduos e dos produtos extraídos, e recuperados;
- b) as propriedades solventes dos gases comprimidos podem ser grandemente variadas, tanto pelo ajuste apropriado da temperatura e da pressão quanto pela introdução de agentes aditivos que mudem a polaridade dos gases e, pela alteração gradual da temperatura e da pressão, possibilitem extrações multifase e fracionamento do extrato nos produtos desejados;
- c) a força solvente é ajustada via compressão mecânica;
- d) a adição de solventes modificadores permite a extração diferencial desde solutos não polares até solutos de polaridade alta;

- e) adição de solventes modificadores orgânicos aumentando a solubilidade do material a ser extraído;
- f) os solventes podem ser reusados, possibilitando baixo custo operacional;

As principais desvantagens da extração supercrítica são:

- a) o processo torna-se caro devido ao custo dos equipamentos e, assim, produtos de baixo valor agregado e baixo rendimento não podem ser economicamente extraídos por esse processo;
- b) compostos muito polares dificilmente serão extraídos sem a adição de um solvente modificador adequado.

2.2.4.6 Interação de solventes modificadores em soluções para fluido supercrítico

A adição de pequena quantidade de solvente modificador pode ter efeitos drásticos no comportamento das fases em fluido supercrítico, especialmente em interações específicas entre um solvente modificador e um ou mais solutos existentes. Por exemplo, a presença de 2% de tri-n-butil-fosfato em CO₂ supercrítico aumenta a solubilidade de hidroquinonas mais que duas ordens de grandeza em relação ao fluido puro (Lemert et al., 1991). Este comportamento é aparentemente esperado na formação de mudanças complexas de transferências de solutos e solventes modificadores.

Um fato emerge para soluções supercríticas próximas do ponto crítico: a molécula grande de soluto, rodeada de moléculas menores de solvente, tem sua densidade aumentada muito mais que o volume (Eckart et al., 1993; Kagimoto et al., 1988; Brennecke et al., 1990; Petsche *et al.*, 1989; Cochran and Lee, 1989). A **Tabela VII** lista os fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica, segundo Hierro (1991), embora Saldaña (1998) tenha ampliado a listagem de solventes.

2.2.5 Extração com Líquido Pressurizado (PLE)

O método PLE, também conhecido como extração com fluido pressurizado (PFE) ou extração acelerada com solventes (ASE), foi descrito pela primeira vez em 1995 (Hortler, 1996; Ezzell, 1998; Giergielewick *et al.*, 2001).

Tabela VII: Fluidos mais utilizados na extração supercrítica

tipo de fluido	composto	Tc (°C)	Pc (atm)	δ (g/cm ³)
inorgânicos	CO ₂	31	72.85	0.469
	NH ₃	133	111.54	0.236
	água	374	217.17	0.323
	N ₂ O	36	71.50	0,452
hidrocarbonetos	metano	- 82	45. 41	0.169
	etano	32	48. 17	0.203
	propano	97	41.85	0.217
	pentano	197	33.26	0.237
	etileno	9	49.65	0.218
	benzeno	289	48.27	0.302
	tolueno	319	40.57	0.292
compostos oxigenados	metanol	240	79.86	0.272
	etanol	241	60.61	0.276
	acetona	235	46.39	0.279
	éter etílico	194	35.93	0.265
compostos nitrogenados	piridina	347	55.57	0.312

Tc= temperatura crítica; *Pc* = pressão crítica; δ = densidade
 fonte: Gonzalez Hierro, M.T., 1994

Neste processo, a extração ocorre a temperaturas que podem variar de 50 a 200 °C e a pressões entre 1500 e 2000 bar. A elevada temperatura de extração aumenta a capacidade do solvente de solubilizar os compostos e a alta pressão

acelera sua difusão nos poros da matriz, facilitando a transferência de massa do composto no solvente extrator. O aumento da temperatura ajuda a romper o enlace entre o composto e a matriz e a diminuir a viscosidade do solvente, causando maior penetração do solvente na matriz e, portanto, aumentando sua capacidade de extração (López-Avila, 1999; McCant *et al.*, 1999).

A técnica emprega menor volume de solvente que a extração com Soxhlet, e é mais rápida (tempo de extração varia entre 10 e 20 minutos), não requer filtração do extrato depois da extração e é automatizada, podendo realizar até 24 extrações simultaneamente.

A eficiência desta técnica de extração tem sido comparada, quanto a rendimento e composição dos extratos, à de outras técnicas modernas e clássicas (Chen *et al.*, 1997; Conte *et al.*, 1997; Heemken *et al.*, 1997; Saim *et al.*, 1997; Alzaga *et al.*, 1998; Hauck *et al.*, 1998; Zuloaga *et al.*, 1998; Mckiernan *et al.*, 1999; Schwesig *et al.*, 1999; Schroeter *et al.*, 1999; Hawthorne *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003).

As aplicações da PLE são ainda limitadas por ser ela uma técnica relativamente nova. Foi empregada com êxito na extração de pesticidas e contaminantes do solo e do meio ambiente (particularmente hidrocarbonetos policíclicos), de cinzas, de materiais de referência e de alimentos (Hauffe *et al.*, 1995; Dean *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 1996; Horfler, 1996; Conte *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1997; Kakimoto *et al.*, 1997; Lou *et al.*, 1997; Saim *et al.*, 1997; Popp *et al.*, 1997; Obana *et al.*, 1997; Richter *et al.*, 1997; Draisci *et al.*, 1998; Schafer, 1998; Zuloaga, 1998; Bjorklund *et al.*, 1999, 2000 e 2002; Okihashi e Obana, 1998; Berset, 1999; Gan *et al.*, 1999; Mckiernan *et al.*, 1999; Gawdzik *et al.*, 1999; Porschmann, 1999; Abrha e Raghavan, 2000; Butala *et al.*, 2000; Richter, 2000; Chaudot *et al.*, 2000 a e b; Alonso-Salces, 2001; Porschmann *et al.*, 2001; Ahmed, 2003; Flotron *et al.*, 2003).

A **Figura 2.5** mostra uma foto do Equipamento ASE®300, enquanto a **Figura 2.6** mostra o sistema esquemático da extração acelerada com solventes (PLE).

A **Tabela VIII** apresenta aplicações da extração acelerada com solvente (PLE) em matrizes ambientais.



Figura 2.5: Equipamento ASE®300

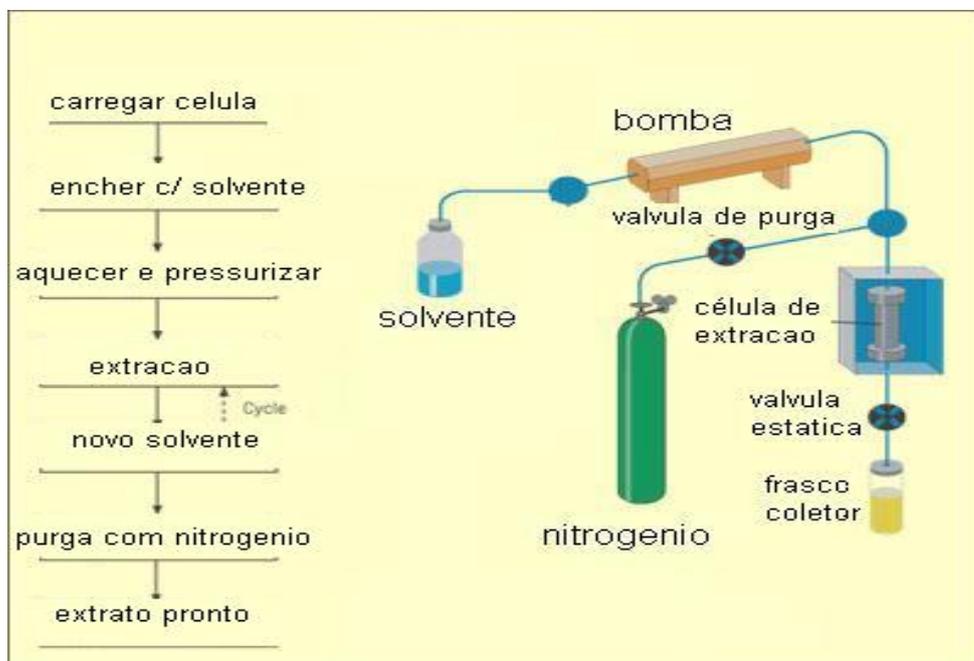


Figura 2.6: Esquema da extração por líquido pressurizado com solvente (PLE)

Tabela VIII: Aplicações da extração com líquido pressurizado (PLE) em matrizes ambientais

composto	matriz	referência
PCBs	alimentos e rações	Björklund <i>et al.</i> , 2002
PCBs	solos e resíduos líquidos	Zuloaga <i>et al.</i> , 1998
PCBs	produtos alimentícios	Ahmed, 2003
PCBs	sedimentos certificados	Björklund, 1999
PCBs	carvão, grafite e ácido húmico	Abrha <i>et al.</i> , 2000
PAHs e PCBs	solos e sedimentos	Björklund <i>et al.</i> , 2000
PCBs, PCDDs e PCDFs	peixes, cinzas e poeira industrial.	Horfler, 1996
PCDDs e PCDFs	solos, sedimentos, cinzas de olaria e poeira urbana.	Richter <i>et al.</i> , 1997
PCDDs e PCDFs	amostras nativas provenientes de solos contaminados	Wagenaar <i>et al.</i> , 1996
dioxinas	poeira doméstica	Saito <i>et al.</i> , 2003
dioxinas	sedimentos	Chen <i>et al.</i> , 1997
PAHs	resíduos líquidos	Miège <i>et al.</i> , 2003
PAHs	resíduos líquidos	Flotron <i>et al.</i> , 2003
PAHs	solos	Saim <i>et al.</i> , 1997
PAHs	solos	Hawthorne <i>et al.</i> , 2000
PAHs	carvão	Butala <i>et al.</i> , 2000
PAHs	sedimentos	McCant <i>et al.</i> , 1999
PAHs	solos, sedimentos, cimento e asfalto	Hauck <i>et al.</i> , 1998
PAHs	sedimentos marinhos e solos contaminados	Jensen <i>et al.</i> , 1996
hidrocarbonetos	solos	Richter, 2000
hidrocarbonetos	carvão	Li <i>et al.</i> , 2002
hidrocarbonetos, fosfatos e ácido fosfórico	solos	Chaudot <i>et al.</i> , 2000
PAHs, hidrocarbonetos alifáticos e clorados	material marinho particulado	Heemken <i>et al.</i> , 1997
atrazina e alaclor (pesticidas)	solos	Gan <i>et al.</i> , 1999
pesticidas organofosforados	alimentos	Obana <i>et al.</i> , 1997

continuação da **Tabela VIII:**

composto	matriz	referência
fungicidas	laranjas, bananas e alimentos processados.	Kakimoto <i>et al.</i> , 1997
pesticidas organoclorados PAHs, PCDDs e PCDFs	solos, esgotos, cinzas e outros resíduos.	Popp <i>et al.</i> , 1997
pesticidas organoclorados e PAHs	argila e solos contaminados	Fisher <i>et al.</i> , 1997
PAHs, ácidos graxos, fenóis e benzenodióis	amostras ambientais	Porschmann <i>et al.</i> , 1999
lipídios	material biológico	Schäfer, 1998
compostos policíclicos	peixes	Draisci <i>et al.</i> , 1998
esteróides anabolizantes	gordura animal	Hooijerink <i>et al.</i> , 2002
Ivermectina	formulação veterinária	Abend <i>et al.</i> , 2003
quinolonas (antimicrobiano sintético)	ração animal	Pecorelli <i>et al.</i> , 2003
herbicida	solos	Conte <i>et al.</i> , 1997
explosivos e pesticidas	solos e grãos	Ezzell <i>et al.</i> , 1998
composto de arsênio	solos	Chaudot <i>et al.</i> , 2000
fenóis, esteróis e ácidos carboxílicos	biomassa microbológica e solos	Pörschmann <i>et al.</i> , 2001
n- metilcarbamatos	alimentos	Okimashi <i>et al.</i> , 1998
felodipina	comprimidos	Bjorklund <i>et al.</i> , 1998
fenóis	solos marcados	Dean <i>et al.</i> , 1996
aromáticos	solos	Schwesig <i>et al.</i> , 1999
trialquilaminas	sedimentos e lodo	Alzaga <i>et al.</i> , 1998
contaminantes ambientais	peixes, cereais, frutas e vegetais	Schroeter <i>et al.</i> , 1999
ácidos amargos	lúpulo	Gawdzik <i>et al.</i> , 1999
compostos orgânicos semi-voláteis	musgos e pinhas	Wenzel <i>et al.</i> , 1998
compostos de arsênio	peixes	Mckiernan <i>et al.</i> , 1999
compostos fenólicos	uva	Palma <i>et al.</i> , 2002
polifenóis	maçã	Alonso-Salces <i>et al.</i> , 2001
monômeros e oligômeros	matrizes poliméricas	Lou <i>et al.</i> , 1997
gorduras	produtos cárnicos	Eckoldt <i>et al.</i> , 1999
gorduras	cereais, salsichas, chocolate e leite em pó.	Hauffe <i>et al.</i> , 1995.

Poucos artigos com a aplicação desta técnica à extração de plantas são encontrados na literatura, desde o desenvolvimento do primeiro aparelho de extração com fluido pressurizado. As principais referências ao assunto encontram-se na **Tabela IX**.

Tabela IX Principais referências encontradas na bibliografia sobre a aplicação do método PLE na extração de plantas

espécie	composto	referência
<i>Panax quinquefolium</i>	ginsenosídeos	Choi <i>et al.</i> , 2003.
<i>Piper gaudichaudianum Kunth.</i>	diversos	Péres <i>et al.</i> , 2003
<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	berberina, baicaleína e glicirrizina	Ong <i>et al.</i> , 2000.
malte	proantocianidinas	Papagiannopoulos <i>et al.</i> , 2002
<i>Coptidis rhizome e Radix aristolochiae</i>	berberina e ácidos aristolóquios I e II	Ong <i>et al.</i> , 2000
<i>Veronica longifolia</i>	glicosídeos iridóides	Suomi <i>et al.</i> , 2000
<i>Hypericum perforatum, Aesculus hippocastanum, Silybum marianum, Curcuma xanthorrhiza e Thymus vulgaris</i>	hipericina, saponinas, silibina, curcumina e timol	Benthin <i>et al.</i> , 1999
<i>Maclura pomifera</i>	flavononas e xantonas	Da Costa <i>et al.</i> , 1999
<i>Taxus cuspidata</i>	paclitaxol e taxanos	Kikuchi <i>et al.</i> , 1997

2.2.6 Comparação entre os métodos de extração usado para plantas

A **Tabela X** apresenta uma comparação entre vantagens e desvantagens de cada um destes métodos, segundo a literatura consultada.

Tabela X: Vantagens e desvantagens das diferentes técnicas de extração aplicáveis ao estudo de plantas (Conte *et al.*, 1997; Ozcan, 2004)

técnica	vantagens	desvantagens
extração com Soxhlet	método padrão; requer grande quantidade de amostra; não requer filtração; não depende da matriz e tem baixo custo	requer tempo elevado; grande quantidade de solvente e evaporação
extração por ultra-som	método rápido; requer grande quantidade de amostra; não depende da matriz e tem baixo custo	método trabalhoso; requer grande quantidade de solvente, filtração e exposição aos vapores do solvente
extração com fluido supercrítico (SFE)	método rápido; o CO ₂ não é contaminante do meio ambiente; método seletivo quando se variam pressão e temperatura; requer pequena quantidade de solvente; não requer filtração; não requer contato com solventes e pode ser totalmente automatizado	requer limitada quantidade de amostra; dependente da matriz e com alto custo
extração assistida por microondas (MAE)	método rápido; requer pequena quantidade de solvente, quando comparado com o Soxhlet; permite o controle completo dos parâmetros de extração; requer altas temperaturas e permite o processamento simultâneo de 12 amostras	requer filtração; usa solventes polares; necessita limpeza a cada extração e tem custo moderado
extração acelerada com solventes (PLE)	método rápido; requer mínima quantidade de solvente; não requer filtração; totalmente automatizado e fácil de operar;	dependente da matriz; tem custo muito elevado

2.3 Métodos de caracterização dos extratos

Os métodos cromatográficos e os espectroscópicos são hoje em dia os principais instrumentos para a separação, caracterização e identificação de moléculas orgânicas, incluindo a diferenciação de isômeros.

Os principais métodos utilizados são a cromatografia gasosa e líquida e métodos espectroscópicos como: ultravioleta visível (UV-VIS), infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massas (MS) (Silverstein *et al.*, 1981; Bertsch *et al.*, 1985; Linskens *et al.*, 1987; Derone, 1989; Marcano *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1991; Cordell, 1995; Phillipson, 1995; Günther, 1995; Baldwin, 1995; Rucker *et al.*, 1998).

2.3.1 Métodos cromatográficos

Inumeráveis procedimentos cromatográficos têm sido desenvolvidos, diferindo pelo seu tipo de interação com as fases estacionárias (adsorção, partição, intercâmbio iônico, por exemplo), pelo tipo de condições operacionais (coluna aberta ou alta pressão, por exemplo) e pelas mudanças de eluentes ou fases móveis (Wise *et al.*, 1986; Karleski *et al.*, 1986; Caramão, 1991; Lanças, 1993).

Alguns autores têm empregado as técnicas cromatográficas posteriormente à etapa de extrações sucessivas. Tradicionalmente a cromatografia líquida é técnica mais usada em separações seqüenciais, utilizada para o isolamento de um componente específico ou para o fracionamento por classe química (Domínguez, 1973; Hostettmann *et al.*, 1986, Davies, 1988; Wolfender *et al.*, 1995), enquanto que a cromatografia gasosa tem sido mais empregada para compostos voláteis.

Os avanços de técnicas analíticas instrumentais, unidas à simplicidade e precisão da cromatografia gasosa, tornaram-na uma das técnicas mais difundidas

para a análise química, quer seja na indústria, quer em laboratórios de investigação científica. Vários autores destacam a cromatografia gasosa como uma ferramenta analítica de extrema utilidade na separação de misturas complexas (Cook *et al.*, 1933; Kirk-Ohmer, 1981; Tomkins *et al.*, 1987; Lopes *et al.*, 1996; Wolthers, *et al.*, 1999); também na análise ambiental, é a técnica mais rápida e eficiente para a separação dos componentes de um dado sistema (Tracor e Yitco, 1961-67).

A cromatografia em fase gasosa é rápida (usualmente um tempo na ordem de minutos por amostra) e é extremamente sensível, podendo detectar de nanogramas (10^{-9} g) a picogramas (10^{-12} g). Como qualquer outro método analítico, não responde a todas as perguntas relativas à identificação de uma determinada substância. Entretanto, não há como lhe negar a contribuição à análise de uma substância desconhecida ou de uma mistura complexa de substâncias, já que oferece um modo rápido e fácil para determinar o número de componentes de uma mistura, a presença de impurezas em uma substância e, muitas vezes, o esclarecimento — em uma primeira aproximação — da identidade de um composto (Miller, 1975; Bertsch *et al.*, 1985).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), é um sistema unido (hifenado) por uma interface. A conexão direta das colunas capilares do cromatógrafo de gás ao espectrômetro de massas permite diversas varreduras de massas em pontos diferentes de um pico cromatográfico. Deste modo, com o espectrômetro de massas como detector universal é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos (Silverstein *et al.*, 1981; Reeve, 1994). O pico com a maior relação massa/carga é normalmente (mas não sempre) de um íon não fragmentado, íon este que pode ser usado para confirmar a massa molecular relativa do composto, identificar uma mistura e a pureza de uma substância (Silverstein *et al.*, 1981; Grayson, 1986). O modelo fragmentado pode possibilitar uma indicação dos grupos químicos presentes na molécula.

Em termos analíticos e sob condições favoráveis, o método mais simples é comparar-se o espectro obtido com o de uma amostra pura, ou com os espectros da biblioteca de referência (Fifield *et al.*, 1995).

2.4 Planejamento e análise de experimentos

As variáveis de um planejamento estatístico representam características físicas, químicas ou físico-químicas das amostras em estudo, as quais definem ou influenciam uma determinada resposta, avaliada dentro de um campo experimental previamente delimitado (Linden, 1998).

A resolução deste problema experimental seguiu, durante muito tempo, o método empírico de tentativa e erro ou aqueles onde as variáveis, menos uma, eram mantidas constantes. Esta abordagem representa um gasto desnecessário de tempo, esforço e recursos (Wehrlé, 1989). Contraposta a essa sistemática, a abordagem moderna utiliza metodologias estatísticas de planejamento e otimização de experimentos que se têm mostrado bastante promissoras (Miller, 1993). Através de planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, com um número mínimo de experimentos (Barros Neto *et al.*, 2001).

Alguns exemplos dessas metodologias são: planejamentos fatoriais completos e fracionários, a metodologia de superfície de resposta (MSR), modelagem por mínimos quadrados, entre outros (Davies, 1993; Barros Neto *et al.*, 2001). Essas metodologias estatísticas implicam a elaboração de um planejamento experimental, caracterizado por uma série de fatores que agem sobre a resposta investigada. O resultado final é a identificação, observação e quantificação das alterações nas variáveis (Montgomery, 1991; Barros Neto *et al.*, 2001).

Neste contexto, entende-se por **fator** qualquer variável de entrada (**x**) que influencie a resposta avaliada (**y**), variável de saída, definida a cada experimento. Os fatores podem ser distinguidos entre quantitativos — quando lhes são atribuídos valores numéricos, e qualitativos — quando os valores atribuídos não são numéricos. **Nível** é o valor numérico dos fatores quantitativos ou o grau ou característica dos fatores qualitativos (List *et al.*, 1989).

2.4.1 Planejamentos fatoriais

Um experimento fatorial é aquele onde todos os fatores estudados variam de maneira constante e planejada, permitindo obter o máximo de informação com o menor número de experimentos (Linden, 1998).

Os experimentos fatoriais são representados por uma notação exponencial (\mathbf{x}^k), onde a base indica o número de níveis e o expoente, o número de fatores (Yates, 1935). A primeira linha denota o experimento no qual todos os fatores estão em seu nível inferior e a última linha, aquele no qual os fatores estão em seu nível superior. Este tipo de tabela, característica para a análise de experimentos fatoriais, é denominado **Tabela de Yates** (Montgomery, 1991; Davies, 1993).

Os experimentos fatoriais têm como atributo principal incluir, em cada ensaio completo, todas as combinações possíveis dos diferentes fatores ou conjuntos de tratamentos, exceto no caso particular dos experimentos fatoriais fracionários (Montgomery, 1991).

Os experimentos fatoriais fracionários são usados quando o número de fatores a ser investigado é alto e não se conhece, a priori, a relação completa de todas as variáveis que afetam significativamente a resposta. Para não correr o risco de excluir fatores que possam vir a ser importantes, deve-se estudar, nesse estágio, o maior número possível de variáveis (Box et al. 1978) e, neste caso, realiza-se um planejamento com uma fração-meia ou seja, avalia-se tantos efeitos principais, quanto a média destes efeitos. A construção dessa fração-meia segue metodologia descrita nos modelos estatísticos (Neto, B. *et al.*, 2001). A denominação de planejamentos fatoriais fracionários é diferente, ou seja: um planejamento fatorial completo com 4 níveis seria denominado 2^4 ; já um fracionário, com as mesmas variáveis e níveis, seria designado como 2^{4-1} .

A informação obtida através destes experimentos procede de duas fontes: respostas obtidas para os diferentes níveis de cada fator e respostas resultantes da

mudança no nível de cada fator, cujos efeitos refletem-se na resposta dos demais fatores (Yates, 1935).

2.4.2 Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (*RSM — Response Surface Methodology*) é uma técnica de otimização (processo que busca alcançar um estado particularmente vantajoso de um determinado sistema – o ponto ótimo – determinado segundo critérios previamente estabelecidos (Linden,1998)), baseada em planejamentos fatoriais; foi introduzida por Box (1978) nos anos cinquenta, e desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais.

A metodologia de superfície de resposta apresenta duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Estas etapas podem ser repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de se atingir uma região ótima de superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples a respostas obtidas com planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho da máxima inclinação de um determinado modelo, a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (Barros Neto *et al.*, 2001).

2.5 Atividade biológica

Várias são as potencialidades das plantas no que se refere às suas atividades farmacológicas. O incremento das necessidades de saúde no decorrer dos tempos pode ser cada vez mais desenvolvido com o apoio das plantas medicinais, considerando-se, principalmente, o alto custo dos fármacos. O uso popular de plantas como matéria prima para fármacos corresponde a um potencial significativo para o desenvolvimento de pesquisas, na formulação de novos fitomedicamentos.

2.5.1 Uso na medicina tradicional

Várias ações biológicas têm sido relatadas na literatura para aos produtos obtidos de diferentes órgãos da planta *H. tiliaceus*.

(1) Kobayashi (1976) relatou a ação espermicida do extrato aquoso da madeira, ingerido oralmente.

(2) Brondegaard (1973) e Womerley (1974) registraram o efeito contraceptivo dos princípios ativos das flores.

(3) Singh *et al.* (1984) descreveu o uso da infusão da madeira seca para expulsar a placenta e combater desordens pós-parto.

(4) Whistler (1985), Holdworth (1982, 1991, 1992) estudaram o uso externo do extrato aquoso de *H. tiliaceus* na consolidação mais rápida de fraturas, efeito este atribuído à madeira e às flores frescas, e também informaram a utilização do extrato aquoso das folhas para o tratamento de doenças da pele.

Diversas atividades biológicas, por outro lado, vêm sendo relatadas para produtos derivados de plantas do gênero *Hibiscus*.

Kholkute (1977) estudou a potencialidade no tratamento da infertilidade de mamíferos de diferentes extratos obtidos a partir de flores, folhas e casca do tronco de várias espécies do gênero *Hibiscus*. As amostras foram coletados nas quatro estações do ano e apenas o extrato benzênico das flores de *H. rosa sinensis* apresentou efeito significativo — máximo, médio e mínimo conforme sua obtenção tivesse se dado no inverno, primavera/outono, e verão, respectivamente.

Moundipa *et al.* (1993) observaram que o extrato de *H. macranthus*, em associação com o de *Bosella alba*, acelerava a maturação dos testículos de ratos, sugerindo a presença, nessas plantas, de compostos esteroidais ativos.

Telefo *et al.* (1998), avaliaram as mudanças bioquímicas e fisiológicas ocorridas no sistema reprodutivo de ratas, jovens provocadas por diferentes doses

do extrato de *H. macranthus*. Observaram significativo aumento dos órgãos reprodutivos (útero e ovário), a uma velocidade muito superior a dos grupos de controle, assim como aumento nos níveis de proteínas do útero, concluindo que estes resultados poderiam ser devidos à presença de compostos estrogênicos no extrato da planta.

Di Stasi *et al.* (1988), estudando 12 plantas medicinais usadas popularmente em função de suas propriedades analgésicas, constataram que o *H. tiliaceus* L., não apresentava tal característica. Para o ácido protocatênico, isolado de *H. sabdariffa* L., Tsui-Hawa (1996), demonstrou que este produz efeito inibidor da citotoxicidade e genotoxicidade dos hepatócitos, induzida por terbutil-hidro-peróxido (t-BHP), alertando que um dos mecanismos desse efeito protetor poderia estar associado às suas propriedades de seqüestrar radicais livres.

Yamasaki *et al.* (1996) encontraram efeito antioxidante para as cianidinas isoladas de *H. rosa sinensis*. Para a espécie *H. sabdariffa*, Tseng *et al.* (1997) realizaram um estudo preliminar do potencial antioxidante de um extrato cru de etanol obtido a partir das flores secas, fracionado com clorofórmio e acetato de etila, restando uma fração residual. A fração solubilizada em acetato de etila apresentou a maior capacidade de captar radicais livres enquanto a fração solubilizada em clorofórmio, o maior efeito inibitório na atividade da xantina oxidase. Eles também verificaram que tais frações protegem os hepatócitos da toxicidade e genotoxicidade induzida pelo t-BHP. Para o extrato aquoso desta espécie, Pin-Der *et al.* (1997) constataram marcante atividade antioxidante nos modelos do ácido linoleico e sobre lipossomas, assim como sua incapacidade de provocar ou sofrer mutações frente a diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*.

2.5.2 Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são constituídas por moléculas energeticamente instáveis que adquirem estabilidade ao captar elétrons de

moléculas vizinhas, isto é, oxidando-as. Dentro dessas espécies encontramos derivados radiculares do oxigênio como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (HO^{\cdot}) e os derivados não radiculares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Para proteger o organismo destas ERO, existe uma série de sistemas de defesa antioxidante: enzimas específicas que inativam algumas destas ERO, enzimas controladoras da disponibilidade de metais na célula e captadores não protéicos de radicais; em paralelo, desenvolvem-se sistemas de regeneração e reparação de macromoléculas, especialmente o DNA, a fim de corrigir possíveis falhas ou sobrecargas nos mecanismos de defesas (Halliwell e Gutteridge, 2000).

As capacidades pró-oxidante e antioxidante das células devem ser mantidas em equilíbrio a fim de se evitar o perigo potencial de estresse oxidativo. Quando ocorre aumento das ERO e/ou diminuição da capacidade antioxidante, elas podem lesionar componentes celulares, inclusive o DNA, modificando sua estrutura ou função e gerando estresse oxidativo. Isto pode explicar então a possível associação entre várias doenças e as ERO. Existe em todo o organismo um sistema de defesa contra a ocorrência do radical livre de oxigênio, que inclui fatores inibidores da formação ou captura dos iniciadores primários do processo de peroxidação dos lipídios, como proteínas ligadas aos íons metálicos ou às enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) selênio dependentes (Kahl, 1991; Aruoma, 1993, 1994, 1996 e 1997; Seif-El-Nasr *et al.*, 1995, revisado por Halliwell e Gutteridge, 2000).

As plantas são uma rica fonte de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais apresentam atividade antioxidante. Os antioxidantes naturais podem ter uma ou mais das seguintes funções: captura de radicais livres, agentes redutores, complexantes de metais pró-oxidantes e extintores de radical oxigênio (Kinsella *et al.*, 1993; Xing *et al.*, 1997; Przybylski *et al.*, 1998; Lasztity, 1998; Watanabe, 1998). As vitaminas E e C, assim como o β -caroteno, também capturam radicais oxigênio; estes antioxidantes são compostos de origem natural, como também o são os flavonóides, ácidos fenólicos e os compostos de nitrogênio como os alcalóides e os

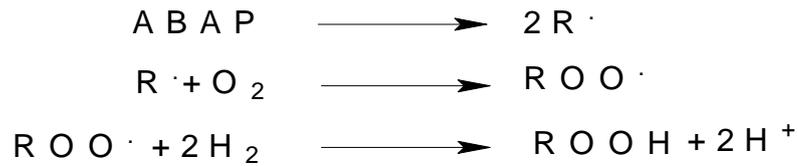
derivados do cloreto de fenila (Motoyo *et al.*, 1994; Facino, 1996; Zheng *et al.*, 1997; Mann, 1997; Bagchi, 1997; Tanaka, 1997; Fotsis, 1997; Hertog, 1997; Jankún, 1997; Palozza, 1997; Sakagami, 1997; Cão, 1997; Challem, 1998; Shi *et al.*, 1999; Kajiyama *et al.*, 2001; Ohkatsu *et al.*, 2001).

2.5.2.1 Potencial antioxidante total *in vitro* (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR)

Um dos procedimentos mais empregados para se avaliar o status antioxidante de um fluido biológico é a análise de seu potencial de captura de radicais (*Total Radical Trapping Potencial* — TRAP). O método de avaliação de TRAP foi desenvolvido por Wayner *et al.* (1985) e se baseia na medida dos tempos de indução da oxidação de uma dispersão de lipídios expostos a uma fonte de radicais livres com uma velocidade (constante e conhecida) de produção de radicais livres em condições anaeróbicas (Thurnam *et al.*, 1987; Metsa-Ketela, 1991; Whitehead *et al.*, 1992; Mutholland *et al.*, 1993; Lissi *et al.*, 1995, e Campos, 1996).

O ABAP (2,2'-Azo-bis(2-amidino propano) é empregado como fonte de radicais livres e a diminuição na concentração do oxigênio é usada para medir a velocidade de oxidação (Lissi *et al.*, 1992). Este procedimento tem sido modificado para se adaptar a outras fontes de radicais livres e a outras técnicas de monitoramento da velocidade do processo (Lissi, *et al.*, 1991 e 1994; Whitehead *et al.*, 1992).

Lissi *et al.* (1995), baseados em outros autores (Whitehead, *et al.*, 1992; Lissi, *et al.*, 1991), utilizaram a quimiluminescência do luminol para avaliar os níveis de TRAP e estenderam este procedimento para determinar a capacidade de um aditivo químico em provocar a diminuição da concentração estacionária de radicais livres, formada a partir do ABAP. O mecanismo proposto para a quimiluminescência do luminol, segundo Lissi, *et al.* (1995), governa-se pela produção de radicais derivados do luminol a partir das reações com radicais peróxidos:



Este parâmetro pode ser um excelente indicador da capacidade de uma mistura dada (ou fluido biológico) de remediar o dano celular associado a um aumento na produção de radicais livres. O radical derivado do luminol (LH^\cdot) estará em equilíbrio com o radical-ânion (L^\cdot). A habilidade de um aditivo de fixar a luminescência derivada do luminol pode, então, relacionar-se com sua capacidade de obstruir ou capturar radicais derivados do luminol ou do ABAP. Um dos produtos utilizados como padrão para esta redução é o Trolox (substância semelhante à vitamina E). A ação do Trolox sobre a luminescência do ABAP pode ser visualizada num gráfico típico (**Figura 2.7**).

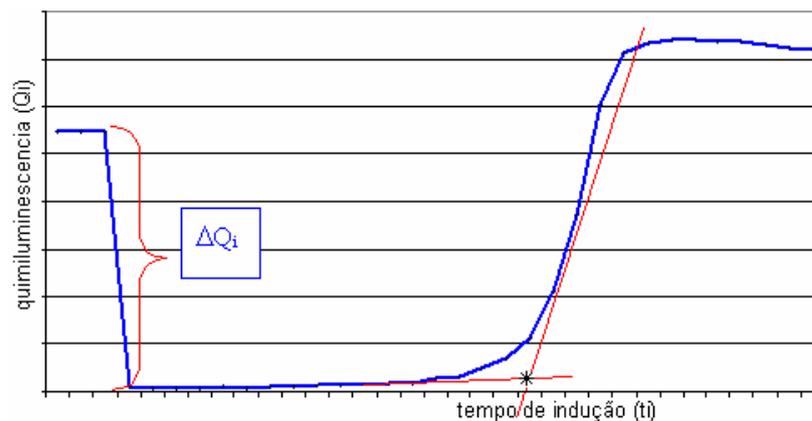


Figura 2.7: Gráfico da variação da quimiluminescência (ΔQ_i) do ABAP com o tempo de indução (t_i) para a adição de Trolox.

Neste gráfico, o ponto assinalado com um asterisco (*), correspondente ao cruzamento das tangentes apresentadas, é chamado tempo de indução (t_i). Quanto maior for t_i , maior será a capacidade antioxidante dos compostos estudados. Este valor é sempre referido ao Trolox. Por outro lado, a permanência da luminescência

(Q_i) pode ser uma medida do TAR, uma vez que dá uma idéia da velocidade de oxidação do composto.

2.5.2.2 Potencial antioxidante total *in vivo*: levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) tem sido muito utilizada em estudos de reparação de DNA e mutagênese por ser um excelente modelo de célula eucariótica; a capacidade pró-oxidante e antioxidante de vários compostos também pode ser analisada em certas linhagens de levedura (Suzuki *et al.*, 1983). *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbicas facultativas, que pode crescer tanto em metabolismo anaeróbico como aeróbico (Suzuki *et al.*, 1983). Em comum com outros eucariotos, suas células possuem duas SOD (tipo de linhagem de *S. cerevisiae*) intracelulares, a SODMn – mitocondrial (codificada pelo gene *SOD2*) — e a SODCuZn — citoplasmática (codificada pelo gene *SOD1*) — sendo ambas responsáveis pela dismutação do $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 e O_2 . A SODCuZn aparenta ser a principal enzima envolvida na remoção de $O_2^{\cdot -}$ do citoplasma e possivelmente também dos peroxissomas, enquanto a SODMn parece proteger a mitocôndria da geração de $O_2^{\cdot -}$ durante a respiração e exposição a etanol, e também diminuir a toxicidade de $O_2^{\cdot -}$ gerado pela adição exógena de compostos ciclo-redox durante a fase fermentativa da levedura. A SODMn responde por 1 a 10% da atividade total das SODs, dependendo das condições de crescimento; o restante é devido a SODCuZn (Halliwell e Gutteridge, 2000).

As leveduras também têm a capacidade de modular seu sistema antioxidante em resposta às espécies reativas de oxigênio (ERO). Demonstrou-se que, na *S. Cerevisiae*, uma exposição prévia à H_2O_2 e menadiona (geradora de $O_2^{\cdot -}$) aumenta sua resistência a níveis anteriormente tóxicos destes compostos, através da indução de genes e de proteínas (Costa *et al.*, 2001; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996).

Desta forma, testes em células eucarióticas da levedura *S. cerevisiae*, tanto proficientes, quanto deficientes em sistemas de reparação de danos causados por

estresse oxidativo, assumem um importante papel tanto na verificação da capacidade oxidante, antioxidante e pró-oxidante quanto na determinação do possível mecanismo de ação dos produtos testados (Costa *et al.*, 2001; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Solventes e reagentes

Os solventes utilizados foram: n-hexano, benzeno, diclorometano, acetato de etila, metanol e água, os quais, independentemente de seu grau de pureza, foram destilados e armazenados em frascos escuros com tampa de vidro. Todos os reativos empregados foram do tipo “puro para análise” (p.a.), da firma Merck. Os padrões cromatográficos utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich, com pureza superior a 98 %.

Nos fracionamentos cromatográficos empregou-se sílica gel 60 (Merck) com tamanho de partícula de 0,063 a 0,200 mm (70 a 230 mesh ASTM), colocada em cápsula de porcelana e ativada em estufa a 180 °C por 4 horas, sendo posteriormente guardada em dessecador.

3.2 Coleta e processamento do material vegetal

Utilizaram-se flores de *H. tiliaceus*, coletadas nos mangues de Florianópolis no estado de Santa Catarina, Brasil, nos meses de janeiro de 2003 e 2004, durante o dia. As flores foram colhidas frescas, todas da própria planta, e colocadas sobre papel de jornal, trocando-se este duas vezes ao dia para eliminar a umidade e evitar a deterioração, uma vez que a coleta foi feita a sete horas de onde estavam sendo realizados os estudos. Sendo o *H. tiliaceus* planta sazonal, não foi possível fazer outra coleta de suas flores durante o ano.

Esta planta foi herborizada no Instituto de Botânica da Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS) com número de herbário ICN 113936 e identificada pelo Dr. Bruno Irgand como *H. tiliaceus* L.

3.3 Secagem, trituração e armazenamento do material vegetal

As flores foram secas em estufa a uma temperatura fixa de 40 °C. Com o material seco, se procedeu a trituração em um gral de porcelana. A parte que não se empregou de imediato foi armazenada em frasco de vidro fechado, à temperatura ambiente.

3.4 Determinação dos parâmetros de qualidade das flores

A determinação dos parâmetros de qualidade (umidade residual e cinzas totais) obedeceram à NRSP 309, 1992. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.4.1 Determinação do conteúdo de umidade residual

Para esta determinação se empregou o método de dessecação, partindo de 2 g de amostra exatamente pesada. A amostra foi aquecida a 100 °C até peso constante. Empregaram-se uma estufa Biomatic referência 1305 e uma balança analítica Marte Modelo AS 2000 No 231506.

3.4.2 Determinação de cinzas totais

Para a determinação de cinzas totais, seguiram-se os seguintes passos, com a utilização de um forno mufla marca Quimis ref. Modelo Q 310 D 21 e uma balança analítica Marte Modelo AS 2000 No 231506: 2 g de amostra triturada, exatamente pesada em cápsula de porcelana previamente tarada, foi aquecida suavemente, aumentando-se a temperatura até a carbonização da porção de ensaio, incinerada

posteriormente em forno mufla a uma temperatura de 750 °C durante 2,5 horas. Para obter a massa constante, os intervalos entre aquecimento e pesagem foram de 30 minutos.

3.5 Análise dos macro e micro nutrientes das flores de *H. tiliaceus* L.

Analisaram-se os macronutrientes das flores de *H. tiliaceus* L. (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio), seus micronutrientes (zinco, cobre, manganês e ferro), enxofre, sódio, carbono, boro, molibdênio, além de alguns metais pesados (cádmio, níquel, chumbo, cromo e mercúrio).

Adotou-se a metodologia descrita por Tedesco (1982). A digestão foi realizada em forno de microondas DGT 100 – Projecto Sistemas.

Na determinação de metais pesados por espectrofotometria de absorção atômica (AAS) com forno de grafite, utilizou-se um equipamento Perkin Elmer modelo Analyst 100 com um mostrador automático A-78.

3.6 Estudo fitoquímico

Para o estudo fitoquímico utilizou-se a amostra vegetal seca e triturada, macerada sucessivamente em éter etílico, etanol e mistura etanol — água (na proporção de 1:1) durante quarenta e oito horas em cada um desses solventes, à temperatura ambiente, conforme o esquema apresentado na **Figura 3.1**.

Cada extrato foi separadamente submetido à análise qualitativa mediante os procedimentos químicos resumidos por Miranda *et al.* (2001) e apresentados nas **Figuras 3.2, 3.3 e 3.4**.

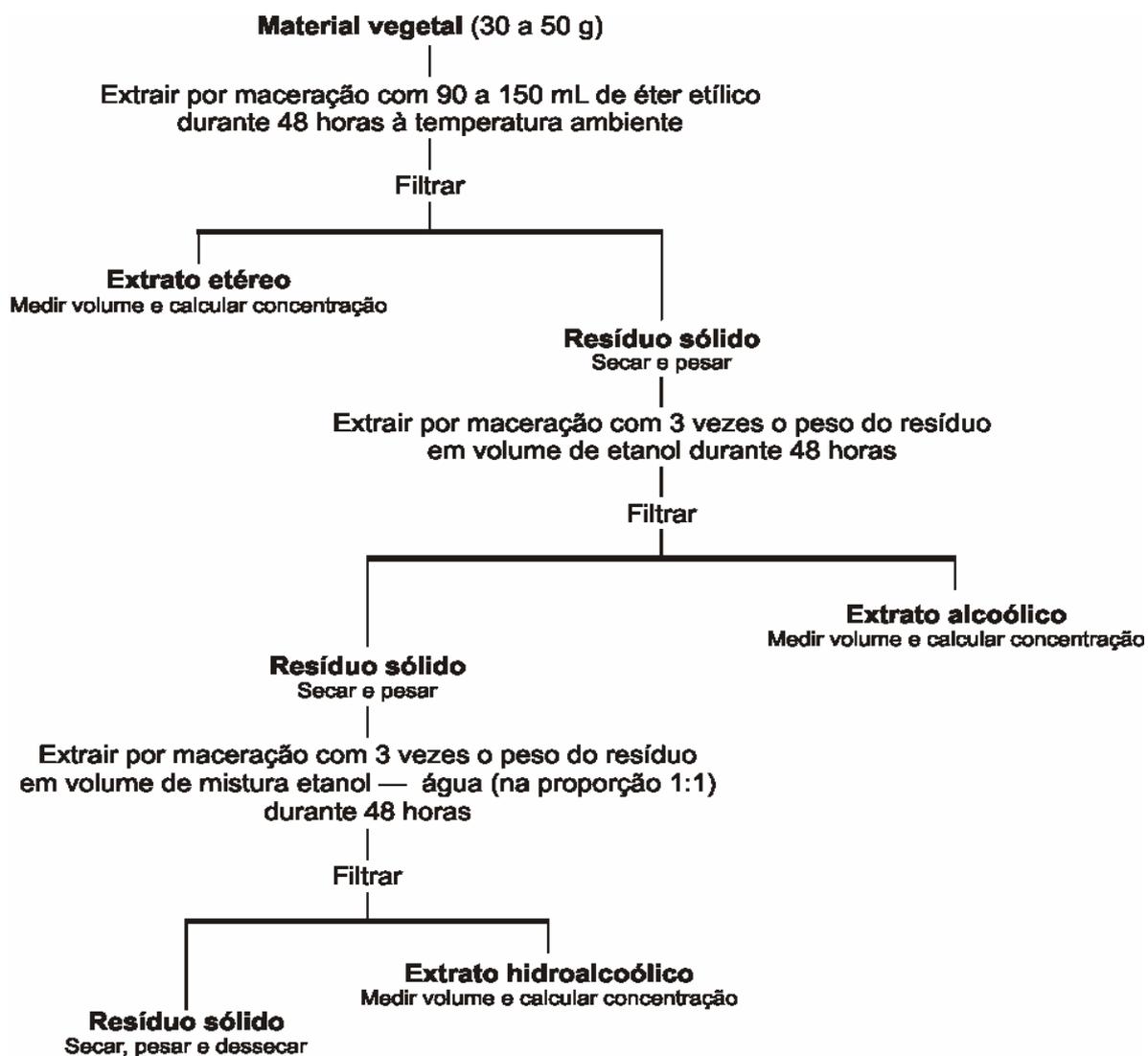


Figura 3.1: Esquema da extração sucessiva do material vegetal para a aplicação de técnicas no estudo fitoquímico.

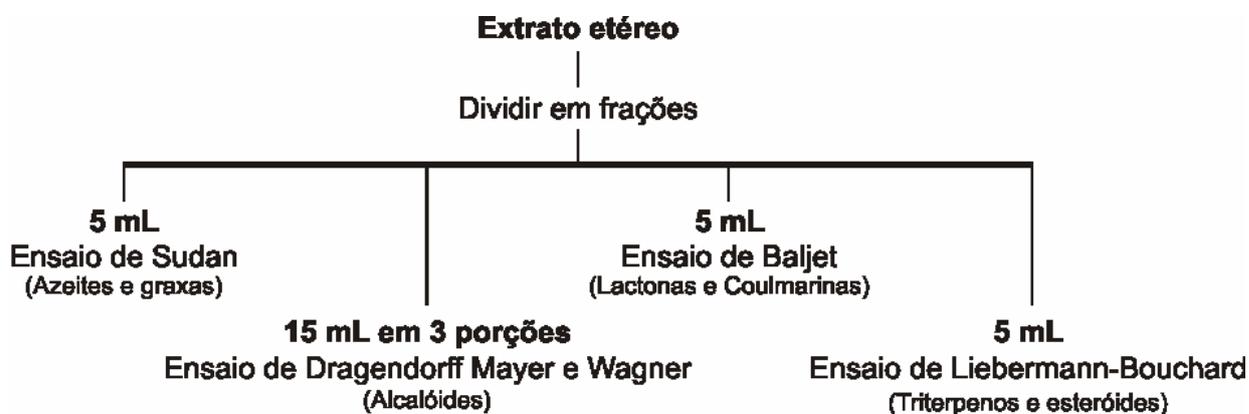


Figura 3.2: Esquema das análises realizadas com o extrato etéreo.

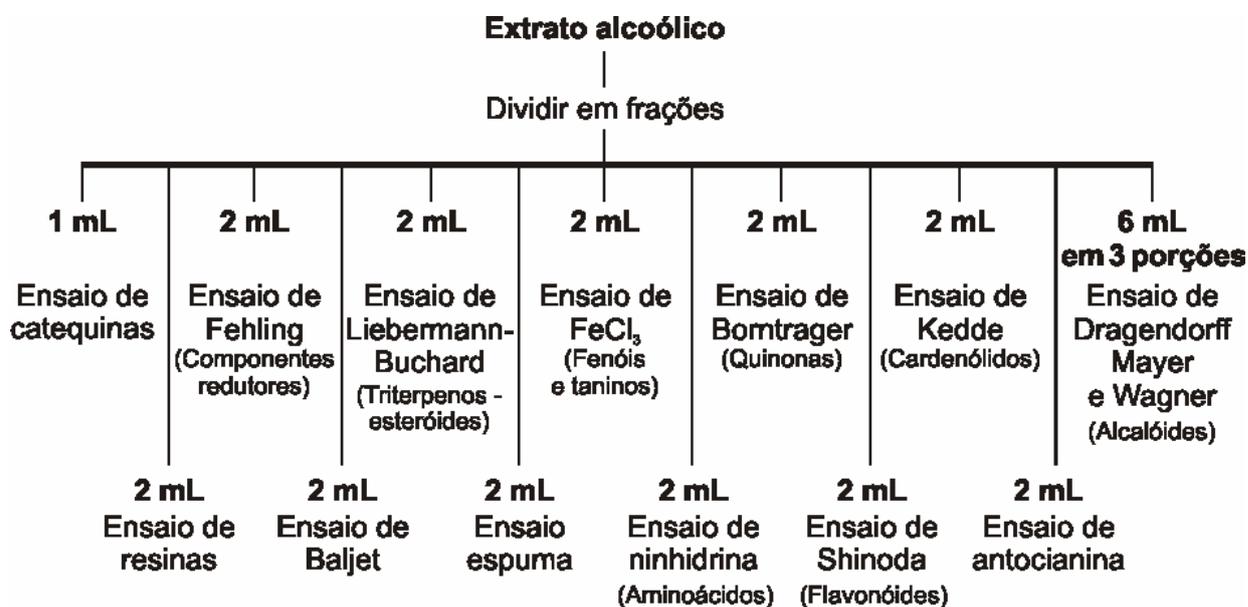


Figura 3.3: Esquema das análises realizadas com o extrato alcoólico.

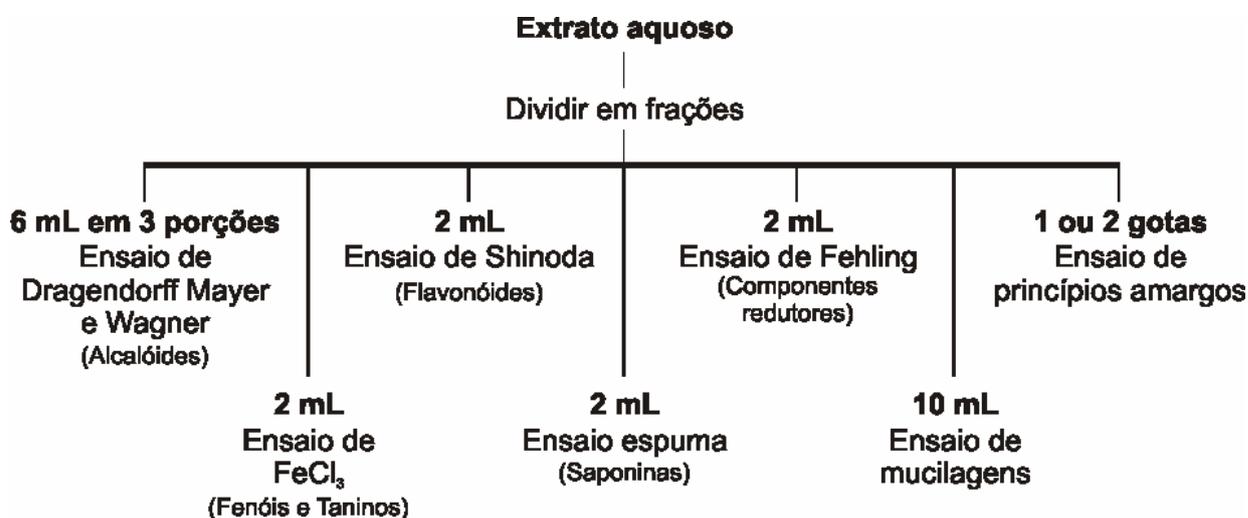


Figura 3.4: Esquema das análises realizadas com o extrato aquoso.

3.7 Estudo comparativo dos métodos de extração

Os métodos selecionados para este estudo comparativo foram: maceração, extração com Soxhlet, extração por ultra-som, extração com fluido supercrítico e extração acelerada com solventes.

Todos os extratos obtidos foram concentrados em um evaporador rotatório Buchi R-14 e levados à secura com fluxo de nitrogênio ultra puro até atingirem peso constante. O rendimento da extração foi determinado gravimetricamente.

3.7.1 Extração por maceração

Na maceração foram utilizadas duas amostras, A_1 e A_2 , com pesos de 3,0 e 15,0 g e com volumes de 100 e 200 mL de cada solvente, respectivamente, em frascos erlenmeyers de 250 mL. Uma vez fechado o recipiente com o macerado deixou-se repousar durante oito dias, agitando-se esporadicamente com um bastão de vidro.

A maceração transcorreu à temperatura ambiente (25 °C) e ao término do tempo o extrato foi filtrado através de um funil normal com papel de filtro e concentrado à secura.

3.7.2 Extração com Soxhlet

O cartucho extrator foi colocado em Soxhlet e pré-extraído com cada um dos solventes extratores, para eliminar possíveis contaminantes do papel.

Utilizaram-se duas amostras, uma de 15 g (amostra A) e outra de 50 g (amostra B), as quais foram extraídas com 225 e 900 mL, respectivamente, de cada solvente durante 40 horas em sistema Soxhlet convencional.

A cada oito horas de extração os solventes eram trocados para evitar a saturação do solvente e a decomposição térmica do extrato. Ao término do tempo de cada extração, os extratos eram decantados e concentrados à secura.

3.7.3 Extração por ultra-som

O procedimento foi otimizado e, uma vez estabelecidas as melhores condições de extração, a análise foi repetida em triplicata para poder levar-se a cabo a comparação entre os diferentes processos extrativos.

Empregou-se um equipamento de ultra-som modelo Thorton T-14, potência de 90 W com uma frequência de 40 KHz e com uma intensidade de radiação de $0,27 \text{ W/cm}^2$. A **Figura 3.5** apresenta um esquema do equipamento usado. As dimensões do banho foram de 24 cm x 14 cm x 10 cm. Utilizaram-se erlenmeyers de 250 e 500 mL, com boca esmerilhada, conectados a um condensador de ar com 30 cm de altura.

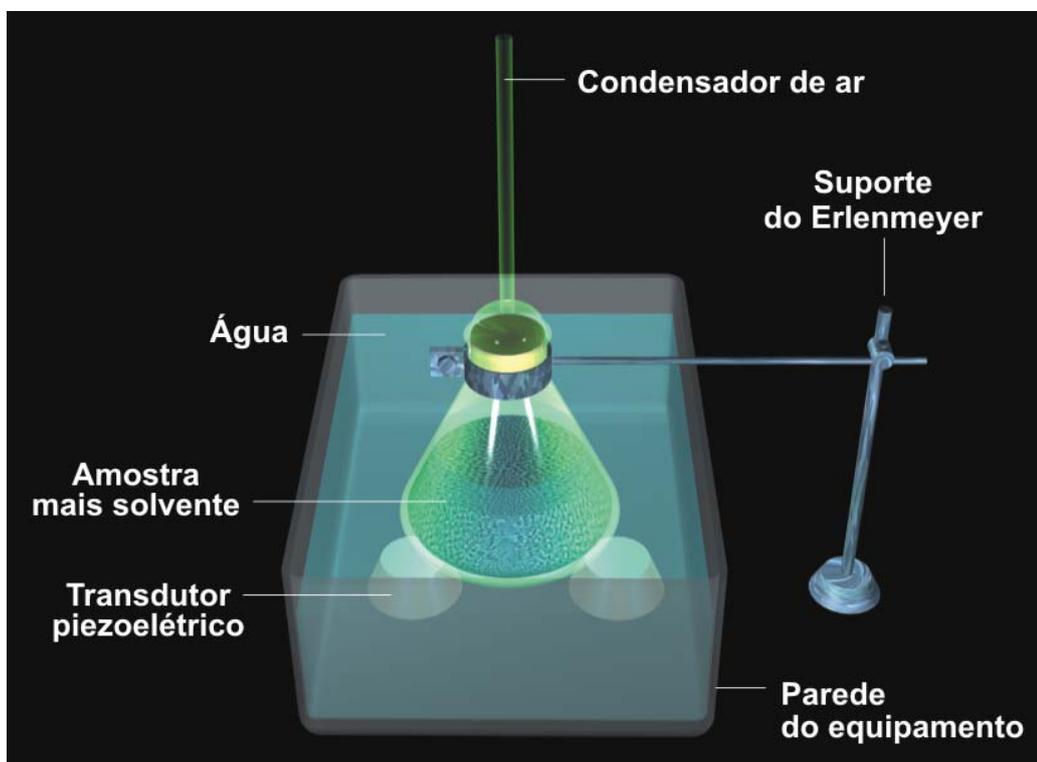


Figura 3.5 Esquema usado para a extração por ultra-som

A água do banho do equipamento foi mantida, por todo o tempo, a uma temperatura fixa de 25 °C, para evitar que a mesma tivesse influência no processo de extração.

Realizou-se, inicialmente, um planejamento experimental usando um modelo 2^{5-1} (Lopez, 1994; Barros Neto *et al.*, 1995), que incluía a avaliação dos seguintes parâmetros:

- a) **tempo de extração (X_1)**: avaliou-se o efeito resultante de dois tempos, 40 e 80 minutos;
- b) **polaridade do solvente (X_2)**: consideraram-se dois solventes de polaridades opostas, n-hexano (apolar) e metanol (polar);
- c) **quantidade da amostra (X_3)**: analisaram-se duas quantidades de amostra, 5 e 15 g;
- d) **tamanho de partícula (X_4)**: utilizou-se a planta (flor) inteira e triturada;
- e) **relação massa de planta / volume de solvente (X_5)**: empregaram-se 50 e 450 ml dos solventes avaliados, mantendo a razão m/v igual a 1:10 e 1:30.

A matriz utilizada, com um total de 16 experimentos, está apresentada na **Tabela XI**. Neste caso considerou-se, como variável-resposta, a porcentagem de rendimento com o seguinte modelo ajustado:

$$\% \text{ Rendimento} = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_4X_4 + B_5X_5 + B_{1,1}X_1^2 + B_{1,2}X_2^2 + \dots$$

Levando em conta os resultados deste experimento, realizou-se um segundo modelo, neste caso um fatorial 2^3 . As variáveis analisadas foram:

- a) **tempo de extração (X_1)**: os níveis estudados foram 90, 180 e 270 minutos;
- b) **polaridade do solvente (X_2)**: empregou-se, como gradiente de polaridade, acetato de etila, metanol e mistura metanol — água.

A matriz utilizada, com um total de 12 experimentos, é apresentada na **Tabela XII** e considerou-se também, como variável-resposta, a porcentagem de rendimento com o seguinte modelo ajustado:

$$\% \text{ Rendimento} = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_{1,1}X_1^2 + B_{1,2}X_2^2 + \dots$$

Tabela XI: Matriz utilizada no planejamento fatorial 2^{5-1}

exp.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
1	+1 80 min	-1 n-hexano	-1 5 g	+1 inteira	+1 1/30 (5g/150 mL)
2	+1 80 min	-1 n-hexano	-1 5 g	-1 triturada	-1 1/10 (5g/50 mL)
3	-1 40 min	+1 metanol	+1 15 g	-1 triturada	+1 1/30 (15g/450 mL)
4	-1 40 min	-1 n-hexano	-1 5 g	+1 inteira	-1 1/10 (5g/50 mL)
5	-1 40 min	+1 metanol	-1 5 g	+1 inteira	+1 1/30 (5g/150 mL)
6	+1 80 min	+1 metanol	-1 5 g	-1 triturada	+1 1/30 (5g/150 mL)
7	-1 40 min	-1 n-hexano	-1 5 g	-1 triturada	+1 1/30 (5g/150 mL)
8	+1 80 min	+1 metanol	+1 15 g	-1 triturada	-1 1/10 (15g/150 mL)
9	+1 80 min	+1 metanol	+1 15 g	+1 inteira	+1 1/30 (15g/450 mL)
10	-1 40 min	-1 n-hexano	+1 15 g	-1 triturada	-1 1/10 (15g/150 mL)
11	-1 40 min	+1 metanol	-1 5 g	-1 triturada	-1 1/10 (5g/50 mL)
12	+1 80 min	-1 n-hexano	+1 15 g	+1 inteira	-1 1/10 (15g/150 mL)
13	-1 40 min	-1 n-hexano	+1 15 g	+1 inteira	+1 1/30 (15g/450 mL)
14	+1 80 min	+1 metanol	-1 5 g	+1 inteira	-1 1/10 (5g/50 mL)
15	+1 80 min	-1 n-hexano	+1 15 g	-1 triturada	+1 1/30 (15g/450 mL)
16	-1 40 min	+1 metanol	+1 15 g	+1 inteira	-1 1/10 (15g/150 mL)

Legenda: X₁ = tempo; X₂ = polaridade; X₃=quantidade; X₄=tamanho e X₅ = m/v

Tabela XII: Matriz utilizada no planejamento fatorial 2^3 .

Corrida	X ₁	X ₂
1	+1 270 min	+1 metanol:água(1:1)
2	0 180 min	0 metanol
3	-1 90 min	+1 metanol:água (1:1)
4	-1 90 min	-1 acetato de etila
5	+1 270 min	-1 acetato de etila
6	-1 90 min	-1 acetato de etila
7	0 180 min	-1 acetato de etila
8	-1 90 min	0 metanol
9	0 180 min	+1 metanol:água(1:1)
10	+1 270 min	0 metanol
11	0 180 min	0 metanol
12	+1 270 min	+1 metanol:água(1:1)

Legenda: X₁ = tempo e X₂ = polaridade

3.7.4 Extração com fluido supercrítico

Empregou-se um equipamento de SFE de bancada com bomba de alta pressão ISCO série D, *Pump Controller, Model 500 D, Syringe pump*, e um banho ultratermostato da Nova Ética, Multitec. A **Figura 3.6** apresenta um esquema do equipamento usado.

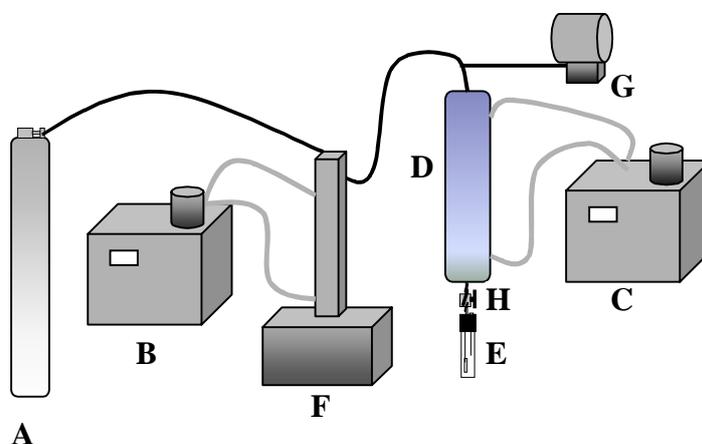


Figura 3.6: Esquema representativo do sistema de extração a altas pressões utilizado. (A) – cilindro de CO₂; (B) e (C) – banhos termostáticos; (D) - extrator; (E) – tubo coletor de vidro; (F) – bomba de alta pressão; (G) – transdutor de pressão; (H) – sistema de aquecimento.

Realizou-se um planejamento estatístico específico, conforme pode ser visualizado na **Tabela XIII**, no qual as variáveis utilizadas foram volume de solvente (3 e 6 mL), pressão (100, 150 e 200 bar) e temperatura (20, 30 e 40 °C). A quantidade de amostra foi mantida constante em 6,0 g. O tempo de extração foi de 20 minutos, sendo que em 10 minutos se retirava uma amostra e se continuava a extração por mais 10 minutos.

Tabela XIII: Planejamento estatístico da extração com fluido supercrítico (SFE)

Solvente	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
CO ₂	200	40
CO ₂	100	40
CO ₂	150	30
CO ₂	200	20
CO ₂	100	20
CO ₂ +metanol(*)	200	40
CO ₂ +metanol(*)	100	40
CO ₂ +metanol(*)	200	20
CO ₂ +metanol(*)	100	20
CO ₂ +hexano(**)	200	40
CO ₂ + acetato de etila(**)	200	40
CO ₂ +metanol(**)	200	40

(*) usando 3 mL (5%) de solvente

(**) usando 6 mL (10%) de solvente

3.7.5 Extração com líquido pressurizado (PLE)

Empregou-se um equipamento de extração acelerada com solvente ASE 300™ Dionex, mostrado na **Figura 2.5** (Página 30). Utilizaram-se células extrativas de aço inoxidável com capacidade de 34 mL, um frasco de lavagem (*rinse*) e frascos coletores de vidro transparente com capacidade de 250 mL.

Para extração acelerada com solvente (PLE), realizou-se inicialmente um planejamento estatístico fracionário 2^{4-1} (López, 1994; Barros Neto *et al.*, 2001) para cada solvente utilizado, mantendo-se fixo o solvente e avaliando-se os seguintes parâmetros:

- Tempo de extração (X₁):** avaliaram-se os efeitos resultantes da utilização de dois tempos, 10 e 20 min;
- Quantidade de amostra em massa (X₃):** analisaram-se amostras de 1 e 3 g;
- Temperatura (X₄):** estudaram-se os efeitos de duas temperaturas, 50 e 100⁰ C;

d) **Número de ciclos (X_5):** observou-se a influência do número de ciclos (1 e 3 ciclos).

A matriz utilizada compreende os oito experimentos apresentados na **Tabela XIV**. Como variável-resposta se considerou o rendimento percentual em massa de cada extração com o seguinte modelo ajustado:

$$\% \text{ Rendimento} = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_4X_4 + B_{1,1}X_1^2 + B_{1,2}X_2^2 + \dots$$

Tabela XIV: Planejamento experimental 2^{4-1} para a extração com líquido pressurizado (PLE)

exp.	X_1		X_2		X_3		X_4	
1	+1	20 min	+1	3 g	+1	100 °C	+1	3 ciclos
2	-1	10 min	+1	3 g	+1	100 °C	-1	1 ciclo
3	+1	20 min	-1	1 g	+1	100 °C	-1	1 ciclo
4	-1	10 min	-1	1 g	+1	100 °C	+1	3 ciclos
5	+1	20 min	+1	3 g	-1	50 °C	-1	1 ciclo
6	-1	10 min	+1	3 g	-1	50 °C	+1	3 ciclos
7	+1	20 min	-1	1 g	-1	50 °C	+1	3 ciclos
8	-1	10 min	-1	1 g	-1	50 °C	-1	1 ciclo

Legenda: X_1 = tempo; X_2 = massa de amostra; X_3 = temperatura; X_4 = nº de ciclos

Baseando-se nos dados deste experimento, realizou-se um segundo planejamento estatístico, utilizando, nesta etapa, um fatorial completo 2^3 , mantendo-se o tempo fixo em 10 minutos. As variáveis analisadas neste planejamento foram:

- Quantidade de amostra (X_1):** os níveis estudados foram 1 e 3 g;
- Temperatura de extração (X_2):** empregaram-se duas temperaturas, 50 e 100°C;
- Número de ciclos:** o número de ciclos utilizado foi de 1 e 3 ciclos.

A matriz utilizada, com um total de oito experimentos, está apresentada na **Tabela XV**. Neste caso se considerou também como variável-resposta o rendimento percentual em massa com o seguinte modelo ajustado:

$$\% \text{ Rendimento} = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12} X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{123}(X_1,X_2,X_3)$$

Tabela XV: Planejamento experimental 2^3 para a extração com líquido pressurizado (PLE)

exp.	X_1		X_2		X_3	
1	-1	1 g	-1	50 °C	-1	1 ciclo
2	+1	3 g	-1	50°C	-1	1 ciclo
3	-1	1 g	+1	100 °C	-1	1 ciclo
4	+1	3 g	+1	100 °C	-1	1 ciclo
5	-1	1 g	-1	50 °C	+1	3 ciclos
6	+1	3 g	-1	50 °C	+1	3 ciclos
7	-1	1 g	+1	100 °C	+1	3 ciclos
8	+1	3 g	+1	100 °C	+1	3 ciclos

Legenda: X_1 = massa de amostra; X_2 = temperatura; X_3 = n° de ciclos

Um terceiro planejamento foi realizado, utilizando-se a metodologia de superfície de resposta - modelagem. A massa foi mantida constante e as variáveis estudadas nesta etapa foram temperatura (50 °C, 75 °C e 100 °C) e número de ciclos (1, 2 e 3), sendo 75 °C e 2 ciclos o ponto central, como está apresentado na **Tabela XVI**. Para a avaliação estatística dos resultados utilizou-se o programa *Statistica para Windows* versão 6.0.

Tabela XVI: Planejamento experimental por superfície de resposta - modelagem para a extração com líquido pressurizado (PLE)

exp.	X_1		X_2	
1	-1	50 °C	-1	1 ciclo
2	+1	100 °C	-1	1 ciclo
3	-1	50 °C	+1	3 ciclos
4	+1	100 °C	+1	3 ciclos
5	0	75 °C	0	2 ciclos
6	0	75 °C	0	2 ciclos
7	0	75 °C	0	2 ciclos

Legenda: X_1 = temperatura e X_2 = número de ciclos

Para poder comprovar qual a melhor temperatura, foi realizado um quarto

planejamento utilizando-se a metodologia de superfície de resposta – deslocamento. Manteve-se fixo a massa (1 g), o tempo (10 min) e variou-se a temperatura em 75, 85 e 95 °C. O experimento foi repetido nas mesmas condições, mantendo-se a massa fixa em 3g.

3.8 Fracionamento cromatográfico dos extratos metanólicos

Devido à natureza complexa dos extratos obtidos com metanol, decidiu-se fracioná-los antes de proceder a sua análise cromatográfica.

Para o fracionamento dos extratos metanólicos obtidos a diferentes tempos de extração, utilizou-se a técnica desenvolvida por Wang *et al.* (1994), com algumas modificações propostas por Da Luz (1998).

Empregou-se sílica gel como fase estacionária e n-hexano, hexano-benzeno, diclorometano, acetato de etila e metanol como solventes de eluição, de acordo com o esquema geral representado na **Figura 3.7**.

3.8.1 Procedimento

Em uma coluna de vidro (40 cm x 11 mm) contendo 3,0 g de sílica previamente ativada e empacotada a seco, adicionou-se uma camada de 0,5 cm de sulfato de sódio anidro (aproximadamente 1,0 g), condicionando com 20 mL de n-hexano. A 500 mg de extrato adicionou-se 1,0 g de sílica, misturou-se bem e colocou-se na parte superior da coluna. A coluna foi eluída com 20 mL de cada solvente, obtendo-se cinco frações de cada extrato, separadamente, os quais foram concentrados em atmosfera de nitrogênio e mantidos em dessecador, com sílica gel, até verificar-se que atingiram peso constante.

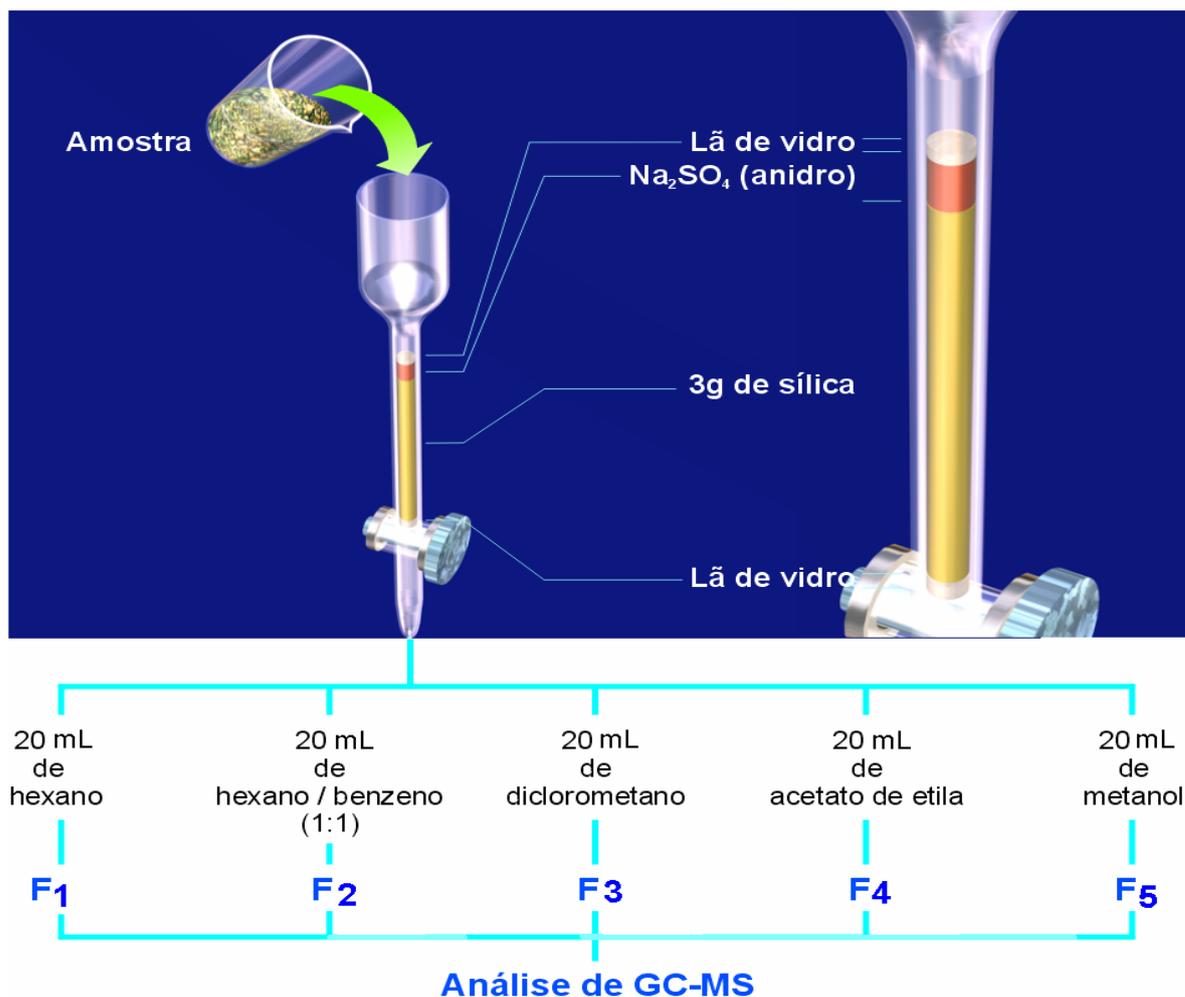


Figura 3.7: Esquema do fracionamento cromatográfico em sílica gel

As frações de acetato de etila e metanol, as quais devem conter compostos polares, foram derivatizadas para sua posterior análise, empregando BF_3 em metanol como agente modificador (Lanças, 1993).

3.8.2 Derivatização com metanol/ BF_3

Este procedimento baseia-se em uma reação clássica de esterificação com metanol, catalisada pelo trifluoreto de boro (Hermann 1964; Metcalf *et al.*, 1961 e 1966). O produto foi submetido a uma extração líquido-líquido (éter de petróleo - água), considerando-se que a fase orgânica contém o éster metílico desejado, de acordo com a reação apresentada na **Figura 3.8**.

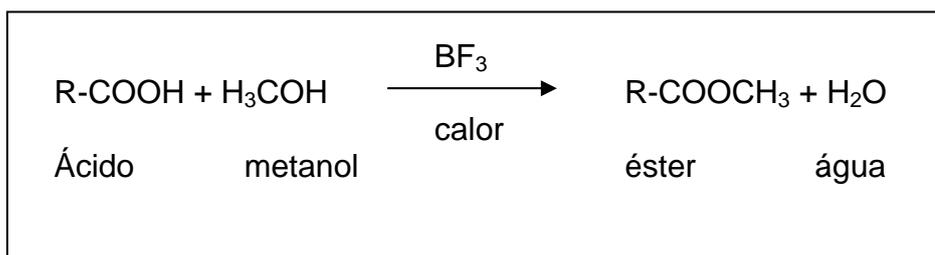


Figura 3.8: Reação genérica de esterificação de um ácido orgânico.

Em um tubo de ensaio, foram colocados 100 mg da fração a ser derivatizada e 3 mL de trifluoreto de boro (BF_3) dissolvido em metanol (Sigma-Aldrich). A mistura permaneceu em ebulição por dois minutos em banho Maria sendo então transferida para um funil de separação contendo 30 mL de éter de petróleo (p.a. Merck). Foram adicionados 20 mL de água destilada, mantendo-se a mistura sob agitação por um minuto para permitir uma melhor interação entre as fases. A fase aquosa (inferior) foi descartada e a orgânica (superior) foi filtrada em papel de filtro. A amostra foi concentrada em evaporador rotatório.

3.9 Análise dos extratos pelo sistema acoplado cromatografia gasosa / espectrometria de massas (GC-MS)

Todas as frações foram analisadas pelo sistema acoplado GC-MS com os equipamentos e nas condições descritas na **Tabela XVII**. Os espectros de massas obtidos para cada composto foram comparados com os da biblioteca do equipamento, para fins de identificação tentativa, utilizando-se também alguns padrões cromatográficos.

As análises cromatográficas foram também realizadas usando o detector de massas no modo SIM (*Single Ion Monitoring*), que realiza o monitoramento de íons selecionados, para confirmar a presença de alguns compostos que haviam sido identificados no modo de varredura de espectro (SCAN). A análise por GC-MS no modo SIM permitiu que alguns compostos fossem quantificados. Para esta quantificação a programação de temperatura foi modificada a fim de se ter uma

análise mais rápida. Estas novas condições estão também apresentadas na **Tabela XVII**. Para seleccionar os íons a serem monitorados, analisou-se o espectro de massas de cada composto, ou classe de compostos tentativamente identificados e realizou-se nova injeção da amostra marcando estes íons. Tem-se, desta forma, a transformação do espectrômetro de massas de detector universal para detector seletivo. O cromatograma resultante (MIC – *Monitoring Ion Chromatogram*) difere do cromatograma inicial (TIC – *Total Ion Chromatogram*) por apresentar maior sensibilidade, maior seletividade e menor número de picos.

Tabela XVII: Condições cromatográficas usadas na análise dos extratos

parâmetros e condições gerais		
equipamento	sistema GC/MS-QP5050-A, Shimadzu	
coluna capilar	OV-05 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) metil silicone com 5 % de grupos fenila	
gás de arraste	helio (1,5 mL/min)	
modo de injeção	split 1:40	
ionização	impacto electrónico com 70 eV	
volume injetado	1 µL	
aquisição	modo SCAN	modo SIM
temperatura do detector	280 °C	280 °C
temperatura do injetor	280 °C	300 °C
temperatura inicial	50 °C	200 °C
tempo inicial	2 min	0 min
taxa de aquecimento 1	5 °C/min	3 °C/min
temperatura final 1	----	220 °C
taxa de aquecimento 2	----	20 °C/min
temperatura final	280 °C	300°C
tempo final	50 min	10 min

3.10 ANÁLISE QUANTITATIVA

Os extratos obtidos por extração supercrítica (SFE) e por extração com líquido

pressurizado (PLE ou ASE) foram submetidos à análise cromatográfica quantitativa, usando o sistema GC/MS no modo SIM, para a determinação da concentração de alguns compostos na planta em estudo.

Usou-se o método de padronização segundo (Lanças, 1993) com diferentes padrões, de acordo com a **Tabela XVIII**. Por razões técnicas, alguns padrões só puderam ser testados nos extratos obtidos por PLE, conforme pode ser visto nesta **Tabela**, a qual também contém a fórmula molecular, peso molecular e principais íons usados na quantificação via GC/MS-modo SIM

Tabela XVIII: Principais características dos padrões usados na análise quantitativa dos extratos de flores de *Hibiscus tiliaceus* L.

composto	íons	fórmula molecular	peso molecular
perileno (Padrão Interno)	252	C ₂₀ H ₁₂	252
octadecano	71	C ₁₈ H ₃₈	254
nonadecano	71	C ₁₉ H ₄₀	268
eicosano	71	C ₂₀ H ₄₂	282
eneicosano	71	C ₂₁ H ₄₄	296
docosano	71	C ₂₂ H ₄₆	310
tricosano	71	C ₂₃ H ₄₈	324
tetracosano	71	C ₂₄ H ₅₀	338
vitamina E	165	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430
fitol	81	C ₂₀ H ₄₀ O	296
estigmasta-5-en-3-ol (estigmasterol)	55	C ₂₉ H ₄₈ O	402
estigmastanol	55	C ₃₁ H ₅₄ O ₂	458
acetato de stigmasterol	55	C ₃₁ H ₅₀ O ₂	454
estigmasta-4-22-dien-3-ona	55	C ₂₉ H ₄₆ O	410
palmitato de metila	74	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
estearato de metila	74	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	284
linoleato de metila (*)	67	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	280
araquidato de metila (*)	74	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	298
docosanoato de metila (*)	74	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	312
lignocerato de metila (*)	74	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	328

(*) usados apenas na quantificação dos extratos obtidos por PLE

Para os cálculos relativos à análise quantitativa dos extratos foram usadas as seguintes equações:

$$FR_i = C_i(sp) / A_i(sp)$$

(equação 1)

Onde FR_i = fator de resposta do composto i

$C_i(sp)$ = concentração do composto i na solução padrão

$A_i(sp)$ = área do pico cromatográfico correspondente ao composto i na solução padrão

$$FRR_i = FR_i / FR_{pi}$$

(equação 2)

Onde FRR_i = fator de resposta relativo do composto i

FR_{pi} = fator de resposta do padrão interno

$$C_i = m_i / m_{droga} = (A_i \times m_{pi}) / (FRR_i \times A_{pi} \times m_{droga})$$

(equação 3)

Onde C_i = concentração do composto i na planta analisada

m_i = massa composto i no extrato analisado

m_{droga} = massa de droga (planta) usada para obter o extrato

A_i = área do pico cromatográfico correspondente ao composto i no extrato

m_{pi} = massa de padrão interno usada em cada extrato analisado

A_{pi} = área do pico cromatográfico correspondente ao padrão interno colocado no extrato analisado

3.11 Avaliação do efeito antioxidante dos extratos

Analisou-se a atividade antioxidante a partir dos extratos obtidos das flores de *Hibiscus*, por extração sucessiva, com n-hexano, acetato de etila, metanol e mistura metanol – água (1:1), usando-se o método de determinação do potencial antioxidante reativo total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR) empregando-se o método de quimiluminescência (Lissi, 1992).

3.11.1 Determinação de TRAP E TAR

O potencial antioxidante reativo total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR) foram medidos através da quimiluminescência emitida por luminol (Lissi *et al.*, 1992). O meio de reação consistiu do tampão glicina 100 mM (pH 8,6), 10 mM de 2,2'-azo-bis (2 amidinopropano) (ABAP) e 4,0 mM de luminol. A incubação da mistura à temperatura ambiente gera luminescência praticamente constante, que se mede diretamente em um contador cintilográfico Wallac 1409 (*Liquid Scintillation Counters*). Foram adicionadas diversas porções (5 a 10 μ L) dos extratos de n-hexano, acetato de etila, metanol e mistura metanol —água (1:1) ao sistema ABAP- luminol.

O sistema foi calibrado usando o análogo da vitamina E, Trolox (200 nM). A comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e dos extratos da planta permitiu obter valores de TRAP em equivalentes de concentração de Trolox necessária para suprimir a luminescência emitida.

Os valores de TAR foram determinados medindo-se a queda inicial da luminescência do luminol depois da adição de uma pequena alíquota de amostra. As condições para a determinação de medidas de TAR foram as seguintes: tampão glicina 100 mM (pH 8.6), 2 mM de 2,2'- azo-bis(2-amidinopropano) (ABAP) e 6 mM de luminol. A quimiluminescência foi medida à temperatura ambiente em um contador cintilográfico Wallac 1409. O Trolox (20 nM) foi usado como padrão.

Os valores de TRAP foram medidos empregando-se a equação:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = (\sum n_i [x]_i) / n_{\text{trolox}}$$

Onde o somatório é calculado para todos os oxidantes presentes, n_i é o número de radicais livres por molécula de antioxidante e $[x]_i$ é a concentração de antioxidante no fluido testado.

O valores de TRAP para o extrato da planta foram determinados pela concentração de antioxidantes e pelos respectivos valores de trolox (n_i/n_{trolox}).

TAR é definido como:
$$\text{TAR } (\mu\text{M Trolox}) = (\sum k_i [x]_i) / k_{\text{trolox}}$$

Onde k_i é a reatividade dos compostos em relação aos radicais armazenados.

Os índices TAR refletem a capacidade de captura do elétron transferido no processo de radicais livres do luminol.

A eficiência do extrato antioxidante e a concentração necessária para o decaimento inicial da luminescência em 50% foram avaliadas por i_0 / i , onde i_0 e i são a intensidade de luminescência antes e depois da varredura.

3.12 Avaliação mutagênica do extrato aquoso

A avaliação da mutagenicidade do extrato foi realizada pelo teste *Salmonella*/microssoma (Teste de Ames). Este teste foi realizado com o extrato metanólico obtido a partir das flores de *H. tiliaceus* L., partindo de 0,0604 g do extrato exatamente pesado, ao qual se adicionou 500 μ L de água para obter uma solução mãe (SM). A partir da SM foi realizada uma série de diluições que permitiram analisar cinco quantidades diferentes de extrato com o mesmo volume final: 1000, 500, 200 e 100 μ g.

A avaliação foi realizada com duas linhagens mutantes de *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA102), fornecidas por B. Ames da Universidade da Califórnia, EUA. O crescimento das linhagens do ensaio deu-se em meio líquido completo (NB), contendo 8% de meio nutriente (Laboratórios Oxoid LTD, Inglaterra).

Para este ensaio, foi empregado um meio (MM) constituído por glicose a 40% (50 ml) e meio E de Vogel-Bonner (20 ml) —sulfato de magnésio a 1%, ácido cítrico monohidratado a 10%, fosfato de potássio dibásico a 50%, fosfato de sódio e amônio a 17,5% — solidificado com 1,5% de agar (Laboratorios Difco, EUA). Para cada placa foram utilizados 30 ml da mistura do meio MM e do meio E.

Para a semeadura utilizou-se ágar superfície, que contém 0,6% de ágar (Laboratórios Oxoid LTD, Inglaterra) e 0,5% de cloreto de sódio, suplementados com ou acrescidos de 10% de solução de histidina e biotina (0,5 mM).

Como controle negativo empregou-se água destilada e, como controles positivos, azida sódica (5 μ g/placa) para as linhagens tratadas sem metabolização

(-S9) e aflatoxina-B (10 µg/placa) para as tratadas em presença de ativação metabólica (+S9) (S9 = extrato de fígado de rato, descrito pela Corporação de Toxicologia Molecular, Maryland, EUA); para o controle de toxicidade do solvente utilizou-se meio NB (meio líquido completo). Os controles positivos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) anidro, grau espectrofotométrico.

O crescimento das linhagens provenientes da placa mãe deu-se em meio NB (meio líquido completo), ao qual se adicionou, para cada 100 mL, 1 mL de solução de ampicilina (8 mg mL⁻¹ em NaOH 0,02 molL⁻¹). As linhagens cresceram, até alcançar a fase estacionária de crescimento (FEC) (1 - 2 x 10⁹ células mL⁻¹), em banho-maria a 37 °C, ao abrigo da luz e com sistema de aeração. A densidade de crescimento das linhagens foi estimada pela média da turbidez em um espectrofotômetro modelo B393 Micronal, e correspondeu a uma absorvância de 0,5 no comprimento de onda de 650 nm.

O procedimento utilizado para esta avaliação toxicológica foi o de pré-incubação descrito por Maron e Ames (1983), tanto em presença como em ausência de mistura de ativação metabólica S9. Os tubos de ensaios estéreis e protegidos da luz contendo, em triplicata, as diferentes concentrações do extrato e os controles, foram incubados em banho-maria sem agitação, com 100 µL de um cultivo bacteriano em FEC (fase estacionária de crescimento), durante 20 min, à temperatura de 37° C. Nos ensaios com ativação metabólica, além dos 100 µL do cultivo bacteriano, adicionaram-se 500 µL de S9 aos tubos de ensaio.

Depois do período de incubação, acrescentaram-se aos tubos de ensaio 2 mL de ágar superfície, previamente fundido e estabilizado a 46 °C, suplementado com uma solução de histidina (0,5 mM). O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado em agitador tipo vortex e derramado sobre a superfície de uma placa contendo meio MM (meio mínimo – 30 mL/placa).

O número de colônias por placa foi contado depois de 48 h de incubação a 37 °C para obter-se a curva dose/resposta. Os dados obtidos, avaliados como número de colônias induzidas por µL equivalentes de amostra, foram analisados estatisticamente através do programa estatístico *Salmonel*, versão 98.

4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em etapas, objetivando facilitar a compreensão dos mesmos. Será usada a seguinte ordem:

1ª. Parte: Caracterização inicial da planta estudada: nesta etapa serão apresentados os resultados da análise de minerais e da análise fitoquímica das flores de *H. tiliaceus* L.

2ª Parte: Otimização dos métodos de extração: nesta etapa serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento das metodologias de extração por ultra-som, extração com fluido supercrítico e extração acelerada com solvente.

3ª Parte: Comparação entre os métodos de extração: nesta etapa serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na comparação dos métodos desenvolvidos para a extração e aqueles métodos considerados clássicos, como a extração por maceração e a extração com Soxhlet.

4ª Parte: Estudo bioquímico da qualidade do extrato: nesta etapa do trabalho serão relatados e discutidos os resultados obtidos na determinação da atividade antioxidante e da mutagenicidade dos extratos obtidos.

4.1 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS - 1ª PARTE: CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS FLORES DE *H.tiliaceus* L.

Para a droga objeto de estudo, “flores de *H. tiliaceus*”, foram determinados os parâmetros de qualidade: umidade residual e cinzas totais, e a média dos resultados está apresentada na **Tabela XIX**.

Tabela XIX: Valores médios de cinzas e umidade para as flores de *H.tiliaceus* L.

	Valor obtido (%)	Valor informado (%)
Umidade residual	6,18	Máx. 10
Cinzas totais	7,1	Máx. 2*

* Está na dependência do órgão vegetal analisado

O valor para a umidade residual se encontra dentro do estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1992), para drogas vegetais e, tendo em conta que o órgão vegetal estudado está constituído pelas flores, considera-se adequado, uma vez que uma porcentagem de umidade superior pode causar deterioração por contaminação microbiana e transformações químicas dos metabólitos secundários.

Com respeito ao valor obtido para as cinzas totais o mesmo pode ser considerado extraordinariamente elevado, não somente por ser superior ao estabelecido (WHO, 1992), mas porque a droga está constituída somente pelas flores desta espécie.

Os valores informados para este parâmetro podem variar numa ampla faixa, tendo-se em conta que vão depender da composição de minerais no solo onde cresce a espécie e da capacidade que tenha esta de absorver os mesmos através das raízes. Não obstante, quando uma espécie vegetal exhibe valores

elevados de cinzas totais, se faz imprescindível a caracterização destas, para verificar se nelas não há presença de metais pesados.

H. tiliaceus, em geral cresce em mangues e esta espécie em particular se encontra muito próxima ao mar, em lugares muito úmidos, banhados por água salobra tornando-se relevante determinar a composição em metais da espécie e assim conhecer a composição química das cinzas obtidas. Os resultados para a determinação de metais nas cinzas totais, estão apresentados na **Tabela XX**.

Tabela XX: Resultados da análise dos macro e micro nutrientes nas amostras das flores de *H. tiliaceus* L.

Elemento	Conc. (%)	Limites* (%)	Elemento	Conc. (mg/kg)	Limites (mg/kg)	Elemento	Conc. (µg/kg)	Limites* (µg/kg)
N	2,1	0,5-5	Cu	16	20	Pb	581	10 000**
P	0,25	0,08-1,5	Zn	32	10-100	Cd	81	300**
K	2,5	0,2-10	Fe	227	20-1000	Hg	< 2	10
Ca	0,44	0,05-2,5	Mn	101	20-1000	Pb, Ni, Cd, Cr; determinados em forno de grafite Hg determinado por vapor a frio		
Mg	0,33	0,02-1,55	Ni	1,8	2-10			
Na	0,13	0,2-10	Cr	1,9	2-10			
S	0,12	0,05-1,2	Resultados expressos em material seco à 75 ⁰					

*Tabatai e Bremner, 1970; Bremner e Mulvaney, 1982, **WHO, 1992

Através da análise desta **Tabela** verifica-se que a droga apresenta um conteúdo de nitrogênio considerado elevado para flores, encontrando-se, entretanto, dentro do limite estabelecido (0,5 – 5 %) para espécies vegetais.

Dos macro elementos, o de maior percentual foi o ferro, (227 mg/kg), seguido do manganês (101 mg/kg), zinco (32 mg/kg) e cobre (16 mg/kg), ainda que todos eles se encontrem dentro dos limites estabelecidos na literatura.

Com respeito aos elementos pesados, o chumbo foi o que apresentou a maior concentração (581 µg/kg), ainda que este valor não ultrapasse o limite estabelecido para as drogas vegetais.

Os valores obtidos para a composição e concentração dos minerais presentes na droga objeto de estudo, não influem na sua potencial utilização na medicina tradicional, já que seus principais elementos não apresentam toxicidade, e aqueles que poderiam apresentá-la se encontram dentro dos limites estabelecidos para drogas vegetais.

Soto (1992) estudou a concentração em nutrientes das folhas de *H. tiliaceus*, informando valores similares aos aqui apresentados para as flores. Este autor atribui a composição em nutrientes observada para a espécie, à alta salinidade do solo onde esta se desenvolve, assim como as características específicas da espécie de captar os nutrientes do meio. Esta espécie tem a facilidade de absorver minerais do solo e de transportá-los de um órgão vegetal a outro em função da maturação das folhas.

Outro aspecto avaliado no estabelecimento dos parâmetros de qualidade foi a composição dos metabólitos secundários, detectados através do estudo fitoquímico. Para as flores da espécie foi possível detectar-se: gorduras, triterpenos-esteróides, taninos, flavonóides, antocianidinas, quinonas e compostos redutores conforme pode ser visualizado na **Tabela XXI**.

A composição fitoquímica determinada para a espécie, concorda com o informado por Sankara *et al.* (1961), e Nair *et al.* (1961), no que se refere ao ensaio de flavonóides e compostos redutores, já que estes autores informam a presença dos flavonóides e seus glicosídeos.

Com respeito aos demais componentes detectados, não foram encontradas referências anteriores, uma vez que para a composição química da espécie em geral e das flores em particular, existe pouca informação na literatura.

Tabela XXI: Resultados da análise qualitativa de componentes por ensaios fitoquímicos

ENSAIOS	COMPOSTO	EXTRATO		
		etéreo	alcoólico	hidro-alcoólico
Sudan	azeites e gorduras	+	-	na
Dragendorff	alcalóides	-	-	-
Mayer	alcalóides	-	-	-
Wagner	alcalóides	-	-	-
Baljet	lactones e cumarinas	-	-	na
Liebermann- Burchard	triterpenos-esteróides	-	-	na
Espuma	saponinas	na	-	-
Cloreto férrico	fenóis e taninos	na	+	+
Resinas	resinas	na	-	na
Shinoda	flavonóides	na	+	+
Antocianidina	antocianidinas	na	+	na
Catequinas	catequinas	na	-	na
Bornträger	quinonas	na	+	na
Fehling	compostos redutores	na	+	+
Ninhidrina	aminoácidos	na	-	na
Kedde	cardiotônicos	na	-	na

(-) resultado negativo; (+) resultado positivo; (na) não se aplica

4.2 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS - 2ª PARTE: OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

4.2.1 Extração por ultra-som

4.2.1.1 Estudo de alguns parâmetros que influem no processo de extração

Para se estudar a influência do tempo de extração, do tamanho da partícula, da capacidade extrativa do solvente, da quantidade de amostra e da relação quantidade de amostra / volume de solvente, aplicou-se um modelo de experimento 2^{5-1} com dois níveis extremos para cada variável e considerou-se, como variável resposta, a porcentagem em rendimento da extração.

Ao processar os resultados e discriminar os coeficientes significativos, substituindo os valores dos respectivos coeficientes, obteve-se a seguinte equação com as variáveis codificadas:

$$\text{Rendimento (\%)} = 4,27 + 0,431 X_1 + 1,70X_2 + 1,06X_5 + 0,634X_1X_3 + 0,734 X_4X_5$$

A análise da equação obtida para o modelo permitiu observar que a variável X_1 (tempo de extração) manifestou um efeito positivo (+0,431 X_1), indicativo de uma relação diretamente proporcional entre o tempo de extração e o rendimento, condição que se cumpre para outros métodos de extração sólido — líquido (Ahmed, 2003).

A variável X_2 (polaridade do solvente) demonstrou também um efeito positivo (+1,700 X_2): quanto maior a polaridade, maior o rendimento. Este

comportamento pode estar sendo determinado pela natureza dos metabólitos secundários presentes na espécie objeto de estudo, ainda que não se possa descartar que, neste método, as ondas ultra-sônicas se propagam no solvente e que esta propagação possa ser favorecida pela polaridade do mesmo.

Outra variável que manifestou efeito positivo (+1,060) foi X_5 (relação massa / volume de solvente); ela é conhecida como um fator atuante em todos os processos convencionais de extração sólido — líquido.

As variáveis X_4 (tamanho de partícula) e X_3 (quantidade de amostra) não influíram de forma significativa para este processo de extração pois, diferentemente de outros métodos de extração sólido — líquido, uma maior superfície de contato (menor tamanho de partícula) não é determinante na quantidade de substância a extrair. Entretanto, as inter-relações das variáveis X_1X_3 (tempo e quantidade) e entre X_4X_5 (tamanho de partícula e relação massa / solvente) manifestaram efeitos positivos, indicativos de que a uma maior quantidade de amostra corresponde maior tempo de extração e a um maior tamanho de partícula, maior relação massa / solvente.

Os resultados experimentais para este modelo são mostrados na **Tabela XXII**, mediante os quais se demonstra que, para este método de extração, obtém-se melhores rendimentos com o emprego do menor tempo, da maior temperatura e da maior relação massa / solvente.

A **Figura 4.1** mostra a análise da adequação do modelo matemático (modelo fatorial 2^{5-1}), para a extração por ultra-som através da comparação entre os valores de rendimento experimental e teórico. Observa-se que, para alguns experimentos (2, 6, 10, 11, 14, 9, 13 e 16) ocorreu adequada aproximação entre o modelo experimental e o teórico, sendo que no experimento 9, onde todos os parâmetros apresentavam o maior valor, obteve-se o maior rendimento.

Tabela XXII: Variação do rendimento em massa de acordo com as variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^{5-1} : comparação entre o valor teórico e o obtido experimentalmente

Exp.	Parâmetros					Rendimento (%)	
	X_1 (min)	X_2	X_3 (g)	X_4	X_5 (g/ml)	experimental	modelo
1	180	hexano	15	triturada	1:30	4,53	3,96
2	180	hexano	5	triturada	1:10	2,00	2,03
3	40	metanol	5	inteira	1:30	9,00	7,98
4	40	hexano	15	triturada	1:10	2,00	1,16
5	40	hexano	15	inteira	1:30	2,26	3,29
6	180	hexano	5	inteira	1:30	4,40	4,16
7	40	hexano	5	triturada	1:30	2,20	3,09
8	180	metanol	5	inteira	1:10	5,00	3,98
9	180	metanol	15	inteira	1:30	9,40	8,85
10	40	metanol	5	triturada	1:10	5,80	5,85
11	40	hexano	5	inteira	1:10	1,20	0,96
12	180	metanol	15	triturada	1:10	5,20	6,71
13	40	metanol	15	triturada	1:30	5,73	5,24
14	180	hexano	15	inteira	1:10	1,93	1,83
15	180	metanol	5	triturada	1:30	5,20	6,11
16	40	metanol	15	inteira	1:10	2,53	3,11

X_1 (tempo de extração em minutos), X_2 (solvente); X_3 (massa de amostra); X_4 (tamanho), e X_5 (razão massa/volume)

Considerando estes resultados e buscando analisar com mais profundidade o comportamento do método, aplicou-se um desenho fatorial 2^3 , no qual as variáveis foram o tempo de extração (X_1) e a polaridade (X_2), analisando-se, de cada um deles, três níveis. Estabeleceu-se como variável resposta também o rendimento percentual em massa.

Para este experimento (2^3), mantiveram-se constantes o tamanho de partícula (planta moída) e a relação (massa de planta)/(volume de solvente) (1:10) e determinou-se para cada variável um nível “zero” como sendo os melhores resultados obtidos no modelo anteriormente analisado (tempo de 180 minutos e

metanol como solvente). Para os níveis codificados como “-1” e “+1”, consideraram-se valores inferiores e superiores a estes.

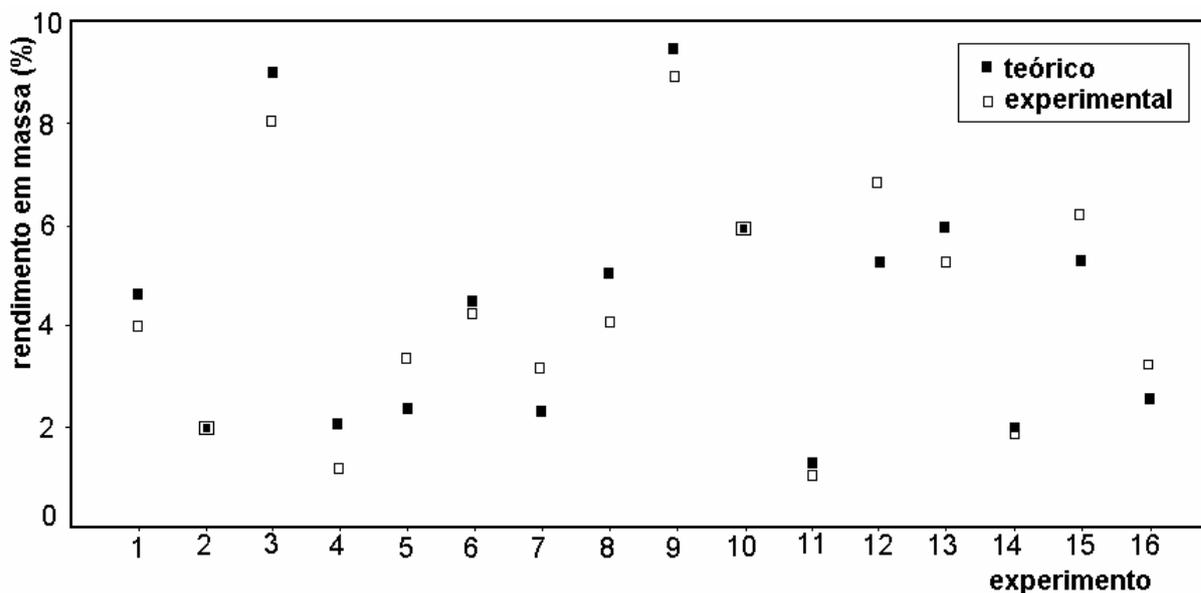


Figura 4.1: Comparação entre os valores obtidos para o rendimento em massa do processo ultrassônico e aqueles previstos segundo o modelo teórico

Processados os resultados para o desenho fatorial 2^3 e discriminados os coeficientes significativos, obteve-se a seguinte equação com as variáveis codificadas:

$$\text{Rendimento} = 11,56 + 7,13X_2$$

Na análise da equação do modelo, observou-se que a polaridade do solvente (X_2) foi a variável mais significativa, manifestando um efeito positivo sobre o processo ($+7,13X_2$) e que, neste experimento, o tempo de extração (X_1) não influenciou sobre o rendimento. Os resultados experimentais para o modelo são mostrados na **Tabela XXIII**.

Tabela XXIII: Variação do rendimento em massa de acordo com as variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 : comparação entre o valor teórico e o obtido experimentalmente

experimento	variáveis e valores				rendimento em massa (%)	
	X_1		X_2		experimental	teórico
1	(-1)	90	(-1)	AcOEt	3,00	4,42
2	(0)	180	(-1)	AcOEt	4,00	4,42
3	(+1)	270	(-1)	AcOEt	7,80	4,42
4	(-1)	90	(0)	MeOH	8,00	11,58
5	(0)	180	(0)	MeOH	11,60	11,42
6	(+1)	270	(0)	MeOH	12,50	11,56
7	(-1)	90	(+1)	MeOH-H ₂ O	20,80	18,69
8	(0)	180	(+1)	MeOH-H ₂ O	16,80	18,69
9	(+1)	270	(+1)	MeOH-H ₂ O	18,00	18,69
1 ^{'*}	(-1)	90	(-1)	AcOEt	4,20	4,42
5 ^{'*}	(0)	180	(0)	MeOH	11,24	11,42
9 ^{'*}	(+1)	270	(+1)	MeOH-H ₂ O	20,45	18,69

X₁ (tempo de extração em minutos), X₂ (solvente) () duplicata dos experimentos 1 (-1,-1), 5 (0,0) e 9 (+1,+1).
MeOH = metanol; AcOEt = acetato de etila; MeOH-H₂O = metanol / água (1:1)*

Observou-se que quando a polaridade do solvente é aumentada de metanol para a mistura metanol/água (1:1) os rendimentos crescem. Entretanto, para a mistura metanol/água, os rendimentos não apresentam diferenças significativas nos tempos de 90 e 270 minutos (experimentos 7 e 9), tendo um valor mais baixo de rendimento no ponto intermediário (experimento 8). Analisando os extratos obtidos com o solvente de menor polaridade (acetato de etila), obtiveram-se rendimentos crescentes dos 90 e aos 270 minutos (experimentos 1, 2 e 3). Quando o solvente empregado é o metanol, observa-se também um aumento do rendimento em função do tempo (experimentos 4, 5 e 6).

Como pode ser visualizado nesta **Tabela**, a repetitividade do processo foi testada em três pontos, representados pelos experimentos 1', 5' e 9'. Os

resultados obtidos experimentalmente mostram uma boa concordância entre os valores de rendimento nestes experimentos.

Na **Figura 4.2** tem-se a análise da adequação do modelo matemático (modelo fatorial 2^3), para a extração por ultra-som através da comparação entre os valores de rendimento experimental e teórico. Observa-se que os ensaios 5 e 5', nos quais se empregou o metanol como solvente e um tempo de extração de 180 minutos, foram os que apresentaram maior aproximação entre o modelo teórico e o experimental.

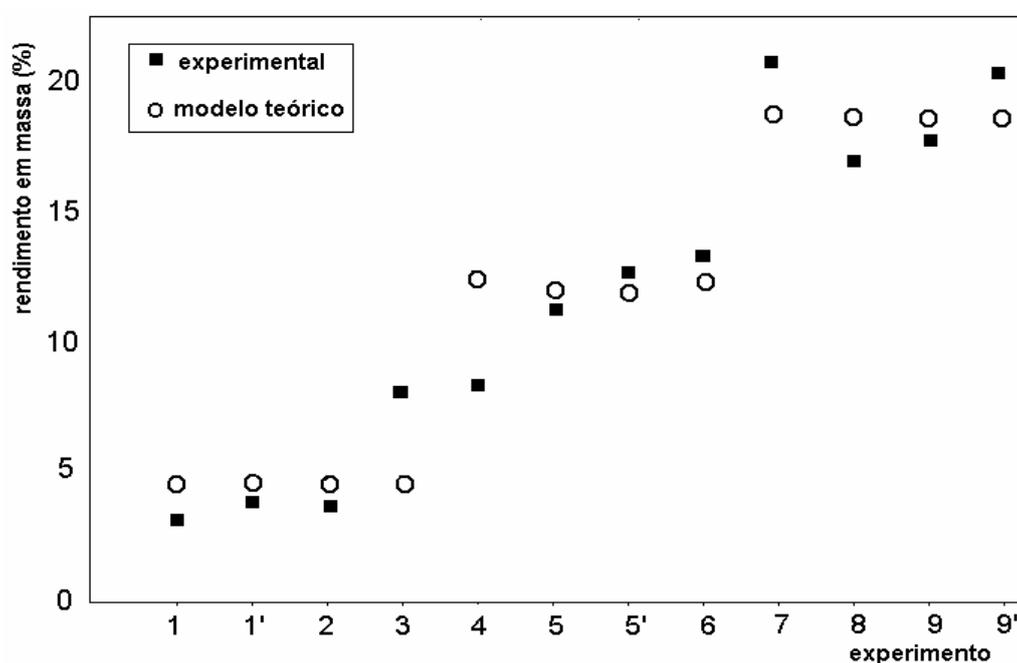


Figura 4.2: Comparação gráfica entre os resultados experimentais e teóricos para o planejamento fatorial 2^3

Tendo em conta os resultados dos dois modelos, que assinalaram o metanol como o solvente de melhores características, decidiu-se pela continuação do trabalho com este solvente.

Já que no modelo fatorial 2^3 a influência do tempo de extração sobre o rendimento manteve-se inalterada para o solvente metanol, realizou-se um experimento no qual se mantiveram constantes a quantidade de amostra (5 g), a relação massa/solvente (1:4) e o solvente (metanol), variando-se o tempo de

extração (de 60 a 340 minutos, com diferenças de 40 minutos entre os tempos). Os resultados são apresentados na **Tabela XXIV**.

Tabela XXIV: Influência do tempo de extração sobre o rendimento em massa para a extração por ultra-som usando metanol como solvente extrator

experimento	tempo (min.)	rendimento (%)
1	60	9,82
2	100	10,25
3	140	12,82
4	180	12,84
5	220	12,96
6	260	15,57
7	300	17,10
8	340	14,60

Nesta tabela se observa que à medida que aumenta o tempo de extração (até os 300 minutos), cresce o rendimento; a partir desse tempo, verifica-se uma ligeira diminuição do rendimento.

Também a destacar neste ensaio: de 140 até 220 minutos, o aumento de rendimento foi discreto, sendo significativo dos 260 aos 300 minutos.

Os resultados deste experimento confirmaram: sendo o metanol o solvente empregado, o tempo influi sobre o rendimento da extração, influência esta que se evidencia quando os tempos empregados vão de 60 a 140 minutos e de 220 a 300 minutos. Em tempos superiores a 300 minutos, observou-se uma diminuição de rendimento que somente pode ser explicada se consideradas as possíveis transformações resultantes da influência das ondas sonoras.

A **Figura 4.3** apresenta de forma gráfica a variação do rendimento com o tempo de extração para o metanol.

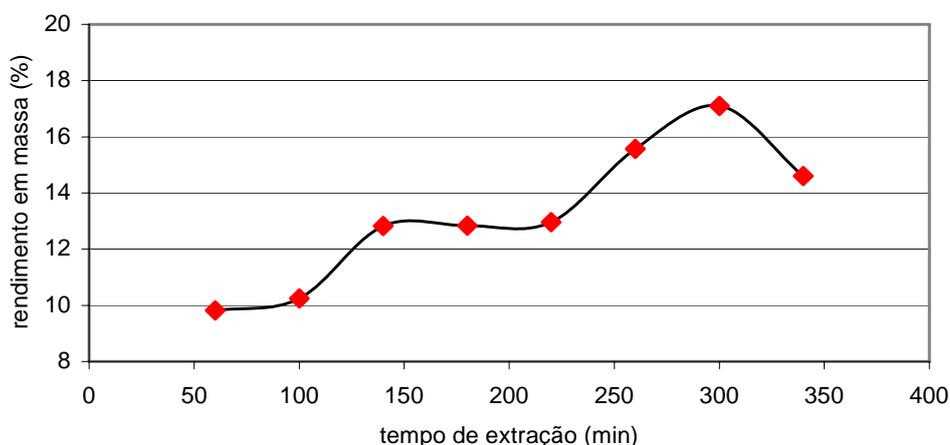


Figura 4.3: Variação do rendimento em massa com o tempo de extração, para o processo de extração de *H. tiliaceus* L. usando ultra-som com metanol.

Este fenômeno de eventual quebra de ligações e formação de novos produtos é, precisamente, uma das limitações assinaladas para esta técnica em seu emprego na extração de produtos naturais. Em função dessa limitação — o aumento do tempo de extração pode provocar quebra de moléculas — e uma vez estabelecidas as condições de extração pelos modelos estatísticos aplicados, é de vital importância analisar os extratos obtidos para detectar possíveis alterações em sua composição. Decidiu-se então estudar independentemente todos os extratos metanólicos obtidos com diferentes tempos de extração, submetendo-os a um fracionamento cromatográfico (**Figura 3.7**, página 60). Cada fração obtida foi analisada pelo sistema acoplado GC-MS, sendo essas frações comparadas entre si.

4.2.1.2 Estudo analítico do extrato metanólico fracionado

Os extratos metanólicos obtidos no último planejamento experimental (com a variação do tempo de extração de 60 a 340 minutos) foram submetidos ao fracionamento cromatográfico e suas frações foram cromatografadas no sistema GC-MS. Os resultados são discutidos a seguir.

4.2.1.2.1 Frações separadas com n-hexano

Na **Tabela XXV** tem-se os compostos identificados para cada um dos cromatogramas do íon total (TIC) das frações separadas com n-hexano a partir dos extratos metanólicos obtidos a diferentes tempos.

Como aspecto importante, observou-se que esta fração estava composta por hidrocarbonetos que, apesar de não apresentarem solubilidade em solventes polares, foram arrastados no processo de extração. A caracterização destes compostos, dada sua escassez em espécies vegetais, foi confirmada pelo emprego de padrões.

Por outra parte, verificou-se que as frações dos extratos obtidos em tempos de 60 a 140 minutos apresentavam composição semelhante, diferenciando-se, fundamentalmente, nas intensidades de seus picos cromatográficos e nos rendimentos da extração. Entretanto, aos 180 minutos, diminuía a amplitude de alguns picos cromatográficos que, em determinados casos, não puderam ser detectados. Este fato repetia-se, em diferentes graus, para os diferentes tempos.

A identificação dos hidrocarbonetos saturados lineares de cadeia longa (15 a 24 átomos de carbono) não se esperava inicialmente, por não serem componentes comuns a plantas. Por esta razão, ressalta-se que tal identificação foi confirmada por análise em triplicata, com limpeza prévia de toda a vidraria de laboratório, para evitar o aparecimento de hidrocarbonetos como contaminantes.

É importante destacar que os hidrocarbonetos saturados se apresentaram em todos os extratos, independentemente do tempo de extração utilizado.

Tabela XXV: Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com n-hexano a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração

compostos	tempo de extração (minutos)								tR médio
	60	100	140	180	220	260	300	340	
1 pentadecano								X	30,63
2 hexadecano	X	X	X				X		32,02
3 heptadecano	X	X	X						34,49
4 pristano	X	X	X						34,60
5 octadecano	X	X	X	X	X	X	X	X	36,83
6 fitano	X	X	X						36,97
7 nonadecano	X	X	X	X	X			X	39,03
8 eicosano	X	X	X	X	X				40,77
9 uneicosano	X	X	X	X	X				42,97
10 docosano	X	X	X	X	X			X	45,04
11 tricosano	X	X	X	X	X			X	46,72
12 tetracosano	X	X	X	X	X	X		X	48,47
13 pentacosano	X	X	X	X	X	X	X	X	50,35
14 hexacosano	X	X	X	X	X	X	X	X	52,02
15 heptacosano	X	X	X	X	X	X	X		53,53
16 octacosano	X	X	X	X	X	X	X	X	54,91
17 nonacosano	X	X	X	X	X	X	X	X	56,90
18 triacontano	X	X	X	X	X	X		X	58,53
19 heneitriacontano	X	X	X	X	X	X	X	X	61,00
20 dotriacontano	X	X	X	X	X				64,25
21 tritriacontano	X	X	X	X	X	X		X	66,97
22 tetratriacontano	X	X	X	X	X	X			71,45

4.2.1.2.2 Frações separadas com n-hexano-benzeno

Nas frações cromatográficas eluídas com hexano-benzeno (**Tabela XXVI**), observou-se presença de alguns hidrocarbonetos anteriormente detectados na fração de n-hexano, aparentemente não eluídos totalmente com a quantidade de solvente empregado para sua separação.

Tabela XXVI: Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com n-hexano/benzeno a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração

compostos	tempo de extração (minutos)								tR medio
	60	100	140	180	220	260	300	340	
1 tetradecanoato de metila								X	33,65
2 pentadecanoato de metila								X	35,91
3 neofitadieno	X	X	X	X	X	X		X	37,47
4 hexadecenoato de metila								X	37,68
5 hexadecanoato de metila								X	38,14
6 fitol	X	X	X	X	X	X	X	X	38,15
7 fitol (isômero)	X	X	X	X	X	X			38,73
8 heptadecanoato metila	X	X	X	X		X		X	39,89
9 octadecadienoato de metila								X	41,58
10 octadecenoato de metila								X	41,69
11 octadecenoato de metila								X	41,77
12 octadecenoato							X	X	43,00
13 octadecanoato de metila							X	X	42,78
14 nonadecenoato de metila								X	43,73
15 eicosenoato de metila								X	45,37
16 eicosanoato de metila								X	45,77
17 tricosano	X	X	X	X	X	X		X	47,27
18 heneicosanoato de metila							X	X	47,30
19 tetracosano	X	X	X	X	X	X		X	48,63
20 docosenoato de metila								X	48,93
21 docosanoato de metila								X	49,21
22 pentacosano	X	X	X	X	X	X	X		49,97
23 docosanoato de metila							X	X	50,76
24 hexacosano	X	X	X	X	X	X		X	51,85
25 tetradecanal	X	X	X	X	X	X			52,23
26 tetracosanoato de metila								X	52,83
27 heptacosano	X	X	X	X	X	X	X		53,17
28 octacosano	X	X	X	X	X	X			54,24
29 esqualeno	X	X	X	X	X	X		X	55,14
30 docosanol	X	X	X	X	X	X			56,36
31 nonacosano	X	X	X	X	X	X	X		56,71
32 triacontano	X	X	X	X	X	X	X	X	58,91
33 octacosanoato de metila	X	X	X	X	X	X		X	60,88
34 heneitriacontano	X	X	X	X	X	X		X	61,20
35 nonacosanoato de metila						X	X		62,05
36 tritriacontano	X	X	X	X	X	X			67,40

Para os extratos obtidos com tempos de 60, 100 e 140 minutos, encontraram-se algumas diferenças de composição nas frações de hexano-benzeno. Porém, a análise detalhada destas frações permitiu apreciar que,

apesar de todas apresentarem composição semelhante, não haviam seguido o mesmo perfil de separação na coluna cromatográfica, o que pode derivar de diferenças de concentração de alguns componentes nos diversos extratos, não sendo eles detectados ou tendo se esgotado totalmente com o primeiro solvente empregado.

Observou-se também que, a partir de 180 minutos, deixaram de ser detectados alguns componentes e apareceram alguns não detectados a tempos inferiores.

Comportamento totalmente anômalo foi observado quando do emprego de um tempo de extração de 340 minutos: apareceu, além dos hidrocarbonetos, uma série de ésteres de ácidos graxos, a maioria dos quais não extraídos quando se utilizaram tempos de extração inferiores. É importante ressaltar que estas frações não foram derivatizadas, indicando que os ésteres aqui identificados encontravam-se presentes nesta forma nas flores estudadas.

A presença de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa e de terpenóides nas flores e casca de outras espécies do gênero *Hibiscus* foi informada por Chen *et al.* (1993) e Seca *et al.* (2001) embora não se encontraram registros dessa presença para a espécie *H. tiliaceus* em particular. Também é importante assinalar a presença de ésteres insaturados e saturados nas flores estudadas, sendo estes últimos os mais abundantes.

4.2.1.2.3 Frações separadas com diclorometano

Nas frações cromatográficas de diclorometano (**Tabela XXVII**), observaram-se, como principais características, a presença de alguns ésteres metílicos de ácidos graxos, corroborando sua presença na espécie. Verificou-se a presença de outros compostos entre as frações obtidas dos extratos com tempos de extração superior a 140 min.

Para esta fração, puderam identificar-se, por emprego da biblioteca do equipamento e do uso de alguns padrões, um total de 9 componentes, 8 deles ésteres metílicos de ácidos graxos e um éster terpenóide.

A identificação de ésteres de ácidos graxos na fração anterior do extrato obtido a 340 minutos (**Tabela XXVI**) é devida a eluição antecipada destes compostos, implicando sua ausência na fração 3 (**Tabela XXVII**).

Tabela XXVII: Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com diclorometano a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração

compostos	tempo de extração (minutos)							tR médio	
	60	100	140	180	220	260	300		340
1 hexadecenoato de metila	X	X	X	X	X	X			39,00
2 hexadecanoato de metila	X	X	X	X	X	X	X		39,48
3 heptadecanoato de metila	X	X	X						41,49
4 linoleato de metila	X	X	X	X	X	X	X		42,90
5 octadecenoato de metila	X	X	X	X	X	X	X		42,99
6 octadecatrienoato de metila	X	X	X	X	X	X	X		43,05
7 nonadecanoato de metila	X	X	X	X	X	X	X		43,44
8 octadecinoato de metila	X	X	X	X	X	X			43,69
9 octadecadienoato de metila	X	X	X	X	X				44,34
10 eicosanoato de metila	X	X	X	X	X				46,61
11 tetracosanoato de metila					X				55,79
12 vitamina E					X				63,08
13 derivado de estigmastenona					X	X			72,78
14 ergostenona					X	X			75,69
15 pregnenediona						X			77,36

4.2.1.2.4 Frações separadas com acetato de etila

As frações cromatográficas obtidas com acetato de etila foram analisadas após a extração (**Tabela XXVIII**) e depois de sua derivatização (**Tabela XXIX**). Isto permitiu identificar alguns ácidos graxos livres, já que a metilação facilita sua separação e análise pois, em estado livre, eles podem ser irreversivelmente retidos na coluna cromatográfica.

Tabela XXVIII: Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com acetato de etila a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração

compostos	tempo de extração (minutos)								tR
	60	100	140	180	220	260	300	340	médio
1	X	X	X	X	X	X		X	23,05
2				X					23,88
3	X	X	X	X	X	X	X	X	25,99
4	X	X	X	X	X	X	X	X	31,25
5	X	X	X	X	X	X	X	X	32,99
6	X	X	X	X	X	X			35,85
7	X	X	X	X	X	X	X	X	35,69
8	X	X	X	X	X	X	X	X	35,98
9	X	X	X						37,70
10	X	X	X	X	X	X	X	X	38,03
11	X	X	X	X	X	X	X	X	39,69
12	X	X	X	X	X	X	X		40,81
13			X						42,99
14	X	X	X	X				X	43,87
15	X	X	X						44,34
16	X	X	X	X	X	X	X	X	44,54
17	X	X	X						56,86
18							X	X	60,79
19	X	X	X		X	X	X		63,04
20	X	X	X	X	X	X			64,75
21				X					66,18
22	X	X	X	X	X	X			66,71
23	X	X	X	X	X	X			68,07
24	X	X	X					X	68,38
25	X	X	X	X	X	X		X	68,75
26	X	X	X	X	X	X	X	X	70,38
27	X	X	X	X	X			X	70,91
28	X	X	X	X	X	X	X		71,11
29	X	X	X	X	X	X	X		72,04
30	X	X	X				X	X	72,42
31	X							X	73,09
32						X			73,36
33	X	X	X	X	X	X	X		73,62
34	X	X	X	X	X				74,80
35						X			75,12
36	X	X	X	X	X	X	X		76,76
37	X	X	X	X	X	X	X		77,40
38	X	X	X	X					77,97
39				X	X	X	X		85,85

Tabela XXIX: Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com acetato de etila, derivatizadas com BF₃ em metanol a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração

Compostos*	tempo de extração (minutos)								tR médio
	60	100	140	180	220	260	300	340	
1	X	X	X	X	X	X	X		21,56
2	X	X	X	X	X	X			22,20
3	X	X	X	X	X	X			25,20
4								X	28,63
5	X	X	X	X	X	X	X		30,03
6	X	X	X	X	X	X	X		30,65
7	X	X	X	X	X	X	X	X	34,44
8	X	X	X	X	X	X	X	X	37,38
9	X	X	X	X	X	X	X	X	38,71
10	X	X	X	X	X	X	X	X	39,46
11								X	39,81
12	X	X						X	40,51
13	X	X	X	X					41,47
14				X		X		X	41,85
15								X	42,24
16	X	X	X	X	X		X		42,90
17	X	X	X	X	X		X		43,03
18					X		X		43,09
19	X	X	X	X	X	X	X		43,43
20	X	X	X	X	X	X	X		43,71
21			X			X			45,47
22				X	X	X			46,72
23	X	X	X	X		X	X		47,14
24	X	X	X	X		X	X	X	49,94
25			X			X			52,09
26	X	X	X	X		X		X	53,27
27	X	X	X			X			55,09
28	X	X	X	X		X			56,94
29						X			59,68
30						X			58,91
31						X			61,19
32				X		X			61,35
33			X	X		X			62,17
34				X		X			62,77
35						X			65,14
36						X			68,91
37						X			71,91
38						X			74,64
39				X					76,33
40				X		X			77,15
41						X			77,91

Legenda: *Todos os ácidos graxos foram identificados como ésteres metílicos.

Também se pode observar a presença de alguns fitosteróis, confirmada pelo uso de padrões, reafirmando o descrito na literatura para outras espécies do gênero (Chen *et al.*, 1993 e Seca *et al.*, 2001) assim como a presença do α -tocoferol (vitamina E) como componente deste extrato. Observou-se igualmente, para esta fração, diferenças de composição quando se empregaram tempos de extração superiores a 140 minutos. Nesta fração, obtiveram-se 31 componentes, 8 deles ácidos graxos livres, 5 hidrocarbonetos insaturados, 2 compostos aromáticos, 16 fitosteróis e α -tocoferol.

4.2.1.2.5 Frações separadas com metanol

A fração metanólica, por sua polaridade, somente foi analisada depois de sua derivatização (**Tabela XXX**). Nela, detectou-se a maioria dos componentes que já se havia identificado na fração eluída com acetato de etila — com exceção de dois componentes (ácido octanóico e ácido nonanóico) — estando a fração constituída fundamentalmente por ácidos graxos e fitosteróis.

Nesta fração, constatou-se novamente que tempos superiores a 140 minutos não resultam convenientes para a extração a partir de *H. tiliaceus* L., uma vez que se produzem perdas ou transformações de alguns componentes assim obtidos.

Para as frações de n-hexano e hexano-benzeno, continuou manifestando-se um padrão de fracionamento cromatográfico distinto para os extratos obtidos com diferentes tempos de extração nos solventes diclorometano, acetato de etila e metanol, lembrando as variações na composição dos extratos obtidos a tempos de 60 a 140 min naqueles solventes.

A análise conjunta dos resultados obtidos no modelo fatorial e a análise dos extratos pelo sistema acoplado cromatografia gasosa / espectrometria de massas permitiram comprovar que o ultra-som pode ser utilizado como método de extração, considerados o tempo a empregar e a polaridade do solvente.

Tabela XXX: Identificação dos compostos encontrados nas frações obtidas com metanol, derivatizadas com BF₃ em metanol a partir dos extratos metanólicos em diferentes tempos de extração(*)

Compostos*	tempo de extração (minutos)								tR médio
	60	100	140	180	220	260	300	340	
1	X	X	X					X	17,14
2		X	X			X		X	20,22
3		X	X			X			28,72
4	X	X	X						29,34
5	X	X	X						30,48
6	X	X	X	X	X	X	X	X	33,84
7	X	X	X			X			36,23
8	X	X	X	X	X	X	X	X	37,77
9		X	X	X	X	X	X	X	38,21
10	X	X	X	X	X	X			39,81
11	X	X	X	X	X	X			40,31
12	X	X	X						40,44
13	X	X	X	X	X	X	X	X	41,65
14	X	X	X	X	X	X	X	X	41,78
15				X	X	X	X	X	41,72
16	X	X	X	X	X	X	X	X	42,06
17	X	X	X	X	X	X			42,49
18	X	X	X						42,43
19	X	X	X						43,79
20		X	X						45,75
21		X	X						49,20
22	X	X	X	X	X	X			50,64
23						X			51,19
24	X	X	X						52,82
25	X	X	X						54,50
26	X	X	X						56,35
27	X	X	X						58,36
28	X	X	X						60,71
29	X	X	X						63,45
30		X	X						64,58
31		X	X						64,83
32		X	X						65,77
33	X	X	X			X			64,31
34			X						68,40
35		X	X						69,14
36			X						70,54
37		X	X						73,18
38		X	X						73,83

Legenda: *Todos os ácidos graxos foram identificados como ésteres metílicos,

Em geral, a polaridade influi no rendimento, confirmando-se que à maior polaridade corresponde maior rendimento. Entretanto, embora o modelo experimental 2^{5-1} mostrasse que maior tempo de extração produz maior rendimento, isto nem sempre ocorreu com solventes muito polares. Por outro lado, tempos de extração muito elevados podem produzir transformações químicas em maior ou menor grau, dependendo da natureza dos metabólitos secundários presentes na espécie objeto de estudo (**Tabela XXX**).

No caso, considerou-se que um tempo de extração de 140 minutos resultava adequado para obterem-se bons rendimentos, sem mudanças aparentes na composição, o que se demonstrou comparando este método com outros convencionais.

As **Figuras 4.4 a 4.9** apresentam os cromatogramas das diferentes frações separadas do extrato metanólico obtido por ultra-som a 140 minutos, ilustrando a separação cromatográfica deste extrato.

4.2.2 Extração com fluido supercrítico (SFE)

4.2.2.1 Estudo de alguns parâmetros que influem no processo de extração com fluido supercrítico

Este estudo da aplicação da SFE como método de extração de flores de *H. tiliaceus* L., teve início com a análise da influência que poderiam apresentar alguns fatores, sobre o processo de extração.

Entre os fatores influentes, foram selecionadas a pressão e a temperatura de extração, mantendo-se fixo o tipo de solvente extrator (CO_2 , n-hexano, acetato de etila e metanol) para cada modelo estudado.

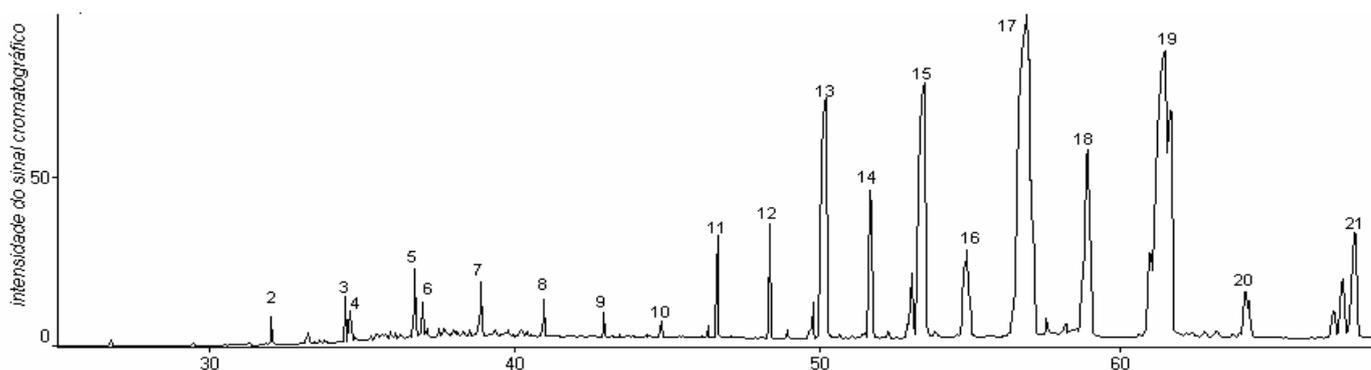


Figura 4.4: Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com n-hexano a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de *H. tiliaceus* L., com 140 minutos de extração

Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XXV**

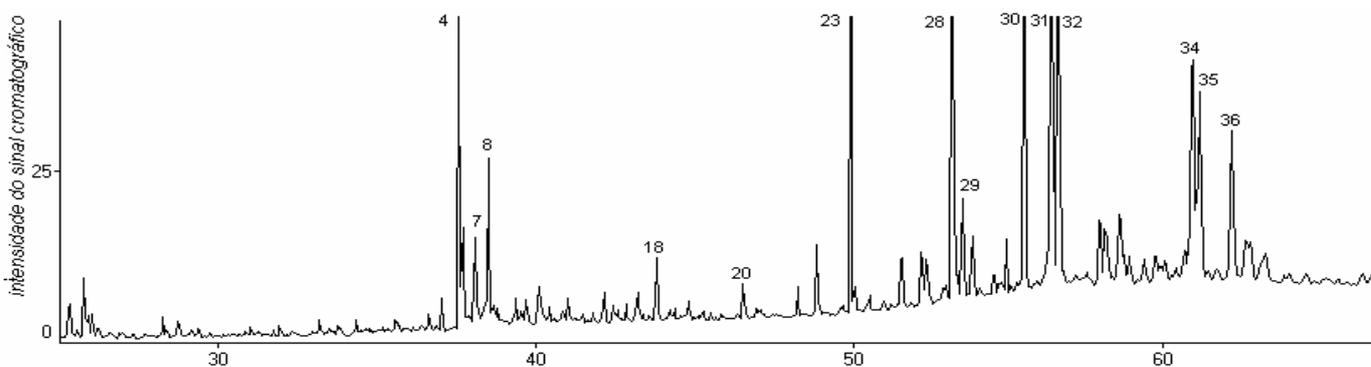


Figura 4.5: Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com n-hexano-benzeno a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de *H. tiliaceus* L., com 140 minutos de extração

Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XXVI**

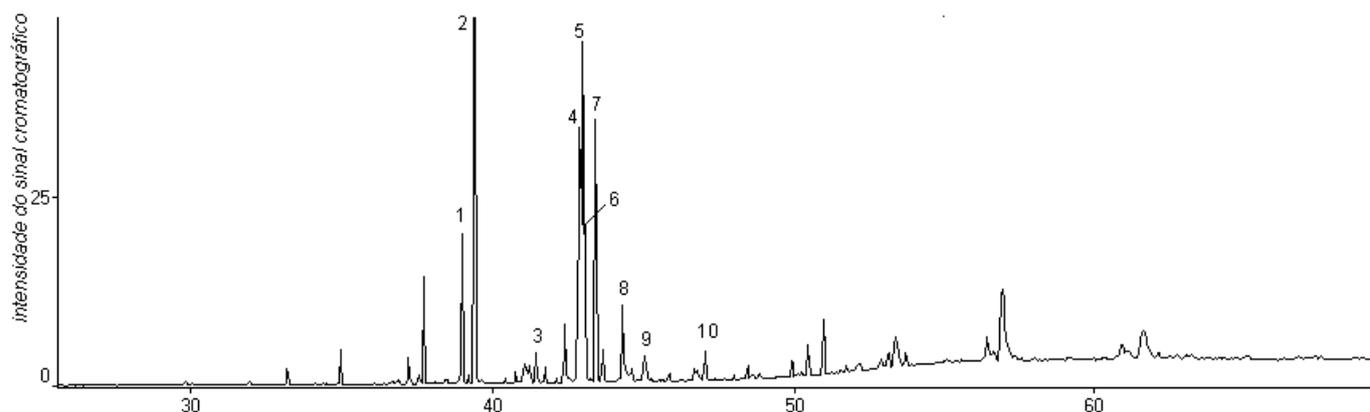


Figura 4.6: Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com diclorometano a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de *H. tiliaceus* L., com 140 minutos de extração
Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XXVII**

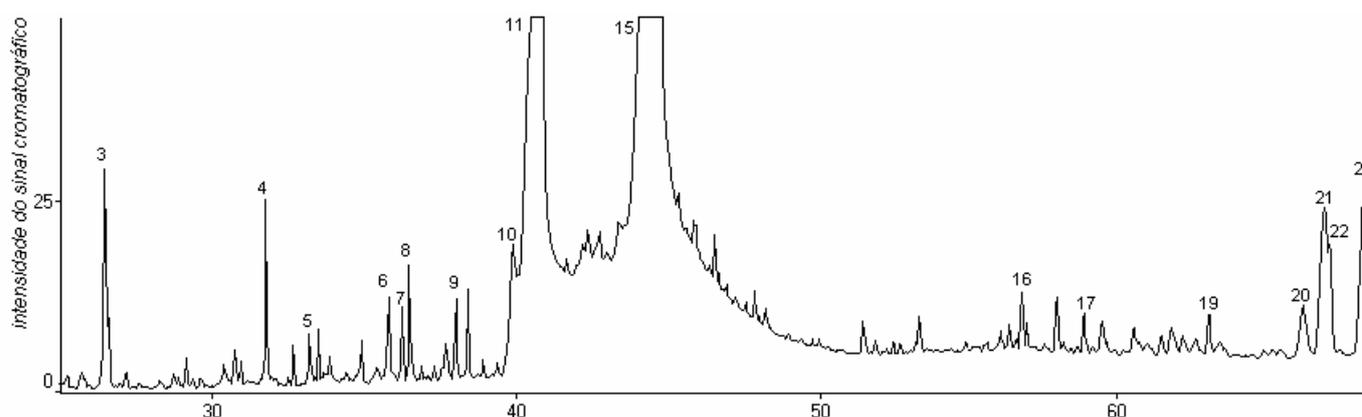


Figura 4.7: Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com acetato de etila a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de *H. tiliaceus* L., com 140 minutos de extração
Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XXVIII**

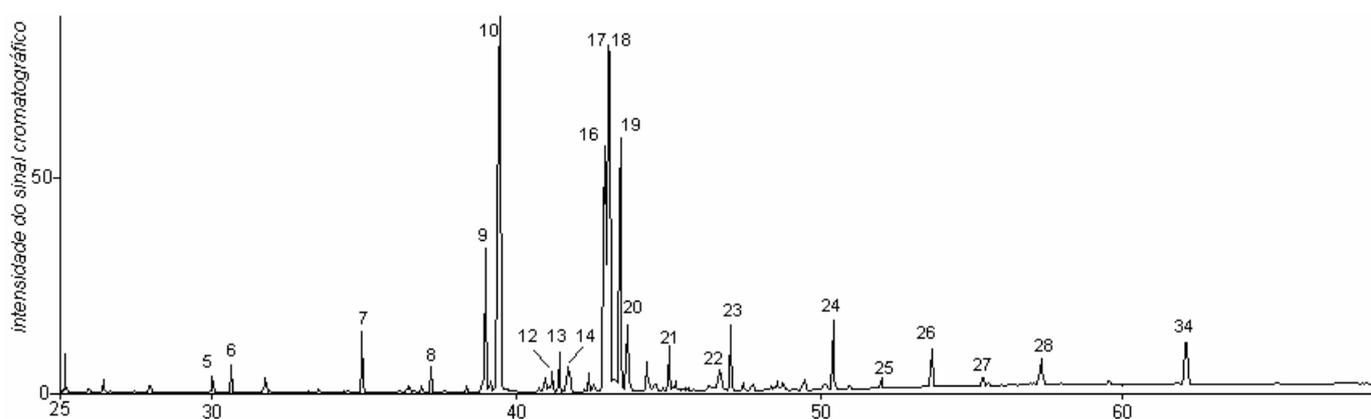


Figura 4.8: Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com acetato de etila, derivatizada com BF_3 /metanol, a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de *H. tiliaceus* L., com 140 minutos de extração
Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XXIX**

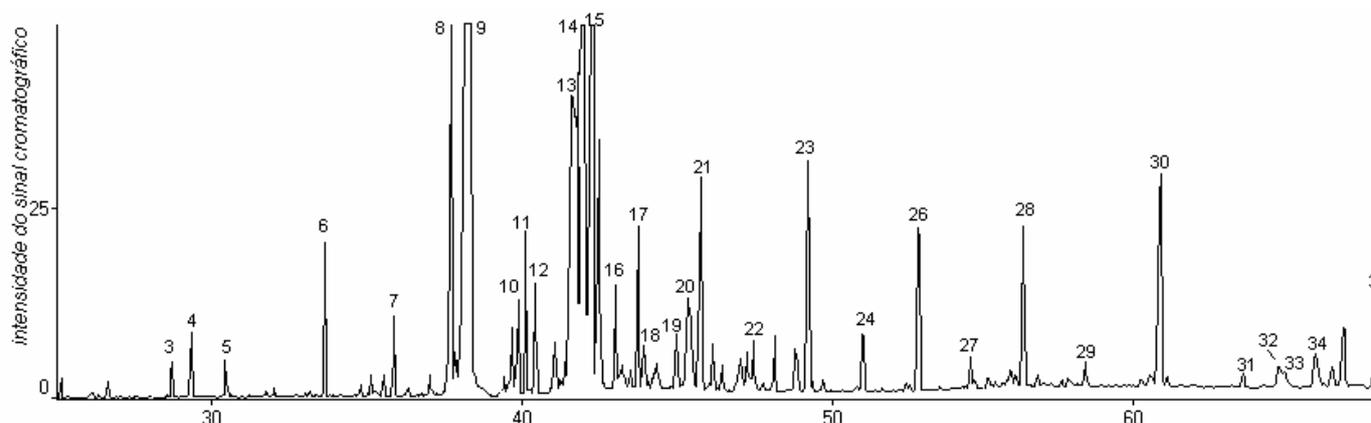


Figura 4.9: Cromatograma do íon total (TIC) para a fração obtida com metanol, derivatizada com BF_3 /metanol, a partir do extrato metanólico com ultra-som das flores de *H. tiliaceus* L., com 140 minutos de extração
Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XXX**

Para estudar a influência destes fatores, aplicou-se um planejamento experimental específico considerando-se como variável resposta, o rendimento percentual em massa da extração. Foram calculados o rendimento (%) em relação à massa de amostra e em relação à massa de CO₂ usada para a extração, os quais se encontram na **Tabela XXXI**.

Tabela XXXI: Variação do rendimento das extrações de acordo com as condições experimentais para a extração supercrítica das flores de *H. tiliaceus* L.

Solvente	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento $m_{\text{ext}}/m_{\text{droga}}$ (%)	Rendimento $m_{\text{ext}}/m_{\text{CO}_2}$ (%)
CO ₂	200	40	0,57	0,058
CO ₂	100	40	0,72	0,076
CO ₂	150	30	0,76	0,075
CO ₂	200	20	0,63	0,062
CO ₂	100	20	0,78	0,084
CO ₂ +metanol(*)	200	40	1,09	0,108
CO ₂ +metanol(*)	100	40	0,96	0,104
CO ₂ +metanol(*)	200	20	1,03	0,101
CO ₂ +metanol(*)	100	20	0,77	0,079
CO ₂ +hexano(**)	200	40	1,11	0,106
CO ₂ + acetato de etila(**)	200	40	1,18	0,243
CO ₂ +metanol(**)	200	40	2,05	0,207

(*) usando 3 mL (5%) de solvente

(**) usando 6 mL (10%) de solvente

Na **Figura 4.10** têm-se os gráficos comparativos para as diferentes condições de extração. Na **Figura 4.10 (a)** tem-se a variação do rendimento porcentual ($m_{\text{ext}}/m_{\text{droga}}$) da extração com as condições de temperatura e pressão usando-se apenas o CO₂ como fluido extrator, enquanto a **Figura 4.10 (b)** apresenta esta mesma variação, mas empregando metanol como solvente modificador. Na **Figura 4.10 (b)**, percebe-se uma discreta tendência de aumento do rendimento quando se usam condições mais drásticas (T = 40 °C e P = 200 bar), entretanto esta variação é muito pequena. Contudo, ainda na **Figura 4.10 (b)**, pode-se comparar os rendimentos quando se mantém a condição mais drástica e se altera a quantidade de solvente modificador (de 3 para 6 mL), obtém-se, então, um aumento significativo no rendimento.

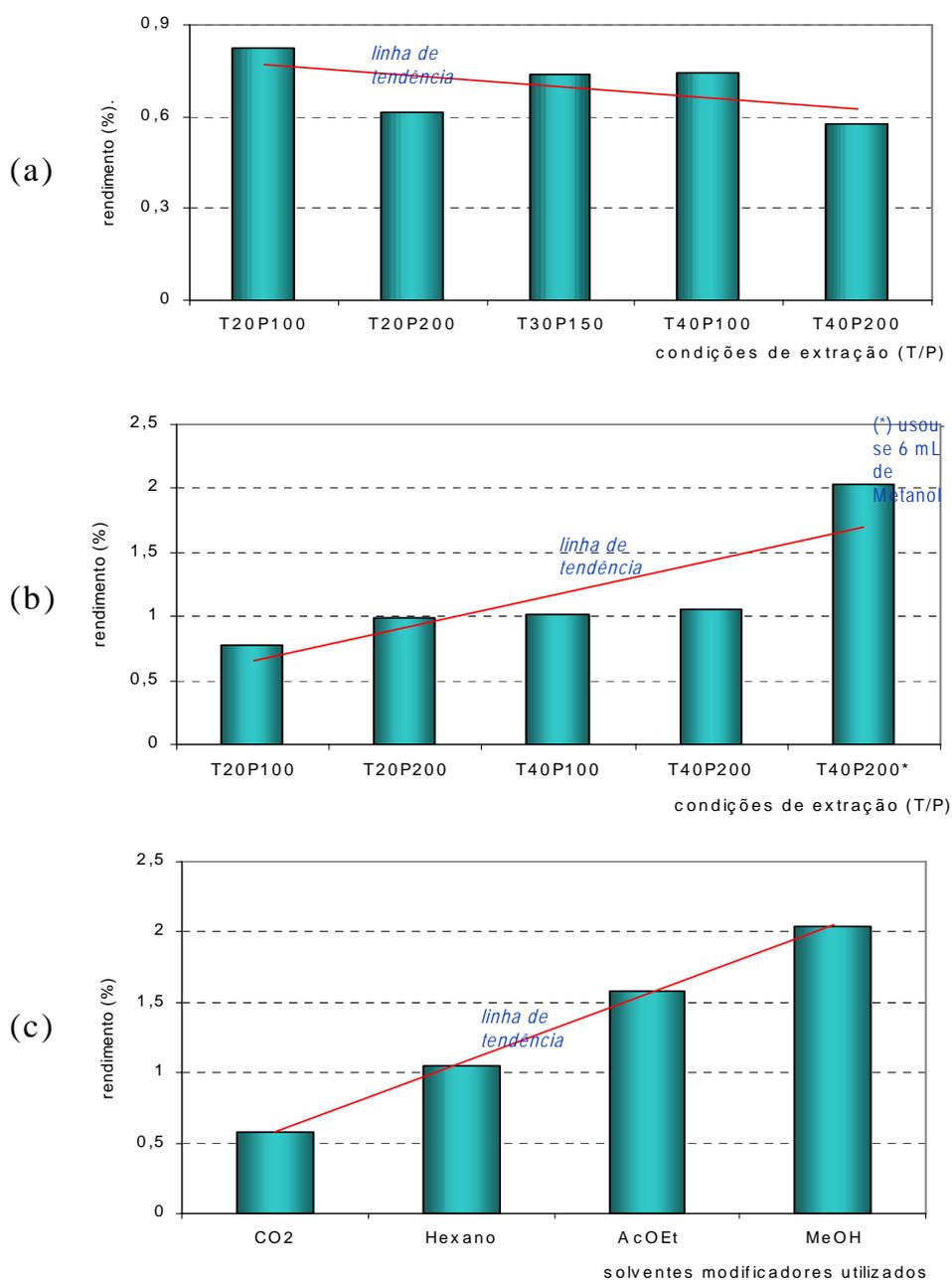


Figura 4.10: Comparação entre os rendimentos da extração supercrítica obtidos em diferentes condições de extração (a) Extratos obtidos com CO₂ puro; (b) extratos obtidos com CO₂ + 3 mL de metanol, e (c) Extratos obtidos com diferentes solventes modificadores (6 mL de cada solvente)(T = 40 °C e P = 200 bar).

Em função deste incremento da quantidade de amostra obtida quando utilizado o dobro de volume de metanol, optou-se por utilizar solventes modificadores com polaridade inferior ao metanol (n-hexano e acetato de etila), na quantidade de 6 mL e nas condições mais drásticas ($T= 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $P= 200\text{ bar}$). Estes resultados estão representados na **Figura 4.10 (c)**. Observa-se então que o rendimento tem um considerável aumento conforme aumenta a polaridade do solvente, o que também já havia sido constatado para o estudo realizado com ultra-som.

A **Figura 4.11** mostra as curvas experimentais de extração porcentual para o processo de extração supercrítica com CO_2 das flores de *H. tiliaceus*, empregando dióxido de carbono com e sem solventes modificadores (n-hexano, acetato de etila e metanol). As curvas foram construídas através da massa total de extrato da planta, em função da massa de dióxido de carbono utilizada, que foi monitorada pelo decaimento no volume do solvente na bomba tipo seringa

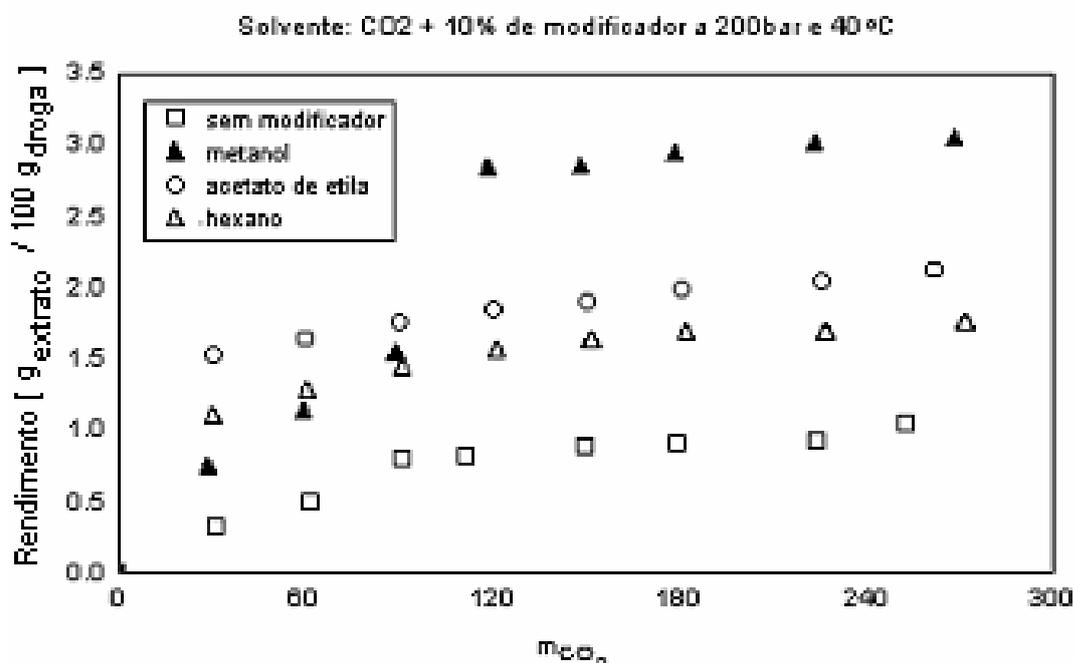


Figura 4.11: Curvas de extração obtidas para flores de *H. tiliaceus* L. usando CO_2 a altas pressões com 6 mL de solvente modificador (condições descritas na Tabela XXXI).

Pode-se observar por esta curva que, além da influência da polaridade do solvente modificador, a massa de CO₂ adicionada ao processo também aumenta o rendimento em massa. Para todos os casos analisados, o rendimento aumenta até cerca de 180 g de CO₂ e a partir daí o processo estabiliza.

4.2.2.2 Estudo cromatográfico dos extratos obtidos no processo de extração com fluido supercrítico (SFE)

As **Figuras 4.12, 4.13 e 4.14** apresentam os cromatogramas para os extratos obtidos com CO₂ supercrítico e solventes modificadores. Na **Figura 4.12** tem-se os cromatogramas dos extratos cujos rendimentos estão representados na **Figura 4.10 (a)**. Da mesma forma, as **Figuras 4.13 e 4.14** apresentam os cromatogramas correspondentes aos extratos representados na **Figura 4.10 (b) e 4.10 (c)**. A identificação dos picos assinalados nestas **Figuras** pode ser vista na **Tabela XXXII, XXXIII e XXXIV**.

Tabela XXXII: Identificação dos picos assinalados na **Figura 4.12**

pico	tR	composto	PM	fórmula
1	50,48	ác. hexadecenóico	256	C ₁₆ H ₃₄ O ₂
2	55,92	hexadecanoato de metila	266	C ₁₇ H ₃₆ O ₂
3	56,74	ác.octadecanóico	284	C ₁₈ H ₃₈ O ₂
4	60,52	heptadecano	240	C ₁₇ H ₃₆
5	63,32	octadecano	254	C ₁₈ H ₃₈
6	66,06	nonadecano	268	C ₁₉ H ₄₀
7	68,61	eicosano	282	C ₂₀ H ₄₂
8	71,22	heneicosano	296	C ₂₁ H ₄₄
9	73,52	docosano	310	C ₂₂ H ₄₆
10	75,60	octadecanol	270	C ₁₈ H ₃₈ O
11	75,97	tetracosano	338	C ₂₄ H ₅₀
12	77,87	eicosanol	298	C ₂₀ H ₄₂ O
13	78,11	pentacosano	352	C ₂₅ H ₅₂
14	80,12	docosanol	326	C ₂₂ H ₄₆ O
15	80,49	heptacosano	380	C ₂₇ H ₅₆
16	83,09	nonacosano	408	C ₂₉ H ₆₀
17	86,33	triacontano	422	C ₃₀ H ₆₂
18	87,12	estigmasta-5-en-3-ol	414	C ₂₉ H ₅₀ O
19	92,32	estigmasta-4-en-3-ona	412	C ₂₉ H ₄₈ O

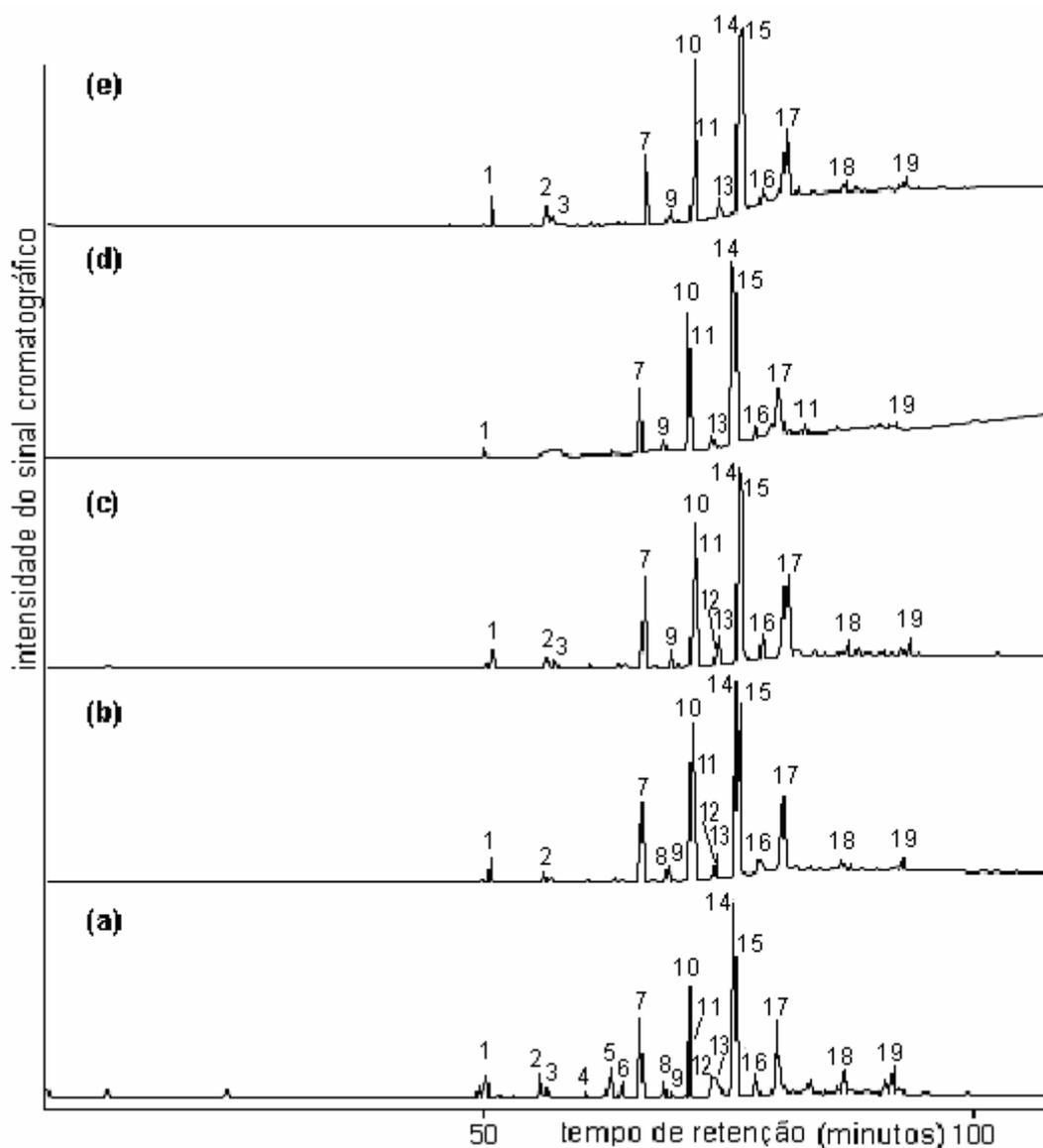


Figura 4.12: Cromatograma do íon total (TIC) para os extratos das flores de *H. tiliaceus* L. obtidos com CO₂ supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão. (a) P = 100 atm e T = 20 °C; (b) P = 100 atm e T = 40 °C; (c) P = 150 atm e T = 30 °C; (d) P = 200 atm e T = 20 °C e (e) P = 200 atm e T = 40 °C; Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XXXII**

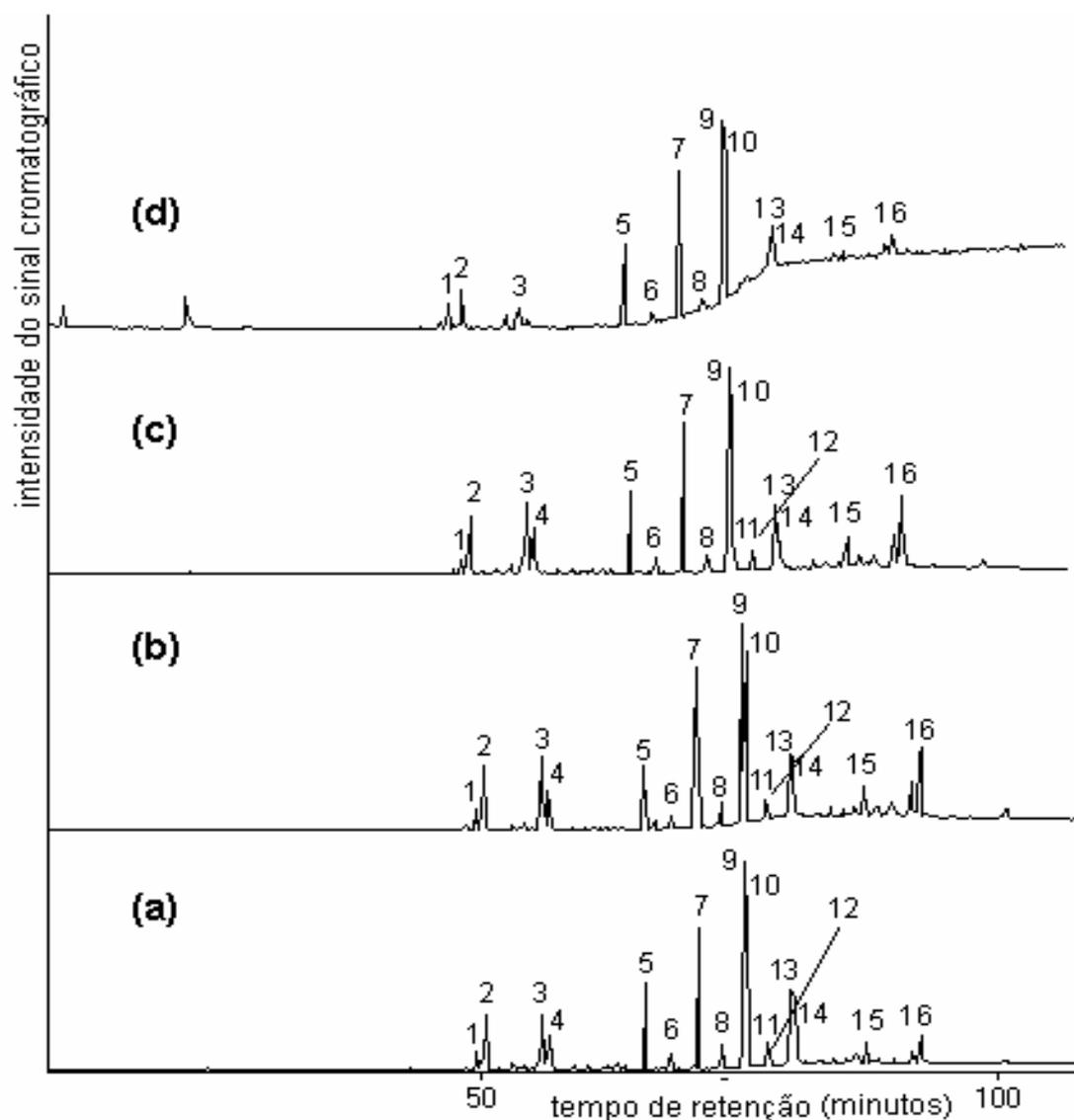


Figura 4.13: Cromatograma do íon total (TIC) para os extratos das flores de *H. tiliaceus* L. obtidos com CO₂ supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão, e usando metanol como solvente modificador (3 mL): (a) P = 100 atm e T = 20 °C; (b) P = 100 atm e T = 40 °C; (c) P = 200 atm e T = 20 °C e (d) P = 200 atm e T = 40 °C; Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XXXIII**

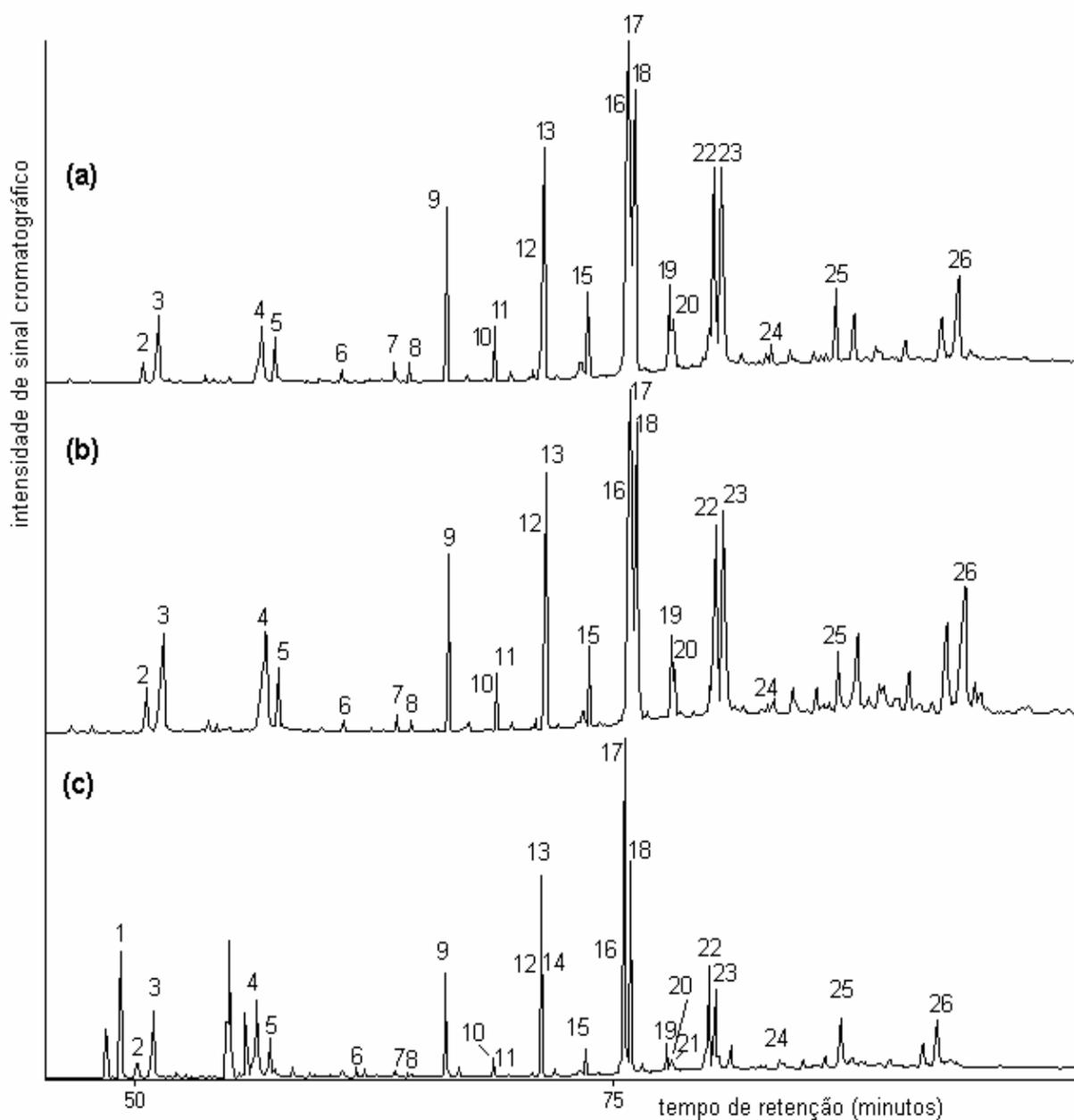


Figura 4.14: Cromatograma do íon total (TIC) para os extratos das flores de *H. tiliaceus* L. obtidos com CO₂ supercrítico nas condições mais drásticas de extração (P = 200 bar e T = 40 °C), e usando diferentes solventes modificadores: (a) hexano (6 mL); (b) acetato de etila (6 mL) e (c) metanol (6 mL); Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XXXIV**

Tabela XXXIII: Identificação dos picos assinalados na **Figura 4.13.**

pico	tR	compostos	PM	fórmula
1	50,07	ác. pentadecenóico	240	C ₁₅ H ₂₈ O ₂
2	50,98	ác. hexadecenóico	256	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
3	56,48	ác. hexadecanóico	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
4	57,12	ác. octadecanóico	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
5	66,36	docosano	310	C ₂₂ H ₄₆
6	68,90	hexacosano	366	C ₂₆ H ₅₄
7	71,51	tetracosano	338	C ₂₄ H ₅₀
8	73,82	pentacosano	352	C ₂₅ H ₅₂
9	75,93	octadecanol	270	C ₂₈ H ₃₈ O
10	76,27	heptacosano	380	C ₂₇ H ₅₆
11	78,17	eicosanol	298	C ₂₀ H ₄₂ O
12	78,40	octacosano	394	C ₂₈ H ₅₈
13	80,46	docosanol	326	C ₂₂ H ₄₆ O
14	80,81	hentriacontano	437	C ₃₁ H ₆₄
15	87,82	estigmasta-5-en-3-ol	414	C ₂₉ H ₅₀ O
16	93,12	estigmasta-4-en-3-ona	412	C ₂₉ H ₄₈ O

Tabela XXXIV: Identificação dos picos assinalados na **Figura 4.14.**

pico	tR	composto	PM	fórmula
1	47,40	hexadecanoato de metila	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
2	50,31	ác. pentadecanóico	240	C ₁₅ H ₂₈ O ₂
3	51,17	ác. hexadecenóico	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
4	56,62	ác. hexadecanóico	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
5	57,34	ác. octadecanóico	284	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
6	60,90	hexadecano	226	C ₁₆ H ₃₄
7	63,72	eicosano	282	C ₂₀ H ₄₂
8	64,51	tetradecanol	212	C ₁₄ H ₂₈ O
9	66,53	docosano	310	C ₂₂ H ₄₆
10	66,06	tricosano	324	C ₂₃ H ₄₈
11	71,72	tetracosano	338	C ₂₄ H ₅₀
12	74,01	pentacosano	352	C ₂₅ H ₅₂
13	76,19	octadecanol	270	C ₁₈ H ₃₈ O
14	76,55	heptacosano	380	C ₂₇ H ₅₆
15	78,37	eicosanol	298	C ₂₀ H ₄₂ O
16	78,61	octacosano	394	C ₂₈ H ₅₈
17	80,75	docosanol	326	C ₂₂ H ₄₆ O
18	81,14	nonacosano	408	C ₂₉ H ₆₀
19	83,52	tricosanol	340	C ₂₃ H ₄₈ O
20	83,82	triacontano	422	C ₃₀ H ₆₂
21	86,05	estigmasta -5 -22-dien-3-ol	412	C ₂₉ H ₄₈ O
22	87,27	pentatriacontano	493	C ₃₅ H ₇₂
23	88,22	estigmasta-5-en-3-ol	414	C ₂₉ H ₅₀ O
24	89,40	pregn-4-eno-3,2-diona,15-hidroxi	330	C ₂₁ H ₃₀ O ₃
25	93,81	estigmasta-4-en-3-ona	412	C ₂₉ H ₄₈ O
26	102,48	estigmastano-3,6-diona	428	C ₂₉ H ₄₈ O

A fim de melhor determinar a composição quantitativa destes extratos, e avaliar a influência do processo de extração supercrítica, os extratos, cujos cromatogramas estão na **Figura 4.14**, além do extrato com CO₂ puro na melhor condição (melhor rendimento, 100 atm e 20 °C) foram cromatografados novamente no modo SIM, monitorando-se os íons assinalados na **Tabela XVIII** e comparando-se com soluções padrão. Os fatores de resposta e dados sobre a repetibilidade dos dados cromatográficos estão apresentados na **Tabela XXXV** e os resultados quantitativos para estas amostras estão apresentados na **Tabela XXXVI**.

Com os dados obtidos da **Tabela XXXV** para os hidrocarbonetos saturados analisados (de 18 a 24 átomos de carbono) pode-se estimar um valor de fator de resposta relativo (FRR) (equação 2, parte experimental) médio para todos os demais hidrocarbonetos saturados encontrados nos extratos (FRR_{HC}), o qual foi usado para quantificar estes compostos nas amostras reais.

$$\text{FRR}_{\text{HC}} = 0,060$$

É interessante salientar que alguns compostos que não foram detectados através da análise inicial por GC/MS no modo SCAN por estarem em pequena concentração, puderam ser identificados por comparação entre o tempo de retenção dos padrões, quantificados pelo modo SIM, comprovando a maior sensibilidade desta técnica.

Entre os compostos quantificados, salienta-se a presença majoritária do palmitato de metila e estearato de metila, derivados de seus ácidos, no extrato obtido com metanol, enquanto a vitamina E só se fez presente no extrato obtido com n- hexano.

Tabela XXXV: Cálculo dos fatores de resposta e da repetibilidade para a análise quantitativa dos extratos de SFE

	composto	conc. (mg/L)	íons (Daltons)	FRR1	FRR2	FRR3	FRR médio	DP	DP%	LQ ($\mu\text{g/g}$)
solução 1	1 octadecano	62,10	71	0,0889	0,0851	0,0911	0,0884	$3,04 \cdot 10^{-3}$	3,43	0,197
	2 nonadecano	54,50	71	0,0804	0,0795	0,0885	0,0828	$4,98 \cdot 10^{-3}$	6,01	0,203
	3 eicosano	50,40	71	0,0700	0,0661	0,0749	0,0703	$4,38 \cdot 10^{-3}$	6,24	0,209
	4 uneicosano	50,00	71	0,0556	0,0595	0,0686	0,0612	$6,65 \cdot 10^{-3}$	10,9	0,192
	5 docosano	53,50	71	0,0459	0,0423	0,0524	0,0469	$5,12 \cdot 10^{-3}$	10,9	0,197
	6 tricosano	41,30	71	0,0399	0,0372	0,0440	0,0403	$3,43 \cdot 10^{-3}$	8,50	0,183
	7 tetracosano	37,70	71	0,0310	0,0349	0,0390	0,0350	$3,99 \cdot 10^{-3}$	11,4	0,144
solução 2	1 metil palmitato	56,60	74	8,71	5,80	6,44	6,98	1,2516	17,9	0,00849
	2 fitol	118,80	81	3,39	2,68	2,42	2,83	$4,11 \cdot 10^{-3}$	14,5	0,0846
	3 metil esterato	40,30	74	6,52	4,78	4,96	5,42	0,7797	14,4	0,0473
	4 vitamina E	134,00	165	0,524	0,452	0,459	0,478	$3,21 \cdot 10^{-3}$	6,73	0,0182
	5 estigmasterol	100,00	55 e 81	0,472	0,445	0,420	0,446	$2,08 \cdot 10^{-3}$	4,68	0,0624
	6 estigmastanol	148,00	56 e 81	0,239	0,246	0,189	0,225	$2,55 \cdot 10^{-3}$	11,3	0,0241
	7 acetato de estigmasterol	103,00	57 e 81	1,77	1,88	1,71	1,79	$7,16 \cdot 10^{-3}$	4,00	0,0864
	8 estigmastadienona	104,00	58 e 81	0,747	0,932	0,679	0,786	0,1066	13,6	0,0228

DP = desvio padrão; DP% = desvio padrão percentual; LQ = $10 \times \text{conc.}$ correspondente à área do ruído médio do branco) medida em relação à massa de flores inicial.

OBS.: Os hidrocarbonetos de 25 a 34 átomos de carbono foram quantificados usando o FRR médio calculado a partir da Solução padrão 1. ($\text{FRR}_{\text{médio}} = 0,060$ e $\text{LD}_{\text{médio}} = 0,189$)

Tabela XXXVI: Análise quantitativa dos extratos obtidos por extração supercrítica

	composto	CO ₂ (100 atm 40 °C)		n-hexano (200 atm 40 °C)		acetato de etila (200 atm 40 °C)		metanol (200 atm 40 °C)	
		CF (ug/g)	DP%	CF (ug/g)	DP%	CF (ug/g)	DP%	CF (ug/g)	DP%
solução 1	octadecano	0,6283	4,38	0,5549	5,19	1,936	4,65	0,3748	6,73
	nonadecano	0,9507	5,82	0,8797	6,21	2,356	7,07	0,5489	8,45
	eicosano	4,485	6,05	9,732	7,58	14,41	6,19	5,751	10,7
	heneicosano	3,547	4,29	4,088	6,65	15,41	4,89	10,72	2,28
	docosano	3,777	8,73	7,937	6,72	5,782	5,55	8,322	2,00
	tricosano	14,43	4,78	10,72	4,95	6,887	3,99	20,73	2,49
	tetracosano	20,36	3,74	19,32	4,03	35,19	6,99	24,59	2,55
	pentacosano	150,4	2,29	125,6	2,85	325,4	3,35	107,7	1,16
	hexacosano	26,00	2,32	24,19	2,72	59,41	3,45	19,12	0,813
	heptacosano	270,3	10,04	344,7	5,70	594,3	2,31	212,6	6,5
	octacosano	26,47	7,12	56,45	2,64	101,8	8,62	27,72	1,78
	nonacosano	245,3	1,76	467,4	9,99	719,4	9,45	270,3	10,0
	triacontano	30,22	3,08	38,06	6,86	54,93	4,13	20,00	0,00
	hentriacontano	85,34	12,1	245,0	2,13	385,8	1,16	182,8	3,63
	dotriacontano	5,465	3,62	25,30	3,31	53,21	3,14	24,64	2,88
tritriacontano	20,14	15,8	55,79	2,87	132,5	1,54	59,46	4,12	
tetratriacontano	7,445	21,8	19,52	0,483	25,84	7,47	21,90	10,4	
solução 2	metil palmitato	0,03344	2,27	0,1806	2,18	0,05029	18,4	11,20	3,59
	fitol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	metil esterato	0,02128	11,44	0,01113	2,52	0,02436	2,88	4,255	2,92
	vitamina E	ND	ND	0,4477	5,38	ND	ND	0,08807	2,69
	estigmasterol	0,06367	11,64	1,362	2,21	2,135	1,75	1,537	1,79
	estigmastanol	ND	ND	3,635	2,99	1,853	2,67	ND	ND
	acetato de estigmasterol	ND	ND	0,1899	5,15	0,2781	3,41	0,09866	4,50
	estigmastadienona	0,2740	11,7	1,637	2,52	2,889	2,59	0,9775	2,31

As **Figuras 4.15 e 4.16** apresentam na forma de gráficos comparativos das concentrações das substâncias encontradas nos diferentes extratos analisados e representados na Tabela XXXVI. Percebe-se a presença majoritária de hidrocarbonetos, em todos os extratos.

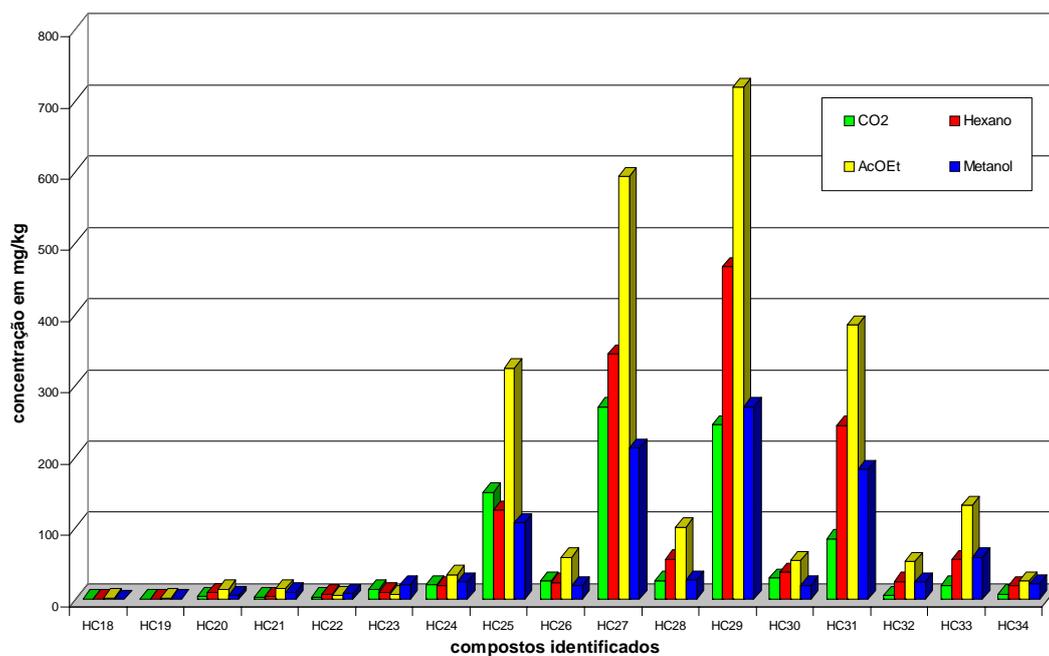


Figura 4.15: Distribuição quantitativa dos hidrocarbonetos saturados de 18 a 34 átomos de carbono nos extratos obtidos por SFE

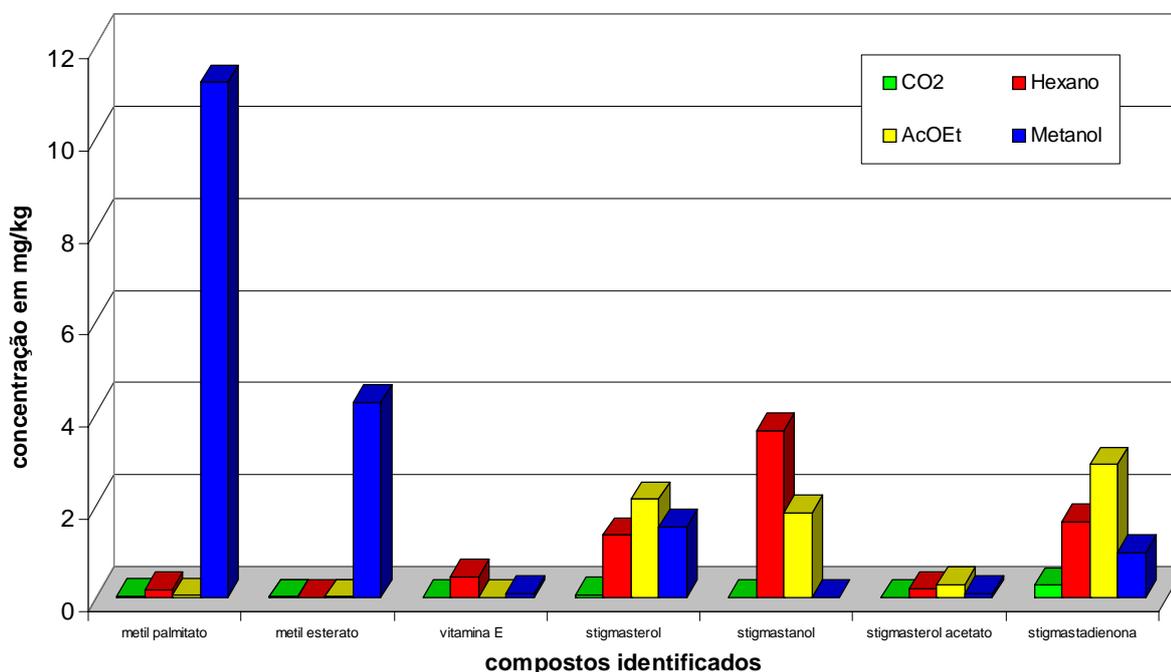


Figura 4.16: Distribuição quantitativa dos ésteres metílicos, vitamina E e derivados do estigmasterol nos extratos obtidos com SFE

4.2.3 Extração com líquido pressurizado (PLE)

4.2.3.1 Estudo de alguns parâmetros que influem no processo de PLE

Começou-se o estudo sobre o emprego do equipamento - ASE (extração acelerada com solventes) como método de extração para produtos naturais pela análise dos prováveis fatores que poderiam influenciar o processo de extração, uma vez que não existem antecedentes. Dentre os fatores influenciadores, selecionaram-se:

- a) tempo de extração; (X_1)
- b) quantidade de amostra; (X_2)
- c) temperatura de extração; (X_3)
- d) número de ciclos. (X_4)

A polaridade do solvente extrator não foi considerada como uma variável, uma vez que, conforme a análise dos procedimentos extratores estudados nos capítulos anteriores, os produtos extraídos por solventes distintos têm composição distinta. Desta forma, o planejamento experimental foi repetido para cada um dos solventes estudados (n-hexano, acetato de etila e metanol).

Para estudar a influência dos destes fatores, aplicou-se um modelo de experimento 2^{4-1} , para o qual foram selecionados dois níveis extremos para cada variável e se considerou como variável resposta, o rendimento (%) da extração.

Ao processar os resultados e discriminar os coeficientes significativos, foram obtidas as seguintes equações com as variáveis codificadas:

para n-hexano como solvente extrator

$$y(\text{hex})\% = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_5X_1X_3$$

$$y(\text{hex})\% = 1,53 + 0,131X_1 - 0,174X_2 + 0,269X_3 - 0,271X_4 + 0,129X_1X_3$$

para acetato de etila como solvente extrator

$$y(\text{acet})\% = a_0 + a_1X_3 + a_2X_1X_2 + a_3X_1X_3 + a_4X_1X_4$$

$$y(\text{acet})\% = 1,79 + 0,616X_3 - 0,401X_1X_2 + 0,466X_1X_3 + 0,296X_1X_4$$

para metanol como solvente extrator

$$y(\text{met})\% = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_5X_1X_3$$

$$y(\text{met})\% = 12,67 - 1,543X_1 - 1,782X_2 + 4,675X_3 + 2,260X_4 - 1,507X_1X_3$$

A análise da equação obtida para o modelo 2^{4-1} permite observar que, quando a extração é realizada com o solvente n-hexano, as variáveis X_3 (temperatura) e X_1 (tempo) apresentam coeficientes positivos (+0,269 e +0,131, respectivamente), significando que um aumento nestas variáveis implica em aumento no rendimento global do processo.

As variáveis X_2 (massa) e X_4 (número de ciclos) apresentaram coeficientes negativos (-0,174 e -0,271, respectivamente), sendo o módulo do coeficiente para a variável número de ciclos um pouco mais elevado. A interação entre X_1X_3 apresentou valor positivo (+ 0,129), confirmando a maior influência destes fatores sobre o aumento no rendimento. Portanto, aumentando a temperatura e o tempo de extração há um aumento do rendimento.

Quando o solvente utilizado para a extração foi o acetato de etila para o modelo 2^{4-1} , os resultados apresentaram-se um pouco diferentes dos encontrados com n-hexano. As variáveis X_1 (tempo), X_2 (massa de amostra) e X_4 (número de ciclos) não apresentaram coeficientes significativos, sendo por esta razão, desconsideradas na equação global para o processo. A variável temperatura apresentou o maior coeficiente isolado (0,616), significando ter maior efeito sobre o rendimento. Apesar do tempo de extração (X_1) não apresentar efeito isolado significativo, as combinações X_1X_2 (-0,401), X_1X_3 (+0,466) e X_1X_4 (+0,296) têm alguma influência sobre o processo. A primeira influencia negativamente, enquanto as outras duas têm forte influência positiva. Isto significa que para um maior tempo de extração, a temperatura e o número de ciclos devem ser maiores para que o rendimento aumente, enquanto a massa de amostra deve ser menor.

Quando o solvente utilizado para a extração foi metanol, o modelo 2^{4-1} apresentou semelhanças significativas com o hexano pois todas as variáveis influem de forma individual sobre o rendimento do processo e a única interação significativa ocorre entre o tempo e a temperatura de extração.

A variável X_3 (temperatura) apresentou o maior valor de coeficiente (+ 4,675) sendo este o fator de maior relevância. De forma semelhante a variável X_4 (número de ciclos) apresentou coeficiente positivo e bastante significativo (+2,26).

As variáveis X_1 (tempo) e X_2 (massa) influem também de forma significativa no processo, porém negativamente (-1,543 e -1,782) indicando que para maiores rendimentos é necessário trabalhar com menores tempos de extração e menores quantidades de amostra.

Desta forma, com uma temperatura mais elevada, maior número de ciclos, menor tempo de extração e a uma menor quantidade de massa, o rendimento do processo PLE é maior, se o metanol for usado como solvente extrator. Os resultados experimentais e teóricos (baseado no modelo proposto) para esta análise estão apresentados na **Tabela XXXVII**. Na **Figura 4.17** tem-se uma comparação gráfica entre os rendimentos teóricos e práticos obtidos neste modelo.

Tabela XXXVII: Estudo da influência dos fatores que interferem o processo de extração pelo método PLE estudados aplicando-se um modelo de experimento 2^{4-1}

		rendimento (%)												
		variáveis				n-hexano		acet. etila		metanol				
exp.	X_1 (min)	X_2 (g)	X_3 (°C)	X_4 (ciclo)	exp.	teor.	exp.	teor.	exp.	teor.				
1	-1	10	-1	1	-1	50	-1	1	1,74	1,70	1,59	1,54	7,17	7,55
2	+1	20	-1	1	-1	50	+1	3	1,18	1,17	1,33	1,41	10,04	12,00
3	-1	10	+1	3	-1	50	+1	3	0,82	0,81	1,81	1,74	7,89	8,51
4	+1	20	+1	3	-1	50	-1	1	1,39	1,36	0,44	0,01	4,88	3,92
5	-1	10	-1	1	+1	100	+1	3	1,47	1,44	1,05	1,24	25,40	24,44
6	+1	20	-1	1	+1	100	-1	1	1,47	2,50	1,96	2,98	18,37	13,82
7	-1	10	+1	3	+1	100	-1	1	2,51	1,64	3,15	2,64	13,20	16,35
8	+1	20	+1	3	+1	100	+1	3	1,65	1,61	2,95	2,77	14,39	14,77
rendimento médio					1,53	1,53	1,79	1,79	12,67	12,67				

X_1 = tempo de extração; X_2 = quantidade de amostra; X_3 = temperatura de extração; X_4 = número de ciclos
Hex = hexano; AcEt = acetato de etila e MeOH = metanol

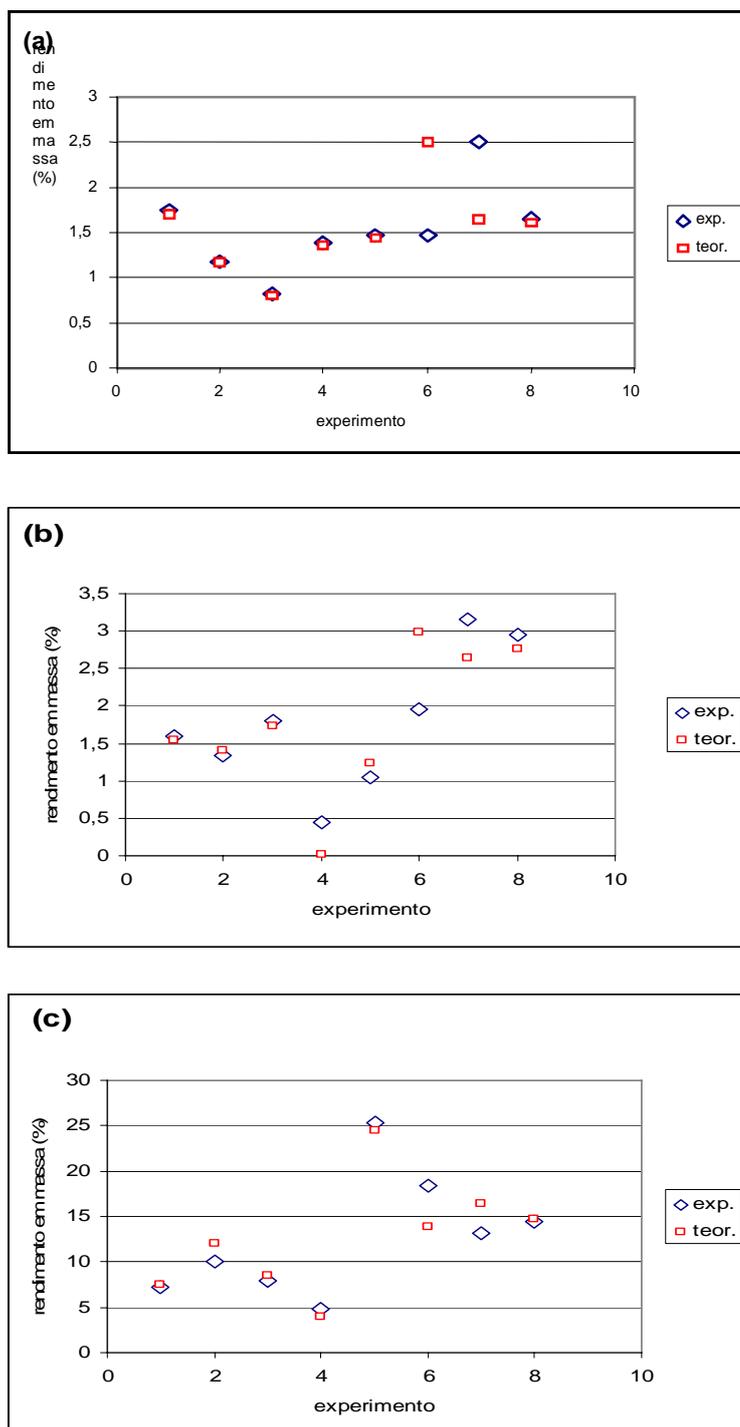


Figura 4.17: Comparação gráfica entre os resultados experimentais e teóricos para o planejamento fatorial 2^{4-1} **(a)** n-hexano; **(b)** acetato de etila e **(c)** metanol

Pela análise da **Figura 4.17**, pode-se observar para o extrato com n-hexano (**Fig. 4.17 a**) que os resultados prático e teórico se confundem, variando entre 0,5 e 2 % em massa, com exceção da amostra 6, onde foi obtido um rendimento em massa experimental (%), inferior ao esperado teoricamente e no experimento 7, onde o resultado encontrado foi superior ao teórico. A condição experimental com maior rendimento foi o experimento 7, entretanto, teoricamente, o experimento 6 tem maior rendimento.

Nas amostras extraídas com acetato de etila (**Fig. 4.17 b**), a variação dos resultados experimentais ficou entre 0,44 e 3,15 %. Os resultados prático e teórico dos experimentos 1, 3 e 8 se confundem novamente, o mesmo não acontecendo nos experimentos 2, 4, 5, e 7 onde os valores % se encontram bastante próximos. Percebe-se, entretanto, no experimento 6 um resultado experimental bastante inferior ao esperado teoricamente. A condição experimental com maior rendimento foi também o experimento 7, sendo que o experimento 6 apresentou maior rendimento teórico.

No extrato metanólico (**Fig. 4.17 c**), o rendimento foi bastante superior, variando de 0,5 a 28 % em massa. Para este extrato, os valores teórico e prático do experimento 1, 3 e 8 se confundem; os experimentos 2, 4, 5 e 7 apresentam valores muito próximos e o experimento 6 apresentou um rendimento superior ao esperado teoricamente. A condição experimental com maior rendimento foi o experimento 5, sendo este também o maior valor de rendimento teórico.

Tendo em vista estes resultados e com o objetivo de analisar com mais detalhes o comportamento do método de extração, aplicou-se um modelo fatorial 2^3 para todos os solventes estudados. Consideraram-se como variáveis a massa (X_2), a temperatura (X_3) e o número de ciclos (X_4), mantendo constante o tempo de extração (10 minutos). Cada variável foi analisada em três níveis, estabelecendo-se também como variável resposta à porcentagem de rendimento em massa para a extração.

Ao processar os resultados e discriminar os coeficientes significativos para o planejamento 2^3 , foram obtidas as seguintes equações com as variáveis codificadas:

para n-hexano como solvente extrator:

$$y(\text{hex})\% = a_0 + a_1X_2 + a_2X_3 + a_3X_4 + a_4X_2X_3X_4$$

$$y(\text{hex})\% = 1,28 - 0,076 X_2 + 0,246 X_3 + 0,069 X_4 + 0,056X_2X_3X_4$$

para acetato de etila como solvente extrator:

$$y(\text{acet})\% = a_0 + a_1X_3 + a_2X_4 + a_3X_2X_3 + a_4X_2X_4$$

$$y(\text{acet})\% = 1,84 - 0,241X_3 - 0,521 X_4 - 0,294 X_2X_3 + 0,411 X_2X_4$$

para metanol como solvente extrator:

$$y(\text{met})\% = a_0 + a_1X_2 + a_2X_4 + a_3X_2X_3 + a_4X_3X_4 + a_5X_2X_4$$

$$y(\text{met})\% = 10,77 - 0,974X_2 + 2,094X_4 - 0,964 X_2X_3 + 1,029 X_3X_4 + 0,426X_2X_4$$

Os resultados para n-hexano e acetato de etila confirmaram os encontrados para o modelo anterior, não apresentando valores que apresentassem efeitos significativos. Para o modelo experimental 2^3 , realizado com o solvente metanol, os valores em módulo encontrados para X_2 (massa de amostra) e X_4 (número de ciclos) foram elevados ($-0,974$ e $+2,094$, respectivamente) e bastante significativos, indicando que para maior número de ciclos e menor massa de flores o modelo mostra uma tendência de maior rendimento percentual. Das interações entre os efeitos, apenas o coeficiente de X_3X_4 ($+1,029$) apresentou valor bastante significativo indicando que, apesar do efeito da temperatura (X_3) ser desprezível isoladamente, um aumento desta variável associado a um aumento no número de ciclos produz maior rendimento. Os resultados de rendimento teórico e experimental para o modelo 2^3 podem ser melhor observados na **Tabela XXXVIII** e na **Figura 4.18**.

Quando o planejamento estatístico utilizado foi 2^3 , para o extrato com n-hexano (**Fig. 4.18 a**), os valores teóricos calculados e os valores práticos encontrados são praticamente os mesmos. A variação do rendimento em massa (%) foi neste extrato de 0,8 a 1,7 % aproximadamente. O maior valor de rendimento experimental e teórico foi obtido tanto no experimento 7 como no experimento 8.

Tabela XXXVIII: Estudo da influência dos fatores que interferem no processo de extração PLE estudados aplicando-se um modelo de experimento 2³

exper.	massa (g)	T (°C)	fatores ciclos	rendimento (%)					
				n-hexano		acetato etila		metanol	
				exp.	teor.	exp.	teor.	exp.	teor.
1	-1 (1)	-1(50)	-1(1)	1,04	0,99	2,77	2,71	9,72	10,15
2	+1 (3)	-1(50)	-1(1)	0,95	0,95	2,27	2,48	9,50	9,27
3	-1 (1)	+1(100)	-1(1)	1,55	1,59	2,95	2,82	10,44	10,02
4	+1 (3)	+1(100)	-1(1)	1,31	1,33	1,43	1,41	5,06	5,29
5	-1 (1)	-1(50)	+1(3)	1,22	1,24	0,98	0,85	11,65	11,42
6	+1 (3)	-1(50)	+1(3)	0,93	0,97	2,28	2,26	11,83	12,26
7	-1 (1)	+1(100)	+1(3)	1,62	1,62	1,01	0,95	15,18	15,41
8	+1 (3)	+1(100)	+1(3)	1,63	1,58	0,98	1,19	12,81	12,39
rendimento médio (%)				1,28	1,28	1,84	1,84	10,77	10,77

O extrato com acetato de etila, apresentou as mesmas características da anterior em valores teóricos e práticos, entretanto o rendimento apresentou uma variação entre 0,5 e 3,2 % em massa. O maior valor de rendimento experimental e teórico foi obtido para o experimento 3.

Quando observa-se o extrato metanólico, o rendimento em massa varia de 4 a 16 %, e novamente se percebe uma aproximação bastante grande entre os valores teóricos e práticos. O maior valor de rendimento experimental e teórico foi obtido para o experimento 7.

Com o objetivo de se conseguir uma definição mais clara da otimização das variáveis estudadas no processo de extração com líquido pressurizado, aplicou-se um novo modelo estatístico, de superfície de resposta, mantendo-se fixo o tempo de extração (10 minutos) e a massa de amostra (1 g). As variáveis estudadas foram a temperatura (X_3) e o número de ciclos (X_4). Neste caso trabalhou-se com um ponto médio, ou seja, com as variáveis no valor “zero”, escolhendo-se para este nível

valores intermediários entre os aplicados (-1 e +1). Os resultados experimentais para este modelo são apresentados na **Tabela XXXIX**.

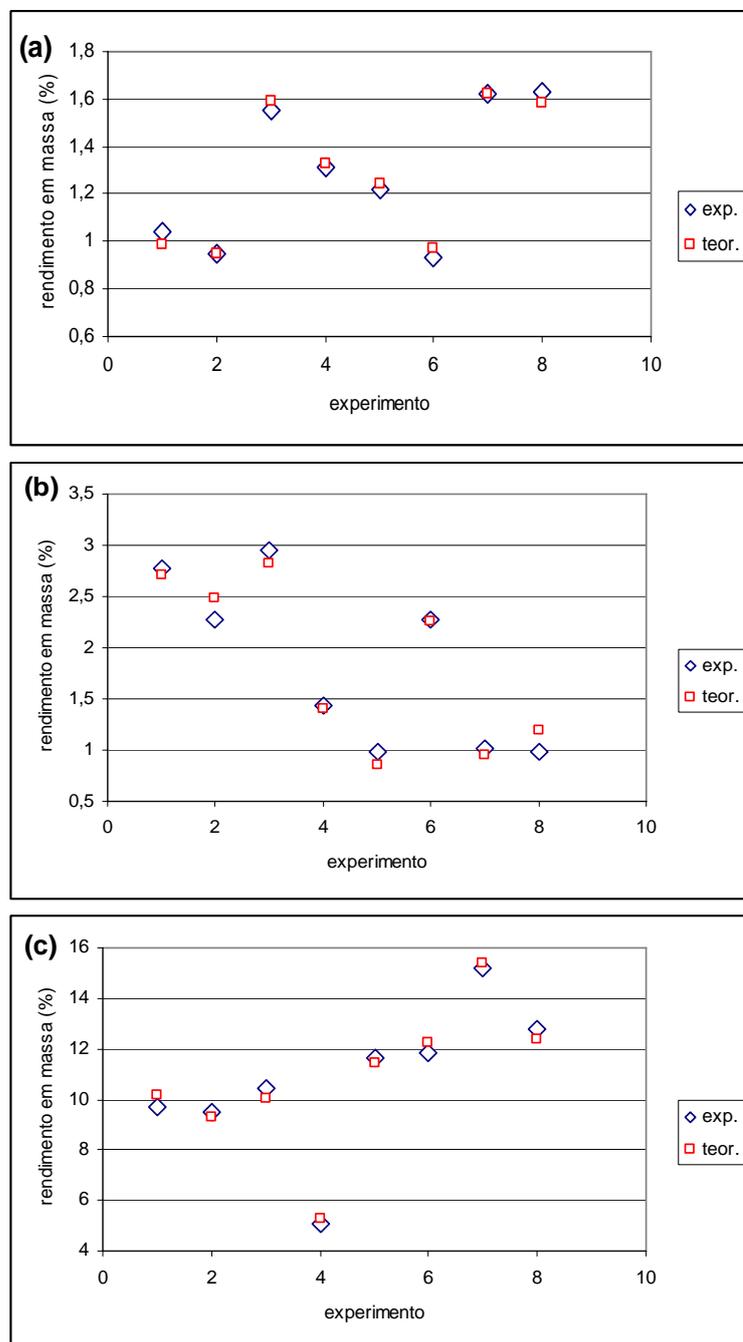


Figura 4.18: Comparação gráfica entre os resultados experimentais e teóricos para o planejamento fatorial 2^3 **(a)** n-hexano; **(b)** acetato de etila e **(c)** metanol

Tabela XXXIX: Estudo da influência das variáveis aplicando-se um modelo de superfície de resposta

fatores			rendimento (seco%)					
			n-hexano		acetato etila		metanol	
exp. T (°C)	ciclos		exp.	teor.	exp.	teor.	exp.	teor.
1	-1 (50)	-1 (1)	1,73	1,69	1,19	1,28	11,50	11,91
2	+1 (100)	-1 (1)	1,60	1,56	1,73	1,63	14,90	15,31
3	-1 (50)	+1 (3)	3,63	3,59	1,01	1,11	9,31	8,90
4	+1 (100)	+1 (3)	1,78	1,74	0,85	0,75	18,72	18,31
5	0 (75)	0 (2)	1,61	2,15	1,48	1,69	10,94	15,62
6	0 (75)	0 (2)	2,32	2,15	2,04	1,69	12,96	15,62
7	0 (75)	0 (2)	2,05	2,15	1,54	1,69	23,03	15,62
Rendimento médio			2,10	2,15	1,41	1,36	14,48	14,47

Os gráficos obtidos para o modelo de superfície de resposta, para os solventes usados, estão mostrados na **Figura 4.19** onde se observa que, para o metanol e acetato de etila há uma tendência de aumento de rendimento com o aumento da temperatura. Entretanto para hexano o melhor rendimento ocorreu na menor temperatura (50 °C).

Com base nestes resultados construiu-se um novo modelo de superfície de resposta – deslocamento, mantendo fixo a massa (1g), o tempo em 10 minutos, o número de ciclos em 2, e variando a temperatura de 75, 85 e 95 °C. O mesmo experimento foi repetido mantendo-se a massa fixa em 3 g, com o mesmo número de ciclos e mesmas temperaturas, como pode ser visto na **Tabela XL**.

Tabel XL: Estudo da influência das variáveis aplicando-se um modelo de superfície de resposta – deslocamento.

fatores			solvente
			metanol
experimento	massa (g)	T (°C)	Remdimento seco (%)
1	1	75	16,94
2	1	85	16,47
3	1	95	18,30
4	3	75	12,49
5	3	85	16,81
6	3	95	20,66

A análise destes resultados nos permite concluir que o melhor rendimento em massa de extrato é obtido usando metanol como solvente extrator a uma temperatura de 75 °C, com 2 ciclos de extração de 10 minutos cada e 1 g de amostra.

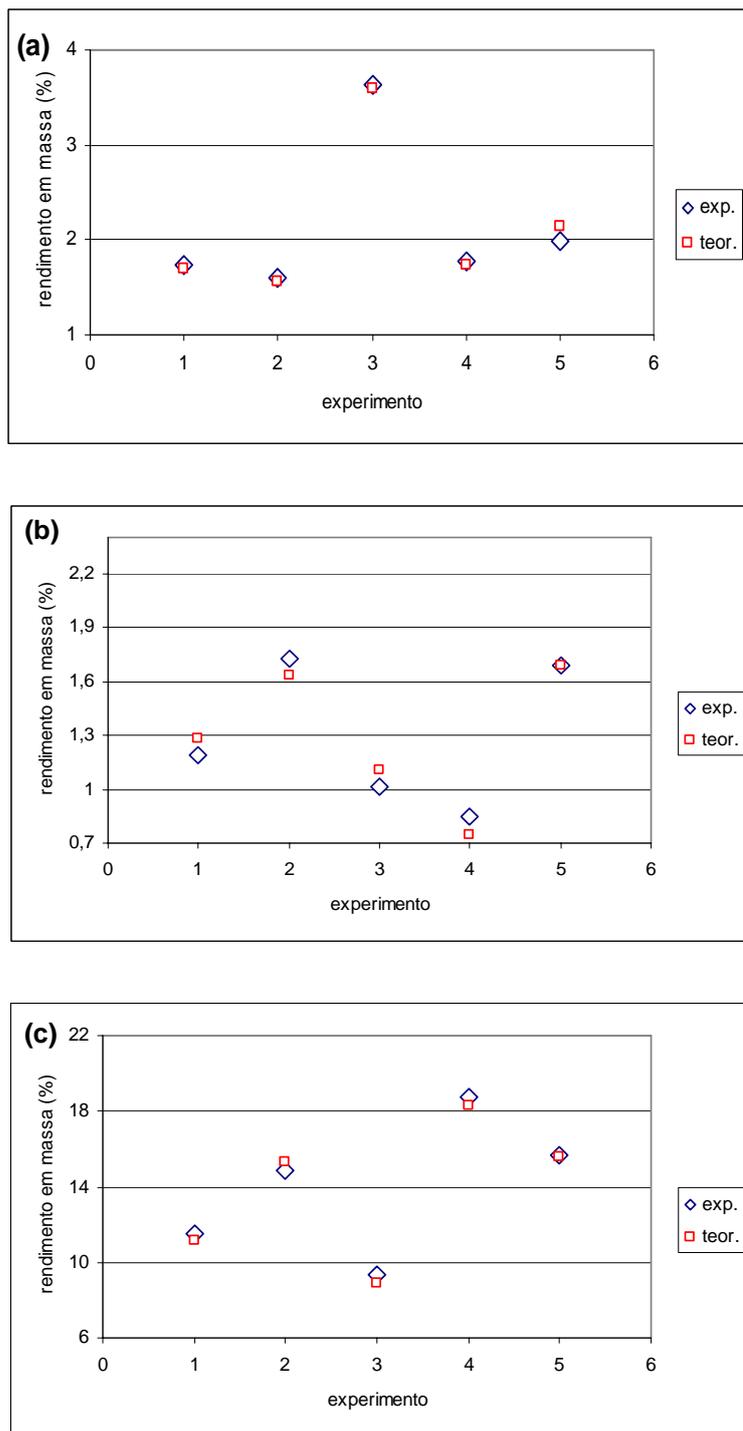


Figura 4.19: Comparação gráfica entre os resultados experimentais e teóricos para o planejamento fatorial com o modelo de superfície de resposta, **(a)** n-hexano; **(b)** acetato de etila e **(c)** metanol

4.2.3.2 Estudo cromatográfico dos extratos obtidos por PLE

A **Figura 4.20** apresenta os cromatogramas do íon total para os extratos obtidos aplicando-se o modelo da superfície de resposta, na melhor condição experimental para cada solvente, utilizando os três solventes extratores (n-hexano, acetato de etila e metanol). A **Tabela XLI** apresenta os compostos identificados nos três cromatogramas.

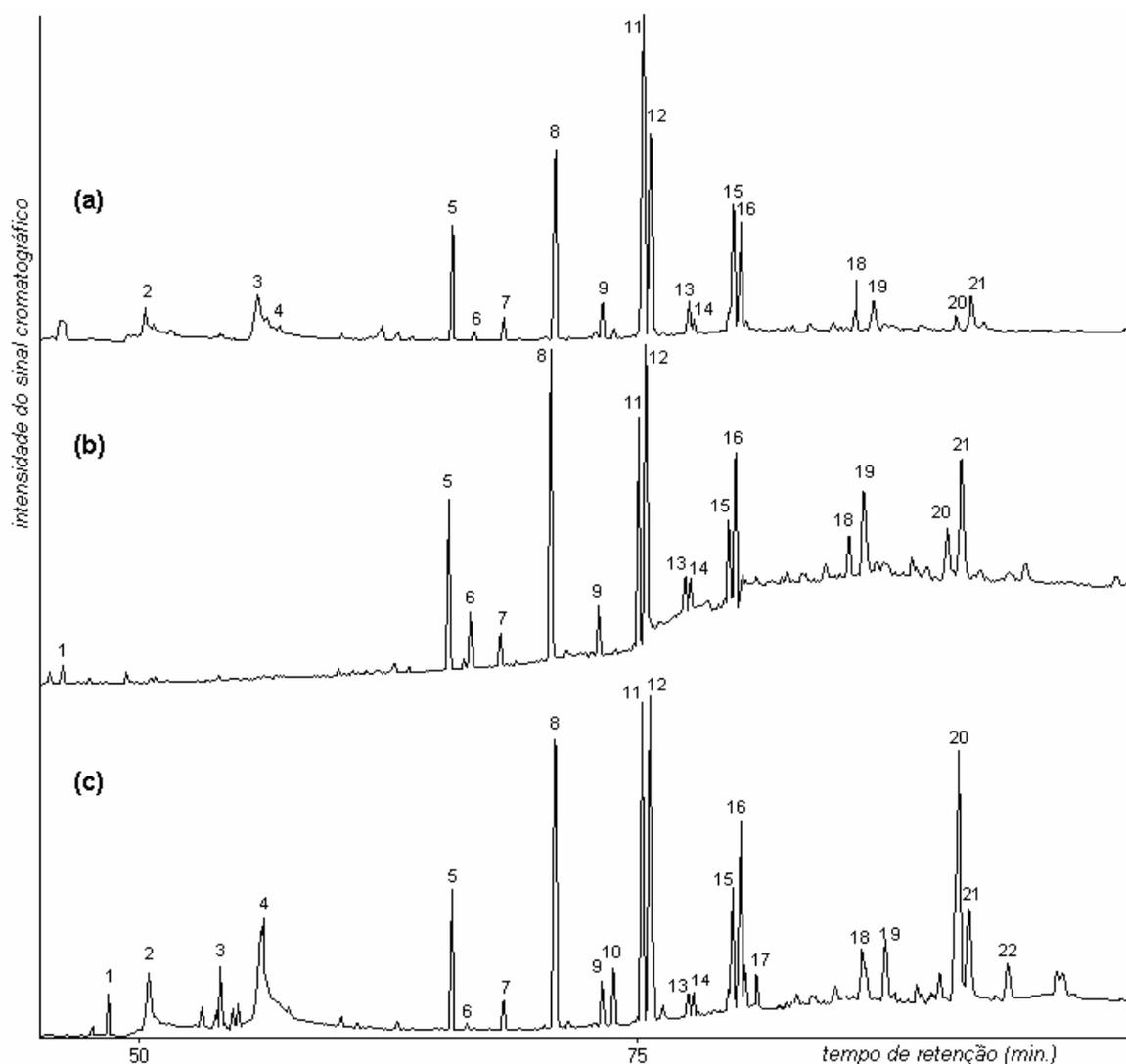


Figura 4.20: Cromatogramas do íon total para os extratos obtidos aplicando-se o modelo da superfície de resposta, utilizando como solvente extrator n-hexano (A), acetato de etila (B) e metanol (C). Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII** e identificação dos picos assinalados de acordo com a **Tabela XL**.

Tabela XLI: Identificação dos picos assinalados na **Figura 4.20**

pico	tR	nome	PM	fórmula
1	48,44	hexadecanoato de metila	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
2	50,44	ác. hexadecanóico	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
3	56,07	octadecanol	270	C ₁₈ H ₃₈ O
4	56,26	ác. octadecadienóico	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
5	65,73	pentacosanol	368	C ₂₅ H ₅₂ O
6	65,87	pentacosano	352	C ₂₅ H ₅₂
7	68,32	hexacosano	366	C ₂₆ H ₅₄
8	70,91	heptacosano	370	C ₂₇ H ₅₆
9	73,25	octacosanol	410	C ₂₈ H ₅₈ O
10	75,29	octacosano	394	C ₂₈ H ₅₈
11	75,69	nonacosanol	424	C ₂₉ H ₆₀ O
12	75,83	nonacosano	408	C ₂₉ H ₆₀
13	77,63	hentriacontanol	452	C ₃₁ H ₆₄ O
14	77,87	hentriacontano	436	C ₃₁ H ₆₄
15	79,82	dotriacontanol	466	C ₃₂ H ₆₆ O
16	80,20	dotriacontano	450	C ₃₂ H ₆₆
17	83,58	estigmasta-5-24(28)dien-3-ol	412	C ₂₉ H ₄₈ O
18	84,77	estigmasta-5-22-dien-3-ol	412	C ₂₉ H ₄₈ O
19	86,89	estigmasta-5-en-3-ol	414	C ₂₉ H ₅₀ O
20	87,41	estigmasta-4-22-dien-3-ona	410	C ₂₉ H ₄₆ O
21	89,37	estigmasta-7-16-dien-3-ol	412	C ₂₉ H ₄₈ O
22	92,13	estigmasta-4-en-3-ona	412	C ₂₉ H ₄₈ O

Percebe-se pela análise conjunta dos cromatogramas que quando se utilizou o n-hexano e o metanol como solventes extratores, os compostos identificados foram bastante semelhantes em termos qualitativos. Quando o solvente extrator foi o acetato de etila, observa-se que para substâncias com menores tempos de retenção (mais voláteis) o poder de extração do solvente não se mostrou eficiente, entretanto, a um tempo de retenção mais elevado, os compostos extraídos foram os mesmos dos demais solventes utilizados.

Os extratos obtidos nas melhores condições de cada etapa do planejamento estatístico foram avaliados quantitativamente pelo método de padronização interno (Lanças, 1993) em três etapas. Na primeira etapa avaliaram-se os hidrocarbonetos (usando uma solução padrão chamada de solução 1); na segunda etapa avaliaram-se os fitosteróis e a vitamina E (solução 2) e na terceira etapa, os ésteres metílicos

dos ácidos carboxílicos (solução 3). Em todas as soluções usou-se o perileno como padrão interno.

A **Tabela XLII** apresenta os fatores de resposta relativos calculados para cada padrão a partir das respectivas soluções padrão utilizadas, além do desvio padrão para cada valor, determinado em triplicata.

Tabela XLII: Cálculo dos fatores de resposta e da repetibilidade da análise quantitativa

	composto	LQ ($\mu\text{g/g}$)	Cisp ($\mu\text{g mg L}^{-1}$)	FRR1	FRR2	FRR3	FRR4	MEDIA	DVP	DVP%
solução 1 (*)	octadecano	0,197	159,75	0,556	0,463	0,488	0,437	0,486	0,0511	10,5
	nonadecano	0,203	133,75	0,543	0,446	0,471	0,426	0,472	0,0513	10,9
	eicosano	0,209	127,00	0,517	0,442	0,447	0,427	0,458	0,0400	8,73
	eneicosano	0,192	126,25	0,543	0,488	0,481	0,481	0,498	0,0299	6,01
	docosano	0,197	130,00	0,513	0,479	0,472	0,480	0,486	0,0186	3,82
	tricosano	0,183	15,00	0,543	0,516	0,505	0,528	0,523	0,0162	3,10
	tetracosano	0,144	47,50	0,690	0,639	0,661	0,667	0,664	0,0211	3,17
solução 2	fitol	0,0846	11,80	1,09	1,15	1,15	-----	1,13	0,0327	2,89
	vitamina E	0,0182	134,00	0,525	0,541	0,515	-----	0,527	0,0130	2,47
	estigmasterol	0,0624	100,00	0,0146	0,0154	0,0160	-----	0,0153	$7,42 \cdot 10^3$	4,84
	estigmastanol	0,0241	148,00	$4,43 \cdot 10^3$	$3,18 \cdot 10^3$	$4,29 \cdot 10^3$	-----	$3,97 \cdot 10^3$	$6,81 \cdot 10^4$	17,2
	acetato de estigmasterol	0,0864	103,00	1,20	1,12	1,00	-----	1,11	0,0977	8,82
	estigmastadienona	0,0228	104,00	0,456	0,408	0,394	-----	0,419	0,0326	7,76
solução 3	palmitato de etila	0,0849	113,20	9,95	13,2	10,7	11,2	11,3	1,41	12,5
	estearato de metila	0,0473	184,00	1,83	2,35	1,91	1,98	2,02	0,230	11,4
	linoleato de metila	0,0108	180,00	8,00	10,3	8,32	8,71	8,84	1,03	11,6
	araquidato de metila	0,0219	150,00	3,98	5,10	4,09	4,29	4,36	0,507	11,6
	docosanoato de metila	0,0686	183,60	1,24	1,57	1,44	1,32	1,39	0,142	10,2
	lignocerato de metila	0,0181	176,00	4,91	6,03	4,86	5,30	5,27	0,543	10,3

(*) FRR = 0,510 para os HC acima de 24 átomos de carbono, calculado pela média dos FRR dos demais hidrocarbonetos

DP = desvio padrão; DP% = desvio padrão percentual; LQ = 10 x conc. correspondente à área do ruído médio do branco); Cisp = concentração na solução padrão mg L^{-1}

A **Tabela XLIII** mostra os valores de concentração dos hidrocarbonetos, em relação à massa de flores usadas em cada extrato, nas condições otimizadas de cada etapa (planejamentos 2^{4-1} , 2^3 e SR), para os três solventes estudados.

Tabela XLIII: Análise quantitativa dos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado, usando n-hexano nas condições otimizadas para cada planejamento experimental aplicado (2^{4-1} , 2^3 e superfície de resposta)

	composto	planejamento experimental					
		2^{4-1}		2^3		SR	
		Cf (ug/g)	dvp%	Cf (ug/g)	dvp %	Cf (ug/g)	dvp %
solução 1	octadecano	17,96	9,98	3,487	7,66	1,871	5,06
	nonadecano	ND	ND	0,3877	9,66	1,653	19,99
	eicosano	ND	ND	0,4748	14,15	13,20	5,64
	eneicosano	ND	ND	3,668	6,90	6,178	29,79
	docosano	14,50	16,92	0,3750	7,52	4,276	37,84
	tricosano	22,05	12,97	4,450	10,27	8,021	29,55
	tetracosano	12,61	15,31	5,534	15,77	12,27	32,05
	pentacosano	161,7	2,14	114,3	3,56	314,9	24,05
	hexacosano	30,19	6,06	30,43	12,42	61,64	20,58
	heptacosano	362,0	1,57	327,7	1,77	543,9	16,25
	octacosano	50,58	7,12	48,94	4,93	98,03	13,91
	nonacosano	460,2	2,16	348,0	15,95	683,6	10,09
	triacontano	28,82	3,11	33,02	18,07	53,68	16,17
	hentriacontano	221,8	4,50	161,9	2,97	285,3	3,55
	dotriacontano	12,06	11,41	14,58	32,05	25,74	21,18
tritriacontano	76,85	6,97	37,97	15,36	93,02	3,91	
solução 2	fitol	0,9593	15,94	0,4043	19,16	36,16	8,47
	vitamina E	8,076	15,23	3,240	10,42	14,93	14,43
	estigmasterol	1177	12,38	161,7	11,45	258,4	18,43
	estigmastanol	370,5	18,13	390,2	8,55	628,9	15,15
	acetato de estigmasterol	7,730	12,11	12,37	19,33	12,65	15,99
	estigmastadienona	16,88	14,61	4,754	11,84	10,74	14,96
solução 3	palmitato de metila	23,37	4,18	0,5021	3,95	1,507	6,18
	estearato de metila	171,7	10,20	ND	ND	ND	ND
	linoleato de metila	59,98	21,21	0,8156	5,08	1,927	15,38
	araquidato de metila	421,3	3,70	0,6343	11,39	2,240	13,75
	docosanoato de metila	1,182	2,94	ND	ND	83,79	4,09
	lignocerato de metila	54,17	3,40	43,07	1,94	203,9	9,34

Tabela XLIV: Análise quantitativa dos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado, usando acetato de etila nas condições otimizadas para cada planejamento experimental aplicado (2^{4-1} , 2^3 e superfície de resposta)

	composto	planejamento experimental					
		2^{4-1}		2^3		SR	
		Cf (ug/g)	dvp %	Cf (ug/g)	dvp %	Cf (ug/g)	dvp%
solução 1	octadecano	0,6297	2,47	1,505	17,3	ND	ND
	nonadecano	ND	ND	0,9531	8,94	ND	ND
	eicosano	4,277	1,98	0,9064	25,9	ND	ND
	eneicosano	1,249	0,47	5,560	28,9	ND	ND
	docosano	ND	ND	0,6514	21,4	ND	ND
	tricosano	1,996	0,65	7,148	13,0	0,4626	5,60
	tetracosano	2,959	3,71	10,15	34,5	0,6074	11,8
	pentacosano	83,94	2,91	285,6	23,1	10,09	20,0
	hexacosano	18,50	13,5	59,51	11,6	1,965	31,8
	heptacosano	156,7	1,10	545,3	14,3	17,68	21,4
	octacosano	28,89	1,03	120,3	38,5	2,845	8,12
	nonacosano	208,6	4,41	669,8	13,9	14,62	14,3
	triacontano	16,89	2,55	62,97	15,0	1,322	10,5
	hentriacontano	93,62	3,76	373,4	3,76	4,857	15,4
	dotriacontano	7,613	3,11	32,99	14,7	1,349	13,1
tritriacontano	30,60	6,26	104,9	15,9	1,224	4,03	
solução 2	fitol	0,3587	7,16	0,2268	17,2	1,327	10,2
	vitamina E	9,479	4,84	0,4177	12,4	28,71	10,2
	estigmasterol	18,51	14,5	306,5	3,25	ND	ND
	estigmastanol	965,3	6,02	107,4	17,8	740,8	8,80
	acetato de estigmasterol	0,7612	14,3	5,492	10,6	ND	ND
	estigmastadienona	0,4991	11,5	0,6044	16,5	16,96	14,8
solução 3	palmitato de metila	0,3344	12,9	1,474	6,80	633,7	6,95
	estearato de metila	ND	ND	ND	ND	5722	9,19
	linoleato de metila	ND	ND	2,343	8,82	204,9	8,96
	araquidato de metila	ND	ND	2,405	9,50	2175	7,87
	docosanoato de metila	ND	ND	ND	ND	7946	4,82
	lignocerato de metila	50,16	5,67	1,485	8,69	9453	8,66

Tabela XLV: Análise quantitativa dos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado, usando metanol nas condições otimizadas para cada planejamento experimental aplicado (2^{4-1} , 2^3 e superfície de resposta)

	composto	planejamento experimental					
		2^{4-1}		2^3		SR	
		Cf (ug/g)	dvp %	Cf (ug/g)	dvp %	Cf (ug/g)	dvp %
solução 1	octadecano	1,272	24,6	ND	ND	0,5979	14,7
	nonadecano	ND	ND	ND	ND	0,2883	0,04
	eicosano	ND	ND	ND	ND	0,1846	0,06
	eneicosano	ND	ND	ND	ND	20,01	10,4
	docosano	ND	ND	ND	ND	0,2274	0,05
	tricosano	ND	ND	6,741	2,07	6,164	13,8
	tetracosano	ND	ND	9,643	17,5	5,946	4,02
	pentacosano	42,92	14,6	173,8	13,8	149,7	14,5
	hexacosano	8,015	22,7	27,98	30,6	30,57	12,7
	heptacosano	81,43	13,8	226,1	6,39	347,3	11,0
	octacosano	19,73	16,5	45,49	28,5	45,41	14,7
	nonacosano	87,38	7,49	236,8	6,99	383,6	2,7
	triacontano	ND	ND	26,74	20,4	21,68	2,11
	hentriacontano	43,18	3,49	84,51	14,0	208,8	2,39
	dotriacontano	ND	ND	ND	ND	10,83	8,77
tritriacontano	ND	ND	ND	ND	10,98	13,3	
solução 2	fitol	7,761	11,2	0,5235	3,62	2,528	12,6
	vitamina E	0,9975	15,4	5,953	7,19	0,8828	21,3
	estigmasterol	1,880	15,9	5,738	12,3	16,40	5,07
	estigmastanol	1410	7,68	1825	12,0	4022	6,71
	acetato de estigmasterol	10,48	12,3	6,726	6,41	22,96	7,39
	estigmastadienona	ND	ND	14,12	10,0	0,2682	18,0
solução 3	palmitato de metila	248,9	12,0	26,38	18,3	78,41	13,6
	estearato de metila	18428	8,94	17,53	16,1	70,57	11,9
	linoleato de metila	507,5	7,57	8,989	21,0	33,14	14,1
	araquidato de metila	2662	6,13	22,18	16,8	72,14	17,7
	docosanoato de metila	8360	4,18	0,08632	22,6	19,18	7,99
	lignocerato de metila	309,9	5,62	286,30	14,6	154,5	4,36

Os dados apresentados nestas **Tabelas** podem ser melhor visualizados nas **Figuras 4.21, 4.22, 4.23 e 4.24**. A **Figura 4.21** apresenta os resultados quantitativos para os hidrocarbonetos nos extratos, a partir do tricosano, pois os hidrocarbonetos com menor número de átomos de carbono foram encontrados em quantidades muito pequenas.

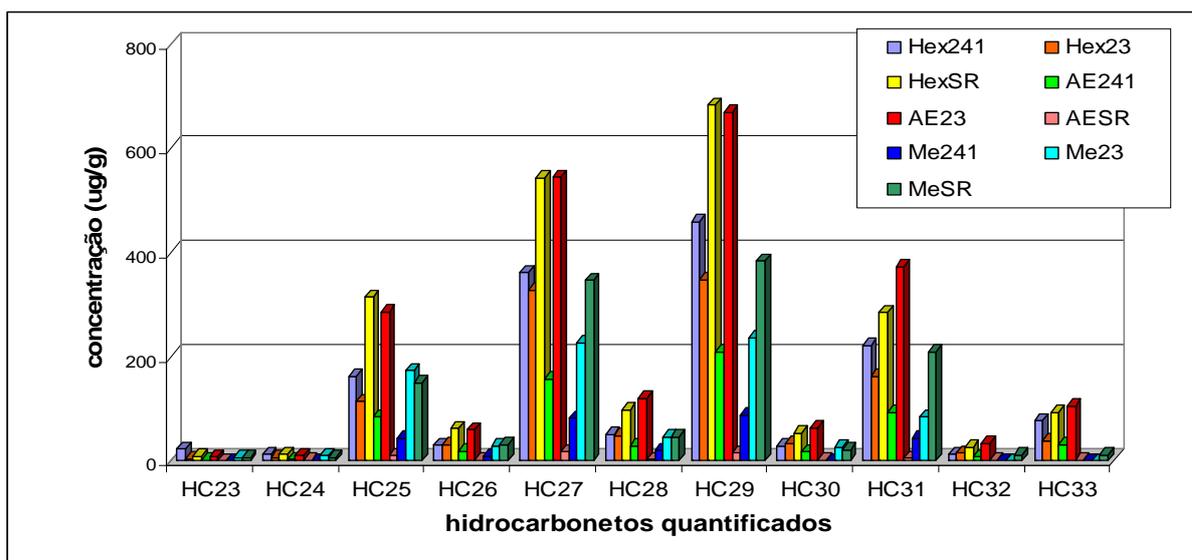


Figura 4.21: Resultados para a análise quantitativa de hidrocarbonetos saturados nos extratos obtidos por PLE das flores de *H. tiliaceus*

Legenda: Hex = n-hexano; AE = acetato de etila; Me = metanol; 241 = planejamento experimental 2^{4-1} ; 23 = planejamento experimental 2^3 ; SR = superfície de resposta

Observou-se que o hidrocarboneto com 29 átomos de carbono foi o componente majoritário entre os hidrocarbonetos quantificados, seguido dos hidrocarbonetos com 27 e 31 átomos de carbono. Os hidrocarbonetos ímpares foram mais abundantes que os pares, confirmando outros relatos de quantificação de hidrocarbonetos em plantas (Srivastava, 1976). Para os extratos obtidos com n-hexano e metanol, a quantificação permitiu observar a otimização das variáveis envolvidas no processo de extração, apresentando um aumento da quantidade dos analitos a cada etapa do planejamento estatístico. Entretanto, percebe-se a melhor performance do hexano como solvente extrator para a extração dos hidrocarbonetos estudados.

A **Figura 4.21** apresenta os resultados quantitativos para a vitamina E e o fitol nos extratos analisados. Não foi possível avaliar a otimização das variáveis em

função da quantificação do fitol e da vitamina E. Contudo, nos extratos obtidos pela SR com n-hexano e acetato de etila foram encontradas, respectivamente, as maiores concentrações destas espécies.

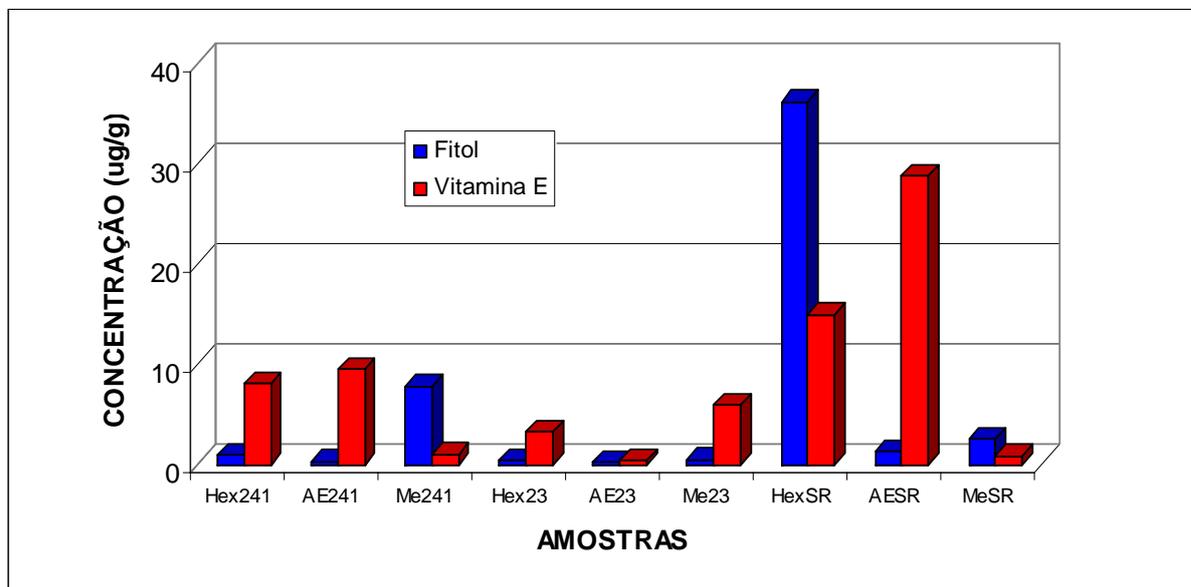


Figura 4.22: Resultados para a análise quantitativa de vitamina E e fitol nos extratos obtidos por PLE das flores de *H. tiliaceus*

A **Figura 4.23** apresenta os resultados quantitativos para os fitosteróis nos extratos analisados. Percebe-se um aumento significativo na concentração do estigmastanol conforme o aumento da polaridade do solvente. A maior concentração deste composto foi obtida com metanol no extrato obtido pela SR. Isto confirma que para este solvente houve uma otimização satisfatória, atingindo, a cada etapa do planejamento estatístico, maiores concentrações do analito. Os extratos obtidos com n-hexano apresentaram comportamento semelhante aos obtidos com metanol quanto à otimização satisfatória. Porém, apresentou menores concentrações de estigmastanol.

O estigmasterol foi encontrado em maior concentração no extrato de n-hexano. Na condição otimizada para o solvente acetato de etila (SR) foi possível observar a maior concentração da estigmastadienona entre os extratos do mesmo solvente, entretanto, para o solvente n-hexano o resultado obtido foi equivalente.

A **Figura 4.24** apresenta os resultados quantitativos para os ésteres metílicos nos extratos analisados.

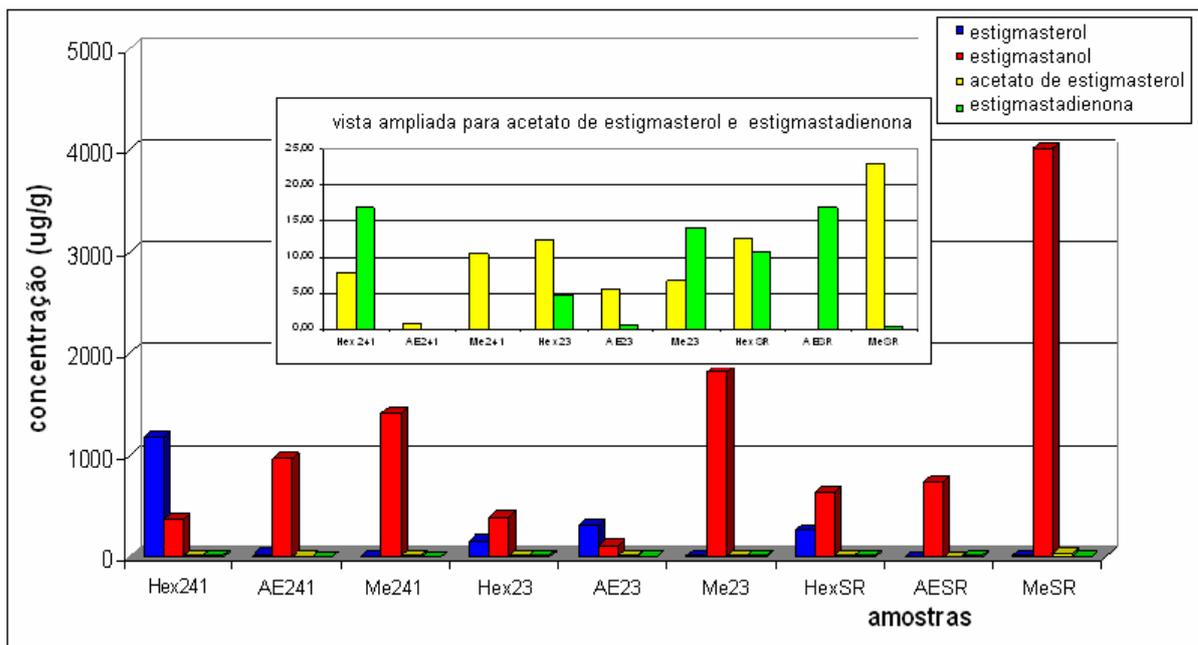


Figura 4.23: Resultados para a análise quantitativa dos fitosteróis nos extratos obtidos por PLE das flores de *H. tiliaceus*

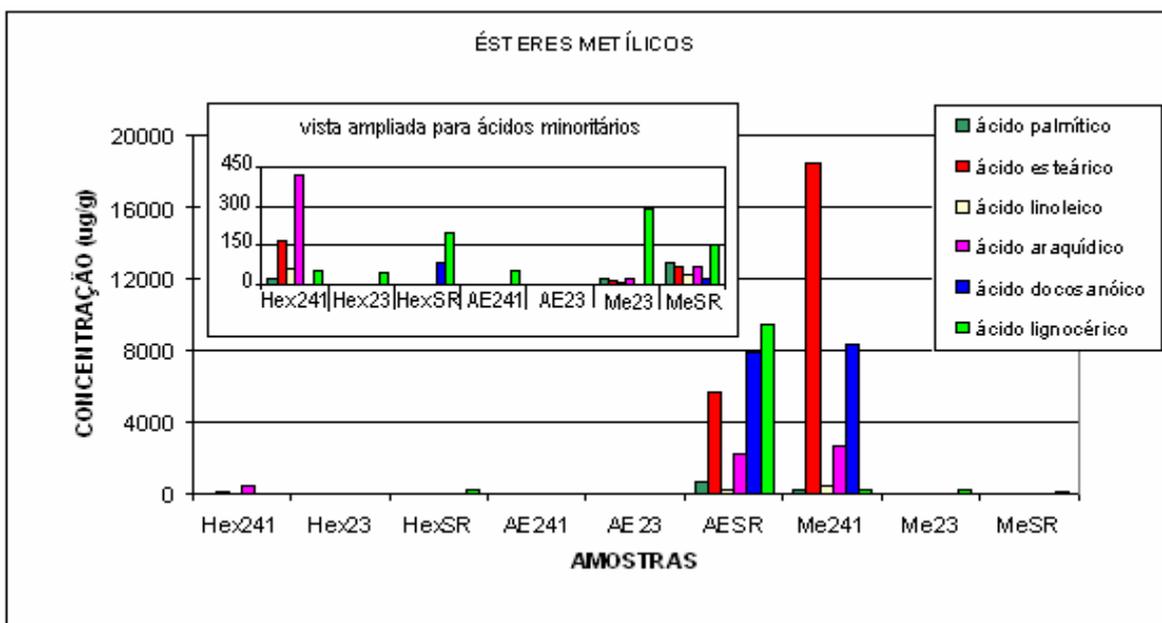


Figura 4.24: Resultados para a análise quantitativa dos ésteres metílicos nos extratos obtidos por PLE das flores de *H. tiliaceus*

Os ésteres metílicos dos ácidos palmítico (hexadecanóico) e esteárico (octadecanóico) foram majoritários em todas as amostras.

Todos os resultados quantitativos encontrados confirmaram a análise quantitativa feita para os extratos obtidos com SFE, conforme pode ser visto através da comparação das **Figuras 4.15** e **4.16**, e da **Tabela XXXVI** com os dados aqui apresentados.

4.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS - 3ª PARTE: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Considerando-se os resultados obtidos no capítulo anterior, e com o objetivo de comparar a eficácia do SFE e PLE frente a outros métodos de extração, realizou-se um estudo comparativo destes métodos em relação a métodos convencionais — tais como maceração e extração por Soxhlet — e não convencionais, como extração por ultra-som.

4.3.1 Comparação entre os rendimentos percentuais em massa

Efetuaram-se extrações sucessivas do material vegetal — por Soxhlet, maceração e ultra-som — com aumento de polaridade do solvente, visando conhecer a capacidade extrativa destes solventes (n-hexano, acetato de etila e metanol) para os diferentes métodos. Empregaram-se tempos de 40 horas na extração por Soxhlet, para conseguir o esgotamento do material vegetal, 140 minutos na extração por ultra-som, e de oito dias na maceração, já que para esta recomenda-se um tempo entre dois e quatorze dias.

Nas extrações realizadas com SFE, com CO₂ puro e com solventes modificadores (n-hexano, acetato de etila e metanol) o tempo empregado foi de 20 minutos. Já na extração por PLE, os solventes extratores foram os mesmos utilizados para as extrações anteriores, e o tempo de extração foi de 75 minutos. A **Tabela XLVI** apresenta os resultados desse estudo comparativo.

Tabela XLVI: Resultados da comparação de rendimento (% de massa) dos procedimentos de extração aplicados às flores de *H. tiliaceus*

solvente	Rendimento em massa (%)				
	Soxhlet (40 h)	maceração (8 dias)	ultra-som (140 min)	SFE (20 min)	PLE (75 min)
CO ₂	---	---	---	0,78	---
n-hexano	10,26	3,67	4,53	(*) 1,27	2,15
acetato de etila	17,54	1,20	7,80	(*) 1,50	2,04
metanol	5,67	3,67	12,82	(*) 2,05	18,31

(*) rendimentos para extrações com CO₂, adicionando cada um dos solventes indicados

Nesta **Tabela** observa-se que, para o método de extração por Soxhlet, os solventes com maior poder extrativo foram o acetato de etila (17,54%) e o n-hexano (10,26%). Quando o processo de extração ocorreu por maceração, os menores percentuais de rendimento foram obtidos quando se empregou como solvente o acetato de etila (1,20%), alcançando-se percentual idêntico (3,67%) para o metanol e n-hexano.

Os rendimentos percentuais para o método de ultra-som, com um tempo de extração de 140 minutos, foram superiores com o metanol (12,82%), seguido do acetato de etila (7,80%), sendo baixo (4,53%) quando se emprega o n-hexano como solvente, confirmando o estudo estatístico realizado no capítulo anterior, que indicou a polaridade do solvente como variável principal do processo. Os resultados obtidos evidenciaram diferenças notáveis na capacidade extrativa dos solventes empregados, sendo influenciados pelo método de extração utilizado.

Observou-se, igualmente, que os maiores rendimentos foram alcançados com n-hexano e acetato de etila empregando o método de Soxhlet, o que se deve às características do processo — contínuo — e do tempo empregado — 40 horas.

Na extração por maceração, quando comparada à feita por ultra-som, todos os rendimentos foram inferiores, independentemente do solvente empregado. Este método de extração, além de empregar um tempo relativamente grande (8 dias), não

logra extrair todos os compostos presentes na planta, o que explica as diferenças nas concentrações obtidas em relação ao método de extração por Soxhlet.

Na comparação do método de extração por ultra-som com o de Soxhlet observou-se que, para os solventes de menor polaridade (n-hexano e acetato de etila), as porcentagens de substâncias extraídas eram menores. Entretanto, para o metanol, conseguia-se uma porcentagem de substâncias extraídas superior.

Quando a extração ocorreu por SFE, utilizando CO₂ como solvente extrator, o resultado do rendimento obtido foi o mais baixo de todos, permanecendo baixo, mesmo quando adicionado os solventes modificadores (n-hexano, acetato de etila e metanol).

Os rendimentos percentuais para o método do PLE, com um tempo de extração de 75 minutos, foram superiores com o metanol (18,31%), seguido do n-hexano (2,15%), sendo baixo (2,04%) quando se emprega o acetato de etila como solvente. Observou-se, igualmente, que os rendimentos apresentados no PLE foram superiores quando comparados aos do SFE. Quando foi utilizado metanol como solvente modificador, o rendimento apresentado na extração por PLE, foi superior a todos os demais métodos estudados.

A análise conjunta destes resultados permitiu afirmar que a extração por ultra-som, em termos de rendimento, é superior à maceração, com qualquer dos solventes empregados. Em relação à extração por Soxhlet, a extração com ultra-som resulta mais eficiente quando o solvente empregado é de maior polaridade. Quando se compara esta técnica com a SFE, a extração com ultra-som resulta mais eficiente para todos os solventes empregados. Comparando ultra-som e PLE, tem-se ainda o ultra-som como mais eficiente quando os solventes modificadores empregados são n-hexano e acetato de etila. Quando da utilização do solvente modificador metanol, a extração por PLE se mostrou a mais eficiente técnica de todas as estudadas neste trabalho, em termos de rendimento.

4.3.2 Análise cromatográfica (GC-MS) dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração

A comparação entre os extratos obtidos com diferentes solventes e por diferentes técnicas de extração foi realizada também pelo perfil cromatográfico e identificação de alguns compostos. Esta análise será apresentada a seguir conforme o solvente usado na extração. Por problemas técnicos a coluna foi trocada durante a realização dos experimentos e, por esta razão, sempre que os cromatogramas forem apresentados será indicada qual a coluna usada.

4.3.2.1 Extrato obtido com CO₂ supercrítico

Este solvente foi usado apenas no processo de SFE. A **Figura 4.25** e a **Tabela XLVII** apresentam o cromatograma do extrato obtido com CO₂ supercrítico na extração de flores de *H. tiliaceus* L., usando-se pressão de 200 bar e temperatura de 40 °C (melhores condições para esta técnica).

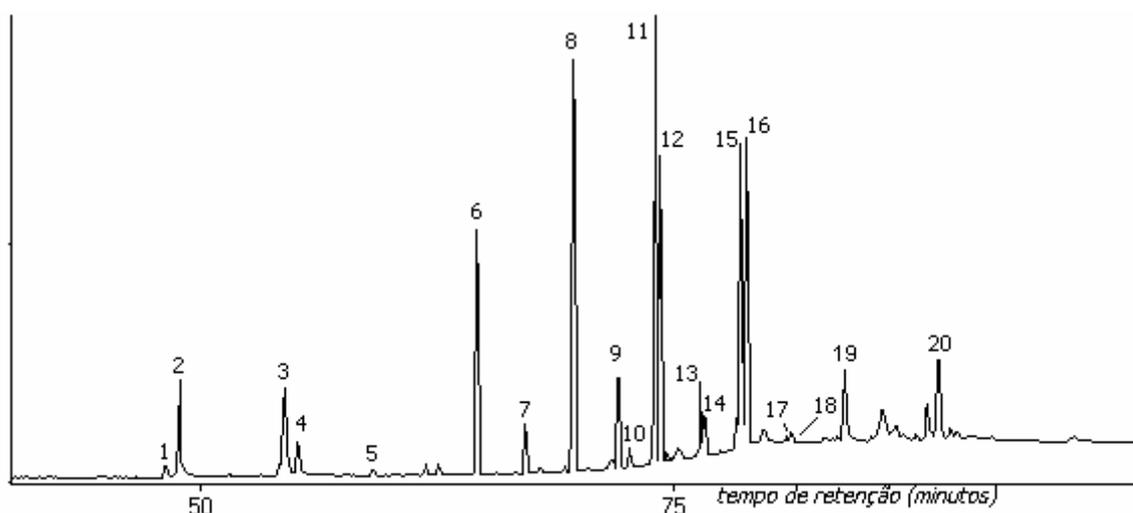


Figura 4.25. Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. obtido por SFE com CO₂ (T = 200 bar; T = 40 °C). Coluna capilar usada OV-05 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

Tabela XLVII: Identificação dos picos assinalados na **Figura 4.25.**

pico	PM	nome	fórmula
1	254	ác. hexadecenóico	$C_{16}H_{30}O_2$
2	256	ác. hexadecanóico (ác. palmitóico)	$C_{16}H_{32}O_2$
3	280	ác. octadecenóico	$C_{18}H_{32}O_2$
4	284	ác. octadecanóico (ác. esteárico)	$C_{18}H_{36}O_2$
5	338	tetracosano	$C_{24}H_{50}$
6	352	pentacosano	$C_{25}H_{52}$
7	366	hexacosano	$C_{26}H_{54}$
8	280	heptacosano	$C_{27}H_{56}$
9	394	octacosano	$C_{28}H_{58}$
10	410	esqualeno	$C_{30}H_{50}$
11	424	nonacosanol	$C_{29}H_{60}O$
12	408	nonacosano	$C_{29}H_{60}$
13	438	triacontanol	$C_{30}H_{62}O$
14	422	triacontano	$C_{30}H_{62}$
15	452	hentriacontanol	$C_{31}H_{64}O$
16	436	hentriacontano	$C_{31}H_{64}$
17	466	dotriacontanol	$C_{32}H_{66}O$
18	450	dotriacontano	$C_{32}H_{66}$
19	464	tritriacontano	$C_{33}H_{68}$
20	412	estigmasta-4-en-3-ona	$C_{29}H_{48}O$

De uma forma geral, foram identificados vários hidrocarbonetos saturados (de 24 a 33 átomos de carbono) incluindo o esqualeno, vários álcoois desde 29 a 32 átomos de carbono, uma cetona e quatro ácidos carboxílicos. Os compostos majoritários (considerando-se a área dos picos cromatográficos encontrados no cromatograma) foram os hidrocarbonetos com número ímpar de carbonos (C25 a C31), além dos álcoois com 29 e 31 átomos de carbono.

A presença dos hidrocarbonetos saturados lineares de cadeia longa (24 a 33 átomos de carbono) não era esperada inicialmente, por não serem componentes comuns a plantas. A caracterização destes compostos, dada sua escassez em espécies vegetais, foi confirmada pelo emprego de padrões. Por esta razão, ressalta-se que tal identificação foi confirmada por análise em triplicata, com limpeza prévia de todo o material do laboratório, para evitar o aparecimento de hidrocarbonetos como contaminantes.

A presença de ácidos graxos de cadeia longa e de terpenóides nas flores e casca de outras espécies do gênero *Hibiscus* foi informada anteriormente (Seca et

al., 2001) embora não tenham sido encontrados registros dessa presença para a espécie *H. tiliaceus* L.

4.3.2.2 Extratos obtidos com n-hexano

Este solvente foi usado nas extrações com PLE, Soxhlet, maceração e ultra-som, além de ser usado como solvente modificador na extração com CO₂ supercrítico. As **Figuras 4.26 a 4.30** apresentam os cromatogramas correspondentes a estes extratos e na **Tabela XLVIII** tem-se a identificação dos picos assinalados nestas **Figuras**.

Nota-se que os cromatogramas apresentados nessas **Figuras** foram analisados em colunas de comprimentos diferentes: os extratos de maceração, Soxhlet e ultra-som foram analisados em uma coluna com 60 metros, enquanto que o extrato de SFE e PLE foram analisados em uma coluna de 30 metros. Isto explica as diferenças de tempo de retenção encontradas.

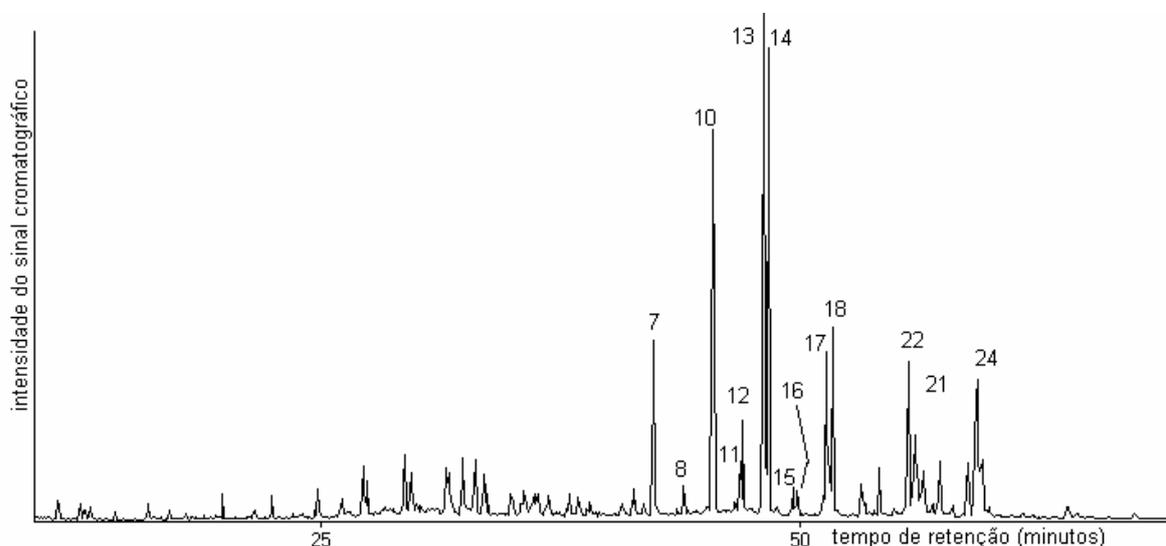


Figura 4.26: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. extraído com n-hexano com Soxhlet. Coluna capilar usada: OV-05 (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

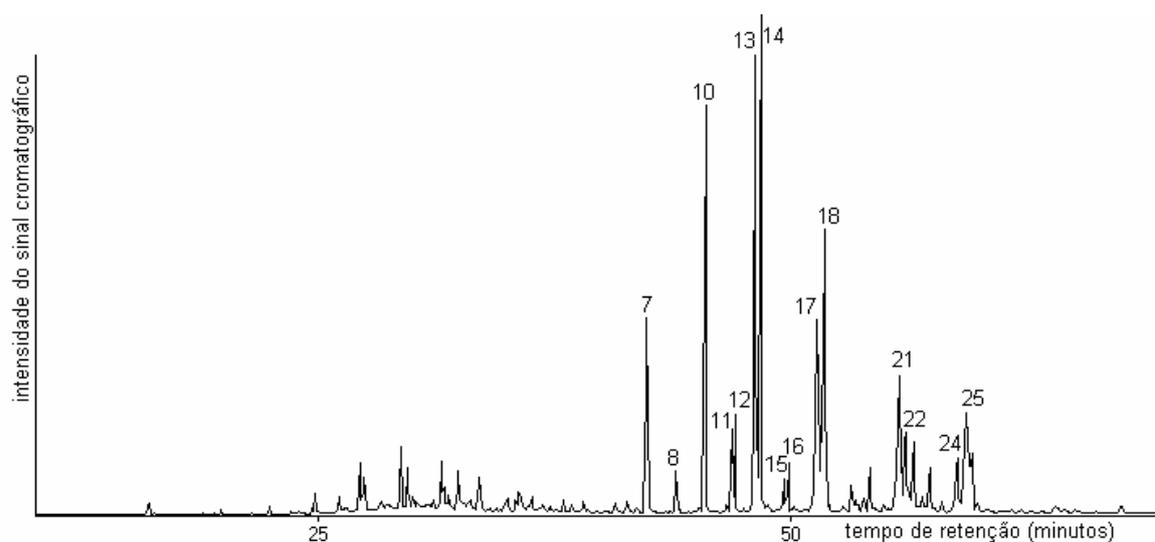


Figura 4.27: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. extraído com n-hexano por maceração. Coluna capilar usada OV-05 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

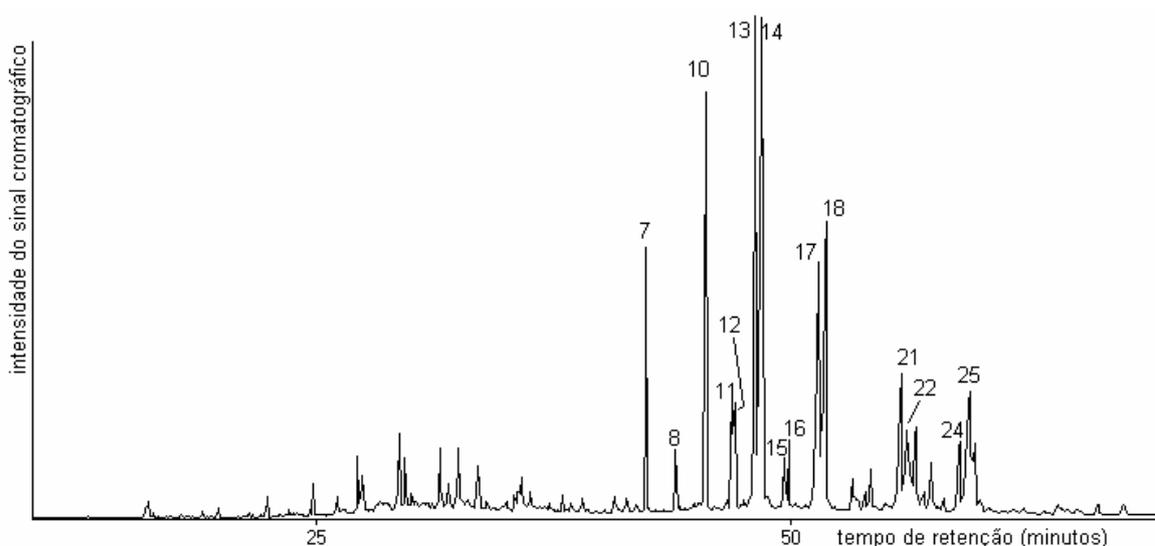


Figura 4.28: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. extraído com n-hexano com ultra-som. Coluna capilar usada OV-05 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

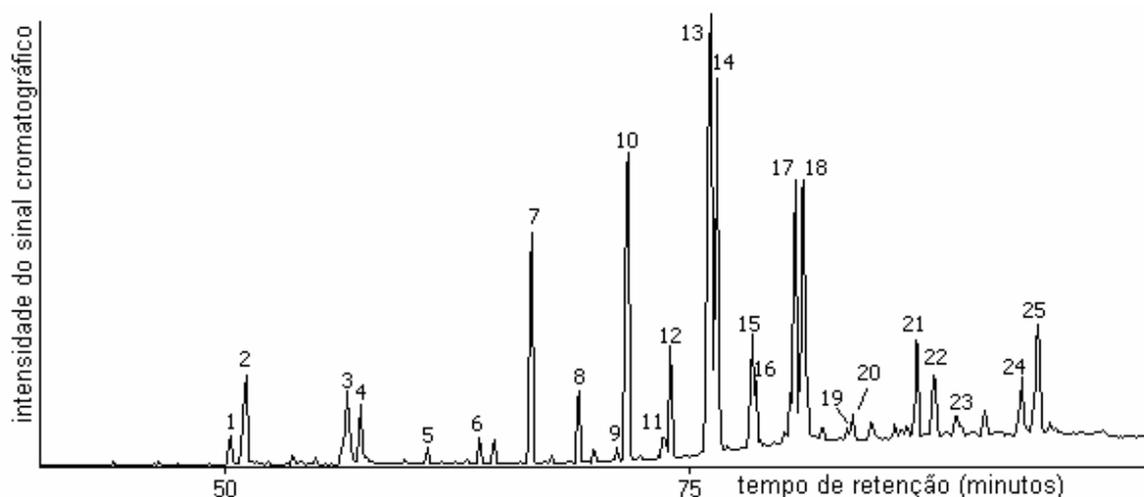


Figura 4.29: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. obtido por SFE com CO₂ (T = 200 bar; T = 40 °C) e n-hexano como solvente modificador. Coluna capilar usada OV-05 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

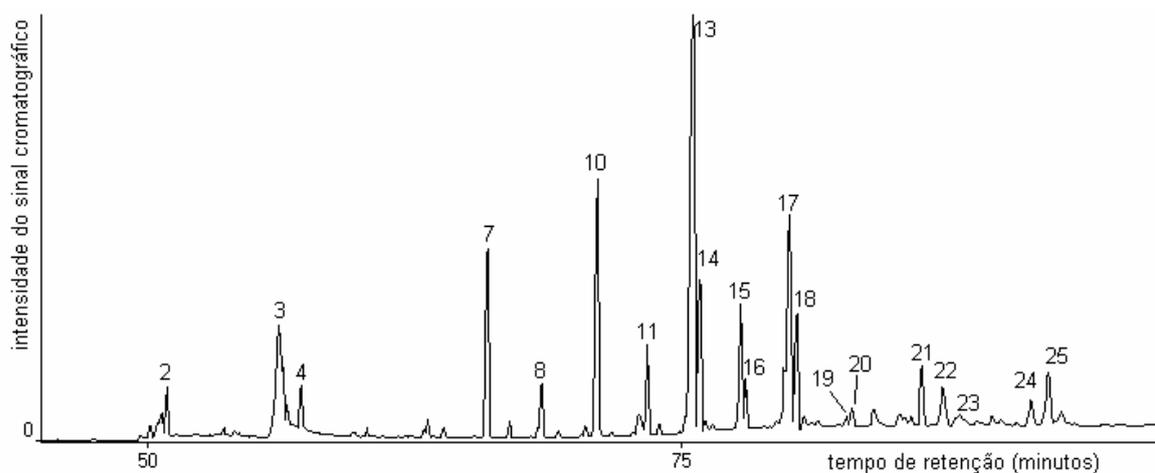


Figura 4.30: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. obtido por PLE com n-hexano. Coluna capilar usada OV-05 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

Tabela XLVIII: Identificação dos picos assinalados nas **Figuras 4.26 a 4.30**

pico	PM	nome	fórmula
1	254	ác. hexadecenóico	$C_{16}H_{30}O_2$
2	256	ác. hexadecanóico (ác. palmítico)	$C_{16}H_{32}O_2$
3	282	ác. octadecenóico	$C_{18}H_{32}O_2$
4	284	ác. octadecanóico (ác. esteárico)	$C_{18}H_{34}O_2$
5	324	tricosano	$C_{23}H_{48}$
6	338	tetracosano	$C_{24}H_{50}$
7	352	pentacosano	$C_{25}H_{52}$
8	366	hexacosano	$C_{26}H_{54}$
9	396	heptacosanol	$C_{27}H_{56}O$
10	380	heptacosano	$C_{27}H_{56}$
11	410	octacosanol	$C_{28}H_{58}O$
12	394	octacosano	$C_{28}H_{58}$
13	424	nonacosanol	$C_{29}H_{60}O$
14	408	nonacosano	$C_{29}H_{60}$
15	438	triacontanol	$C_{30}H_{62}O$
16	422	triacontano	$C_{30}H_{62}$
17	452	hentriacontanol	$C_{31}H_{64}O$
18	436	hentriacontano	$C_{31}H_{64}$
19	340	dotriacontanol	$C_{23}H_{48}O$
20	422	dotriacontano	$C_{30}H_{62}$
21	436	tritriacontano	$C_{35}H_{72}$
22	414	estigmastan-5-en-3-ol	$C_{29}H_{50}O$
23	330	estigmasta-4,24-dien-3-ona (fucostenona)	$C_{29}H_{46}O$
24	412	estigmasta-7,16-dien-3-ol	$C_{29}H_{48}O$
25	412	estigmasta-4-en-3-ona	$C_{29}H_{48}O$

Percebe-se pela análise dessas mesmas **Figuras 4.26 a 4.30** e da **Tabela XLVIII**, que existe grande semelhança entre os extratos obtidos pelas diferentes técnicas, embora a intensidade dos picos cromatográficos indique diferenças quantitativas entre alguns componentes, que podem ser devidas à capacidade extrativa do solvente, influenciada por cada técnica específica de extração. Os extratos obtidos por maceração, Soxhlet e ultra-som apresentaram compostos de menor massa molecular (com tempos de retenção entre 10 e 40 minutos) os quais, devido à sua baixa concentração na amostra, não puderam ser identificados. No extrato obtido com CO_2 - SFE estes compostos não foram detectados. Novamente tem-se como compostos majoritários, os hidrocarbonetos e os álcoois. Os extratos com n-hexano obtidos por PLE, apresentaram praticamente os mesmos compostos identificados por SFE.

A identificação tentativa dos compostos realizou-se por comparação com a biblioteca de espectros de massas do equipamento, sendo considerados somente aqueles cuja correlação com a biblioteca foi superior a 90%. Para a confirmação da identificação dos compostos, foram usadas soluções-padrão.

4.3.2.3 Extratos obtidos com acetato de etila

De forma semelhante ao n-hexano, o acetato de etila também foi usado nas extrações com Soxhlet, maceração e ultra-som, além de ser usado como solvente modificador na extração com CO₂ supercrítico. As **Figuras 4.31 a 4.35** apresentam os cromatogramas correspondentes a estes extratos e na **Tabela XLIX** tem-se a identificação dos picos assinalados nestas **Figuras**.

Como se observa nessas **Figuras**, os extratos continuaram apresentando grande semelhança. Neles manteve-se a presença de alguns hidrocarbonetos saturados, fundamentalmente de 23 a 33 átomos de carbono. Também se percebe a presença de compostos com menor ponto de ebulição (menores tempos de retenção) nos extratos obtidos pelas primeiras três técnicas, enquanto a SFE extraiu compostos mais pesados, assim como PLE. Os compostos mais leves não puderam ser identificados devido à baixa resolução do espectro de massas dos mesmos e a inexistência de informações na literatura sobre sua caracterização.

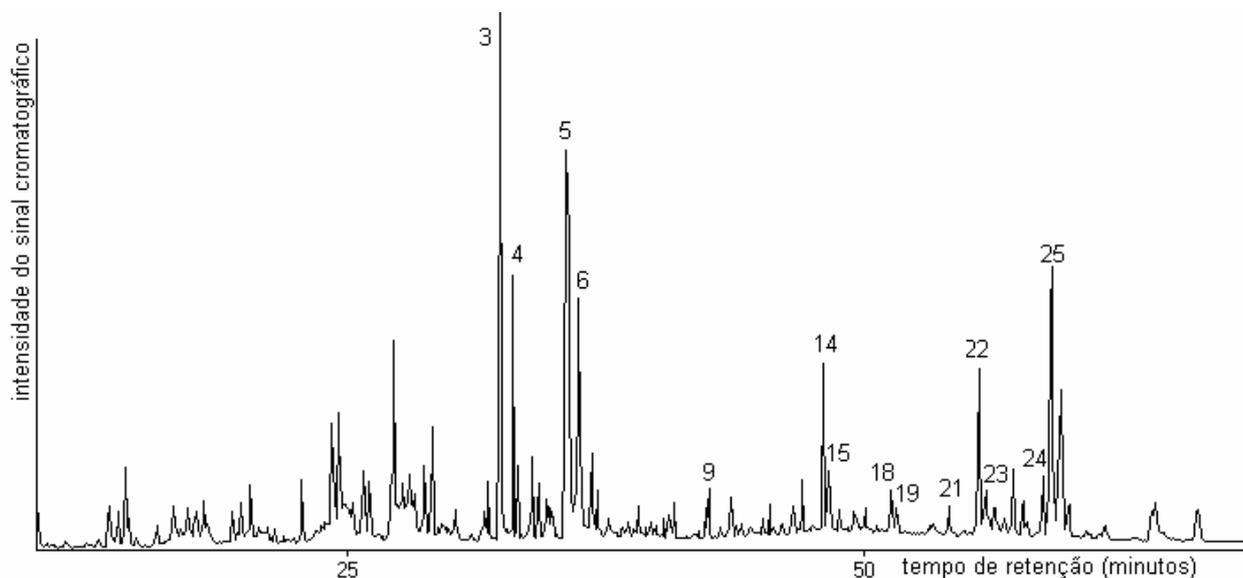


Figura 4.31: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. extraído com acetato de etila com Soxhlet. Coluna capilar usada OV-05 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

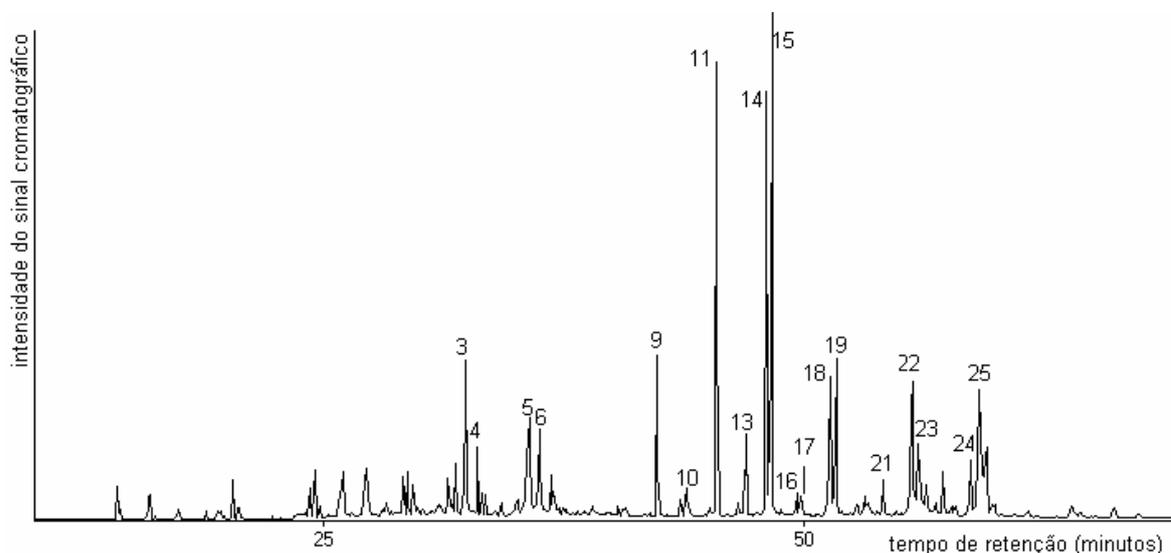


Figura 4.32: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. extraído com acetato de etila por maceração. Coluna capilar usada OV-05 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

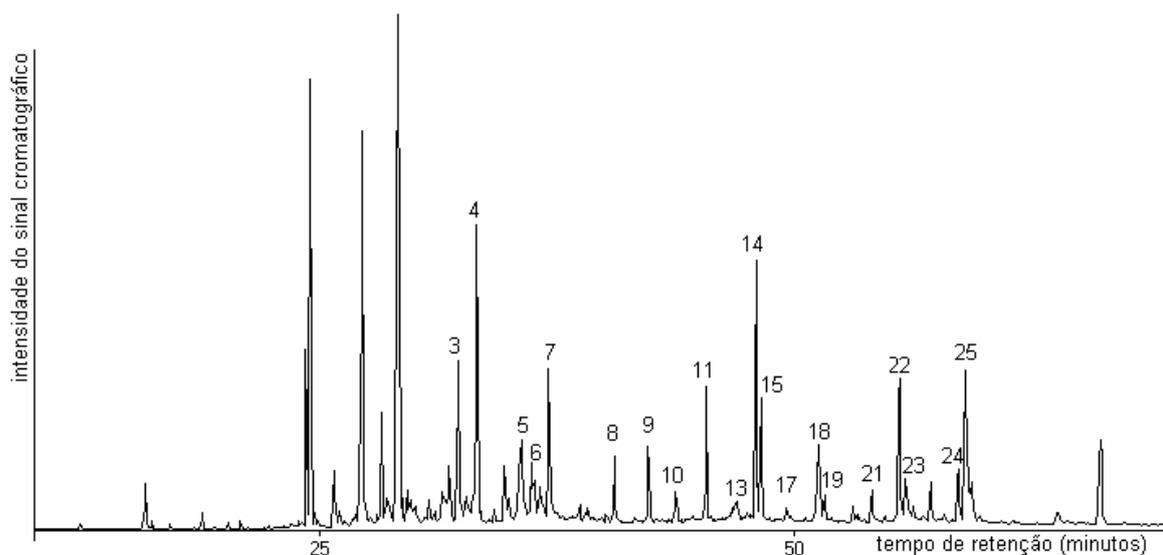


Figura 4.33: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. extraído com acetato de etila com ultra-som. Coluna capilar usada OV-05 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

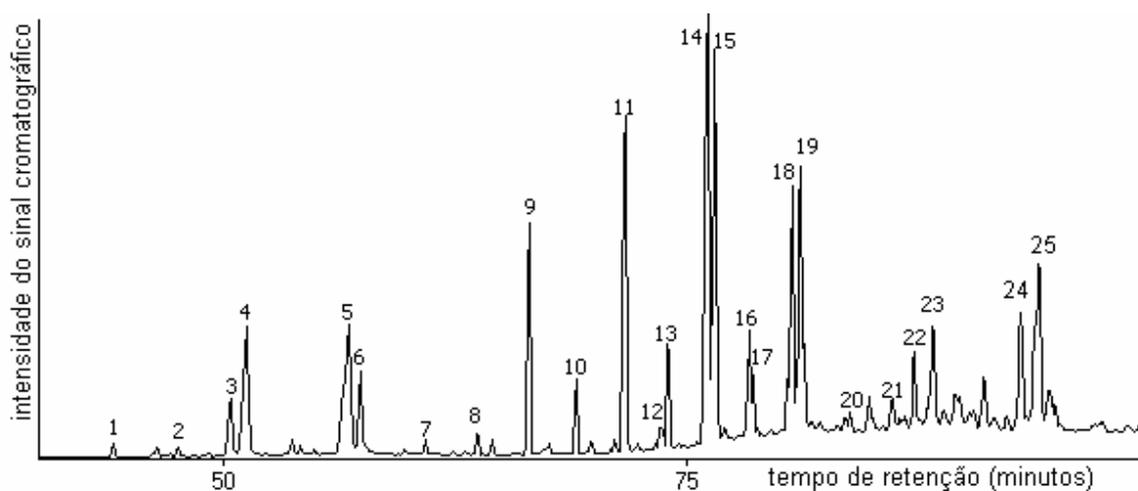


Figura 4.34: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. obtido com SFE com CO_2 ($T = 200$ bar; $T = 40$ $^\circ\text{C}$) e acetato de etila como solvente modificador. Coluna capilar usada OV-05 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

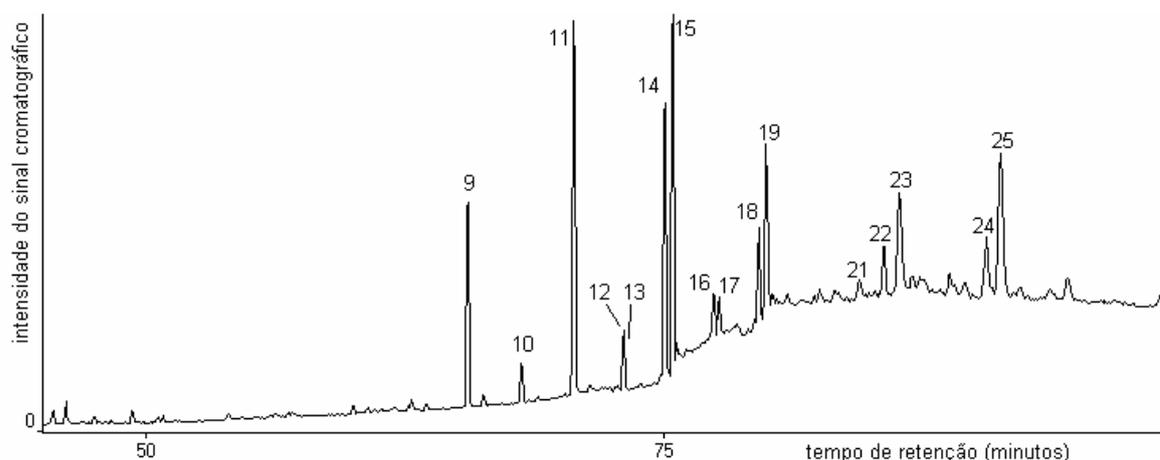


Figura 4.35: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. obtido por PLE com acetato de etila. Coluna capilar usada OV-05 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

Tabela XLIX: Identificação dos picos assinalados nas **Figuras 4.31 a 4.35**.

pico	PM	nome	fórmula
1	228	ác. tetradecanóico	$C_{14}H_{28}O_2$
2	242	ác. pentadecanóico	$C_{15}H_{30}O_2$
3	254	ác. hexadecenóico	$C_{16}H_{30}O_2$
4	256	ác. hexadecanóico (ác. palmítico)	$C_{16}H_{32}O_2$
5	280	ác. octadecadienóico	$C_{18}H_{32}O_2$
6	284	ác. octadecanóico (ác. esteárico)	$C_{18}H_{36}O_2$
7	324	tricosano	$C_{23}H_{48}$
8	338	tetracosano	$C_{24}H_{50}$
9	352	pentacosano	$C_{25}H_{52}$
10	366	hexacosano	$C_{26}H_{54}$
11	380	heptacosano	$C_{27}H_{56}$
12	410	octacosanol	$C_{28}H_{58}O$
13	394	octacosano	$C_{28}H_{58}$
14	424	nonacosanol	$C_{29}H_{60}O$
15	408	nonacosano	$C_{29}H_{60}$
16	438	triacontanol	$C_{30}H_{62}O$
17	422	triacontano	$C_{30}H_{62}$
18	452	hentriacontanol	$C_{31}H_{64}O$
19	436	hentriacontano	$C_{31}H_{64}$
20	493	dotriacontano	$C_{32}H_{66}$
21	493	tritriacontano	$C_{33}H_{68}$
22	412	estigmasta-5-22-dien-3-ol	$C_{29}H_{48}O$
23	414	estigmasta-5,en-3-ol	$C_{29}H_{50}O$
24	410	estigmasta-4-22-dien-3-ona	$C_{29}H_{46}O$
25	412	estigmasta-4,en-3-ona	$C_{29}H_{48}O$

4.3.2.4 Extratos obtidos com metanol

Os cromatogramas do ion total (TIC) dos extratos obtidos com maceração, Soxhlet, ultra-som, SFE e PLE, usando metanol são apresentados nas **Figuras 4.36 a 4.40**. A identificação tentativa dos picos assinalados nestas **Figuras** está apresentada na **Tabela XL**. Essas amostras foram derivatizadas (usando BF₃ em metanol) devido à elevada polaridade do solvente usado.

Nessas **Figuras**, observa-se semelhança entre os cromatogramas obtidos com maceração, Soxhlet e ultra-som. Entretanto, neste caso, os extratos obtidos por maceração e ultra-som são mais semelhantes do que os obtidos com Soxhlet.

Destaca-se nestes extratos a presença de ácidos e ésteres metílicos, indicando que a metilação não foi satisfatória, ou seja, ainda restando ácidos que não foram derivatizados.

Observa-se nos extratos obtidos com metanol, a presença majoritária de álcoois e hidrocarbonetos saturados. Destaca-se nestes extratos a presença do α -tocoferol (Pico 23), não informado anteriormente para a espécie. Este composto, reconhecido como antioxidante, pode ser responsável pela atividade desta planta relacionada a alguns dos usos tradicionais relatados para a espécie.

Para SFE e PLE, observa-se que enquanto SFE extraiu compostos mais voláteis (menor tempo de retenção), PLE extraiu compostos com menos voláteis (com maior tempo de retenção).

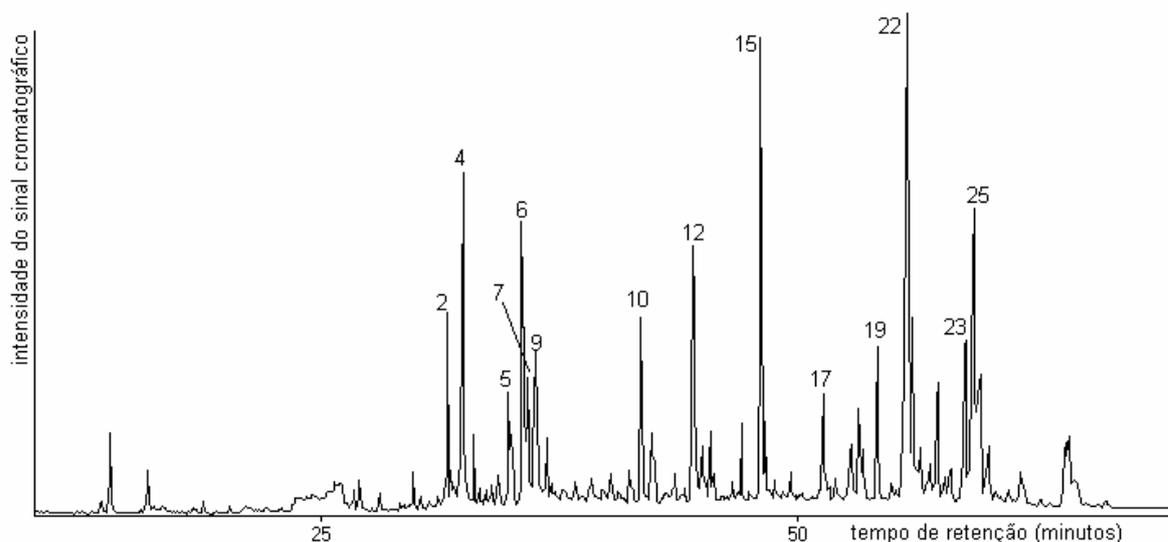


Figura 4.36: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. extraído com metanol por maceração. Coluna capilar usada OV-05 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

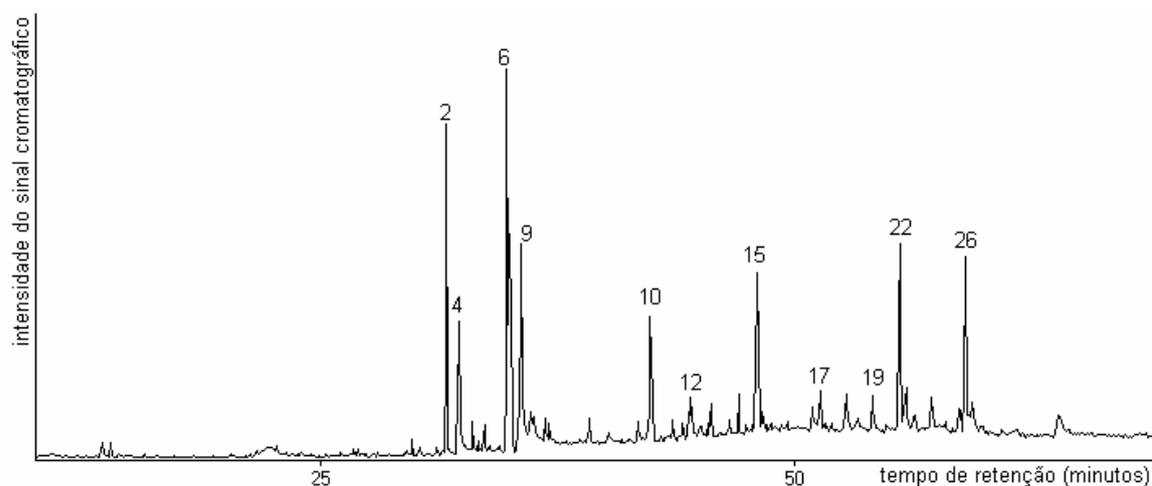


Figura 4.37: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. extraído com metanol com Soxhlet. Coluna capilar usada OV-05 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

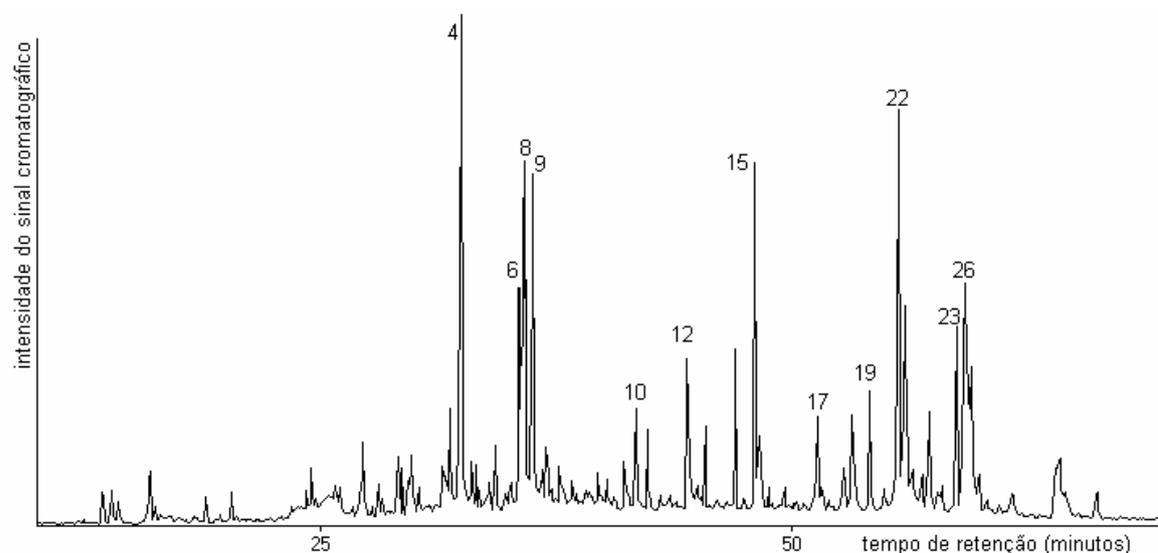


Figura 4.38: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. extraído com metanol com ultra-som. Coluna capilar usada OV-05 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

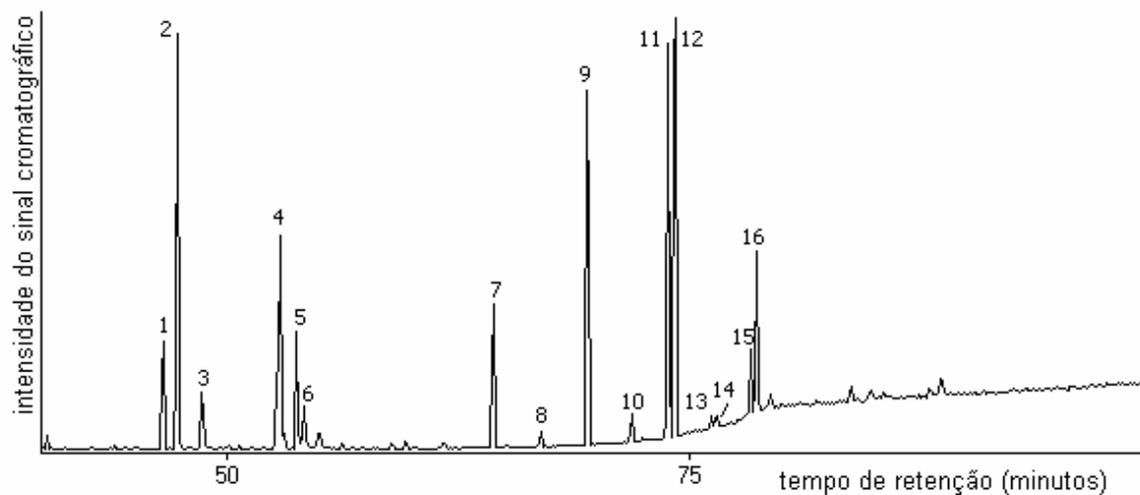


Figura 4.39: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. obtido por SFE com CO₂ (T = 200 bar; T = 40 °C) e metanol como solvente modificador. Coluna capilar usada OV-05 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

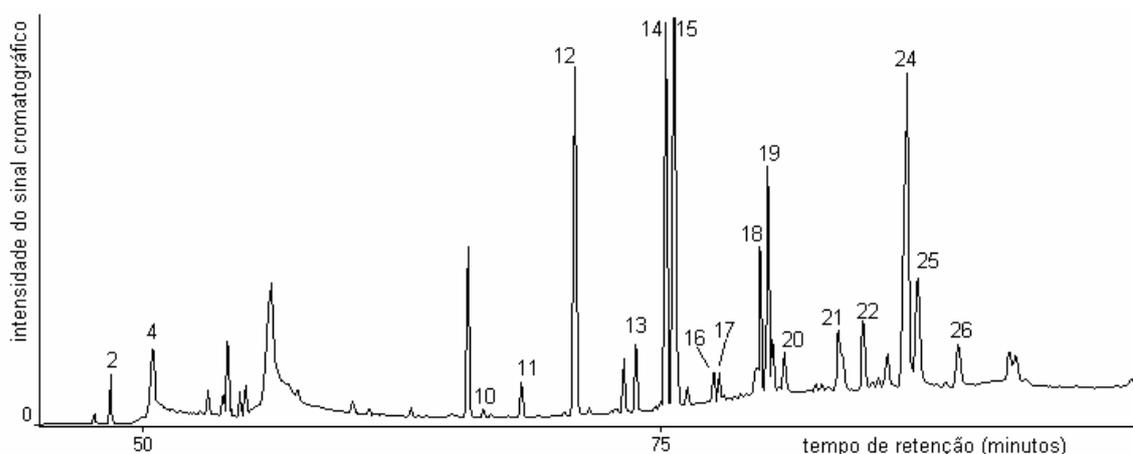


Figura 4.40: Cromatograma do íon total (TIC) para o extrato de *H. tiliaceus* L. obtido por PLE com metanol. Coluna capilar usada OV-05 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Demais condições descritas na **Tabela XVII**.

Tabela XL: Identificação dos picos assinalados nas **Figuras 4.36 a 4.40**

pico	PM	nome	fórmula
1	268	hexadecenoato de metila	$C_{17}H_{32}O_2$
2	270	hexadecanoato de metila	$C_{17}H_{34}O_2$
3	254	ác. hexadecenóico	$C_{16}H_{30}O_2$
4	256	ác. hexadecanóico	$C_{16}H_{32}O_2$
5	294	octadecadienoato de metila	$C_{19}H_{34}O_2$
6	296	octadecenoato de metila	$C_{19}H_{36}O_2$
7	298	octadecanoato de metila	$C_{19}H_{38}O_2$
8	282	ác. octadecenóico	$C_{18}H_{32}O_2$
9	284	ác. octadecanóico	$C_{18}H_{34}O_2$
10	352	pentacosano	$C_{25}H_{52}$
11	366	hexacosano	$C_{26}H_{54}$
12	380	heptacosano	$C_{27}H_{56}$
13	395	octacosano	$C_{28}H_{58}$
14	424	nonacosanol	$C_{29}H_{60}O$
15	408	nonacosano	$C_{29}H_{60}$
16	438	triacontanol	$C_{30}H_{62}O$
17	422	triacontano	$C_{30}H_{62}$
18	452	hentriacontanol	$C_{31}H_{64}O$
19	436	hentriacontano	$C_{31}H_{64}$
20	412	estigmasta-5-24(28)dien-3-ol	$C_{29}H_{48}O$
21	412	estigmasta-5-22-dien-3-ol	$C_{29}H_{48}O$
22	414	estigmasta-5-en-3-ol	$C_{29}H_{50}O$
23	430	vitamina E (α -tocoferol)	$C_{29}H_{50}O_2$
24	410	estigmasta-4-22-dien-3-ona	$C_{29}H_{46}O$
25	412	estigmasta-7-16-dien-3-ol	$C_{29}H_{48}O$
26	412	estigmasta-4-en-3-ona	$C_{29}H_{48}O$

4.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS: 4ª PARTE: ESTUDO BIOQUÍMICO DA QUALIDADE DOS EXTRATOS: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA MUTAGENICIDADE

4.4.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos: Determinação de TAR e TRAP

Para este estudo foram avaliados os extratos de ultra-som obtidos mediante extração com n-hexano, acetato de etila e metanol.

Como o objetivo da análise era a verificação da atividade antioxidante optou-se pela utilização dos parâmetros representativos do potencial total de captura de radicais livres (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR), medidos através da queda da quimiluminescência (**Qi**) e o tempo de indução (**ti**), para cada extrato obtido.

A **Tabela LI** mostra os valores para ΔQi e **ti** obtidos para os diferentes extratos comparados com os obtidos para o Trolox, empregado como substância de referência.

Como o valor de TAR representa a qualidade dos antioxidantes presentes em uma mistura, é possível afirmar-se que os extratos obtidos com n-hexano, acetato de etila e metanol apresentam características antioxidantes, com valores superiores aos do Trolox, como se observa nesta **Tabela**. Os valores obtidos para o extrato metanólico foram bastante superiores aos demais, devido, provavelmente, à presença de α -tocoferol neste extrato, sendo este composto de reconhecida ação antioxidante (vitamina E).

Tabela LI: Valores de TAR e TRAP para os extratos estudados

amostra	TAR (ΔQ_i) (*)		TRAP (t_i) seg	
	TAR	TAR/TROLOX(**)	TRAP	TRAP/TROLOX(**)
Trolox puro	10723	1,00	380	1,00
Extrato obtido com hexano	11091	1,03	480	1,26
Extrato obtido com acetato de etila	12707	1,18	2320	6,11
Extrato obtido com metanol	17319	1,62	905	2,38
Extrato obtido com metanol- água	7466	0,696	280	0,739

(*) em unidades de luminescência; (**) valores relativos ao Trolox

O potencial antioxidante foi determinado pelos parâmetros representativos de TRAP e TAR, medidos pela redução na quimiluminescência (C_i) e pelo aumento do tempo de indução (t_i). O valor de TAR e TRAP para o Trolox foi de 10723 (medido em unidades de luminescência) e 380s. Nota-se que o extrato de acetato de etila causou um aumento de 18,50 % no valor de TAR (ΔC_i) enquanto o extrato metanólico aumentou em 61,50 %. O tempo de indução para o extrato de acetato de etila ficou cerca de 6 vezes maior do que o valor encontrado para o Trolox enquanto o extrato metanólico aumento em cerca de 2,4 vezes o t_i . O extrato hexânico produziu apenas um ligeiro aumento no TAR e no TRAP, enquanto que o extrato obtido com metanol/água não apresentou características antioxidantes, com valores de TAR e TRAP inferiores ao do Trolox.

Os valores obtidos para TRAP e TAR do acetato de etila e do metanol foram superiores aos informados por Campos *et al.* (1996), Desmachelier *et al.* (1997 e 1998) para extratos de plantas consideradas como dotadas de alto poder antioxidante.

4.4.2 Estudo toxicológico: avaliação da atividade genotóxica (Ensaio de Ames)

Na avaliação da atividade genotóxica, mediante o ensaio de Ames, avaliou-se apenas o extrato metanólico de *H. tiliaceus* L. obtido por ultra-som. A **Tabela LII** apresenta os resultados em termos de números de colônias revertentes por placa e índice de mutagenicidade (IM). O IM é definido como a razão entre o número de revertentes por placa para cada dose de extrato dividido pelo valor obtido no controle negativo (somente solvente). Um dado extrato será considerado mutagênico quando o IM for superior a 2 ($IM > 2$), e tóxico, quando o IM for inferior a 0,5 ($IM < 0,5$).

Como pode-se comprovar pela **Tabela**, o extrato metanólico não apresentou efeito mutagênico em nenhuma das concentrações testadas com as linhagens TA98 e TA102, tanto na presença (+S9) quanto na ausência (-S9) de ativação metabólica.

Os testes de atividade mutagênica e toxicológica, foram realizados nos laboratórios da Biotecnologia, sob a orientação da professora Jenifer Saffi.

Tabela LII: Resultados da aplicação do Teste de AMES ao extrato metanólico por ultra-som, de *H. tiliaceus* L.

dose ($\mu\text{g/placa}$)	Linhagens de <i>S. typhimurium</i>							
	TA98 (-S9)		TA98 (+S9)		TA102 (-S9)		TA102 (+S9)	
	Rev /placa ^b	IM ^a	Rev /placa	IM	Rev /placa	IM	Rev /placa	IM
CN ^c	41,33 \pm 7,77	1,00	43,33 \pm 5,86	1,00	214,00 \pm 11,14	1,00	216,00 \pm 10,58	1,00
100	36,33 \pm 6,35	0,88	52,00 \pm 5,29	1,20	210,67 \pm 12,22	0,98	218,67 \pm 40,46	1,01
200	43,00 \pm 6,08	1,04	41,00 \pm 7,00	0,95	197,33 \pm 32,08	0,92	224,67 \pm 48,43	1,04
500	36,00 \pm 15,72	0,87	50,00 \pm 6,00	1,15	180,67 \pm 16,04	0,84	217,33 \pm 44,06	1,01
1000	45,67 \pm 8,62	1,11	51,50 \pm 9,19	1,18	202,67 \pm 42,39	0,95	197,33 \pm 8,33	0,91

^a IM = índice de mutagenicidade = n° de **His+** induzida na amostra/n° espontâneo de **His+** no controle negativo (zero).

^b Revertentes/placa = número de **His+**/placas = valores médios dos experimentos \pm DVP em triplicata.

^c CN = controle negativo (água destilada estéril)

5 CONCLUSÕES

5.1 Conclusões gerais

De forma geral e considerando que a flor de *H. tiliaceus* é uma matriz bastante complexa, os métodos desenvolvidos mostraram-se eficientes para a separação e caracterização das amostras e a composição química dos extratos mostrou-se dependente da polaridade do solvente.

5.2 Conclusões específicas

Caracterização inicial da planta:

- ⇒ Os parâmetros estudados para umidade residual e cinzas totais estão dentro do estabelecido pela Organização Mundial da Saúde;
- ⇒ A análise dos metais indicou que os mesmos se apresentam dentro dos limites estabelecidos para drogas vegetais;
- ⇒ A composição fitoquímica indicou a presença de azeites e gorduras (extrato etéreo), fenóis, taninos, flavonóides e compostos redutores (extrato alcoólico e hidro alcoólico), antocianidinas e quinonas(extrato alcoólico).

Extração por ultra-som:

- ⇒ O planejamento estatístico foi um facilitador para este estudo, sendo polaridade do solvente, tempo de extração e relação massa da droga / volume de solvente, as variáveis que mais influenciaram no processo;
- ⇒ O tempo de 140 minutos foi considerado o melhor, uma vez que a tempos superiores, o rendimento apresentava uma variação discreta, indicando possíveis transformações resultantes da quebra da molécula.

Extração com fluido supercrítico (SFE):

- ⇒ As variáveis temperatura e pressão exercem efeito pronunciado sobre a quantidade de extrato produzido. Pressões maiores levam a melhores rendimentos, uma vez que a elevação da pressão (aumento da densidade) incrementa o poder de solubilização do solvente.

Extração com líquido pressurizado (PLE):

- ⇒ O planejamento estatístico permitiu definir as variáveis mais importantes no processo;
- ⇒ Temperatura, polaridade do solvente e massa de amostra são variáveis que afetam o processo de extração;
- ⇒ A alta pressão e temperatura de 75 °C utilizados no processo favoreceram a penetração do solvente dentro da matriz, aumentando a transferência de massa, e conseqüentemente melhorando a extração;
- ⇒ A técnica de extração com líquidos pressurizados tem a vantagem de reduzir o tempo de extração, a diminuição do descarte de solventes e várias amostras podem ser extraídas ao mesmo tempo;

Comparação entre os métodos de extração:

- ⇒ A extração por SFE usando apenas CO₂ apresentou o menor rendimento em massa, porém produziu um extrato com praticamente todos os compostos identificados nas demais extrações;
- ⇒ A extração por Soxhlet apresentou os melhores rendimentos quando os solventes extratores foram n-hexano e acetato de etila;
- ⇒ A eficiência da extração utilizando a técnica de ultra-som foi maior quando o solvente utilizado foi o metanol;
- ⇒ Os rendimentos em massa de SFE foram inferiores aos do PLE, para todos os solventes usados;
- ⇒ O maior rendimento em massa foi obtido na extração por PLE, usando o metanol como solvente extrator;
- ⇒ A composição química dos extratos variou muito pouco em função da técnica de extração, sendo mais influenciada pela polaridade do solvente extrator.

Estudo analítico do extrato metanólico:

- ⇒ O fracionamento do extrato metanólico obtido por ultra-som permitiu identificar melhor os constituintes do extrato, sendo que a cromatografia líquida preparativa serviu como um “clean-up” do extrato permitindo um melhor isolamento dos compostos de interesse;

Quanto à técnica analítica utilizada:

- ⇒ A utilização do BF₃ como derivatizante, facilitou a análise cromatográfica dos ácidos presentes nos extratos, sob a forma de seus ésteres metílicos;

⇒ A cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS) mostrou-se eficiente para análise orgânica dos extratos das flores de *H. tiliaceus*, independente do método de extração, especialmente pela possibilidade de utilizar os modos SCAN e SIM na identificação e quantificação dos mesmos;

Quanto à composição química da amostra:

- ⇒ A constituição orgânica das flores de *H.tiliaceus*, apresentou hidrocarbonetos, ácidos orgânicos, álcoois, vitamina E, aldeídos e fitosteróis;
- ⇒ Quantitativamente, os compostos majoritários nos extratos foram os ácidos carboxílicos (C16 e C18), hidrocarbonetos saturados com número ímpar de carbonos (C27, C29 e C31) e fitosteróis (estigmastanol);
- ⇒ Também foram quantificados o fitol e a vitamina E, apesar de se apresentarem em menor concentração nos extratos estudados.

Quanto à atividade antioxidante e mutagênica da amostra:

- ⇒ A utilização do método por quimiluminescência, permitiu encontrar valores para TAR e TRAP superiores ao do trolox, utilizado como padrão, indicando que a amostra apresenta propriedades antioxidantes;
- ⇒ A avaliação da atividade genotóxica, do extrato metanólico obtido por ultra-som, pelo ensaio de AMES, demonstrou que o extrato não é mutagênico nem apresenta toxicidade, na bactéria *Salmnoella thyphimurium*.

6. REFERÊNCIAS

Abend, A. M.; Chung, L.; McCollum, D. G.; Wuelfing, W. P. Development and validation of an automated extraction method (accelerated solvent extraction) and a reverse-phase HPLC analysis method for assay of ivermectin in a meat-based chewable formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.31, n.6, p.1177-1183. 2003.

Abrha, Y.; Raghavan, D. Polychlorinated biphenyl (PCB) recovery from spiked organic matrix using accelerated solvent extraction (ASE) and Soxhlet extraction. **Journal of Hazardous Materials**, v.30, n.80(1-3), p.147-157. 2000.

Adams, M. K. **Analysis of Coffee: Production and Trade**. Allentown: Liquid Carbonic Industries Corporation. 1991. p.1-30.

Adrian, T.; Maurer, G. Solubility of carbon dioxide in acetone and propionic acid at temperatures between 298 K and 333 K. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.42. n.2, p.668-672, 1997.

Ahmed, F.E. Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.3, p.170-185. 2003.

Ali S.; Singh, P.; Thomsom, R. H. Naturally occurring quinones. 28. Sesquiterpenoid quinones and related compounds from *Hibiscus tiliaceus*. **Journal of Chemical Society Perk T**, v.1, n.1, p.257-259. 1980.

Allada, S. R. Solubility parameters of supercritical fluids. **Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development**, v.23, n.2, p.344-348. 1984.

Alonso-Salces, R. M.; Korta, E.; Barranco, A.; Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F. Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. **Journal of Chromatography A**, v.933, n.1-2, p.37-43. 2001.

Alzaga, R.; Pascual, E.; Erra, P.; Bayona, J. M. Development of a novel supercritical fluid extraction procedure for lanolin extraction from raw wool. **Analytica Chimica Acta**, v.381, n.1, p.39-48. 1999.

Alzaga, R.; Maldonado, C.; Bayona, J. M. Intercomparison among SFE, ASE, Soxhlet, and sonication for the trialkylamine determination in sediment and sludge. **Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.72, n.2, p.99-111. 1998.

Ambrosio, P.; Galvano, F.; Fogliano, V.; Logrieco, A.; Fresa, R.; Ritiieni, A. Supercritical fluid extraction of beauvericin from maize. **Talanta**, v.62, n.3, p.523-530. 2004.

Anklam, E.; Muller, A. Extractions of caffeine and vanillin from drugs by supercritical carbon dioxide. **Pharmazie**, Berlin, v.50, p.364-365. 1995.

Aruoma, O. I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. **Methods in Enzimology**, v.233, p.57-66. 1994.

Aruoma, O. I.; Murci, A.; Butler, J.; Halliwell, B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and antioxidant action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, n.11, p.1880-1885. 1993.

Auroma, O. I. Extracts as antioxidant prophylactic agents. **Information**, v.8, n.12, p.1236-1241. 1997.

Auroma, O. I.; Spencer, J.; Rossi, R.; Aeschbach, R.; Khan, A.; Mahmood, N. Muñoz, A.; Murcia, A.; Butler, J.; Halliwell, B. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of Rosemary and Provençal herbs. **Food Chemistry and Toxicology**, v.34, n.5, p.449-456. 1996.

Ashrat-Khorassani, M.; Kumar, M. L.; Koebler, D. J.; Williams, G. P. Evaluation of coupled supercritical (SFE-CC-SFC) for quantitative and qualitative analysis. **Journal of Chromatographic Science**, v.28, p.599-604. 1990.

Ashrat-Khorassani, M.; Levy, J. Quantitative analysis of polymer additives in low density polyethylene using supercritical fluid extraction/supercritical fluid chromatography. **Journal High Resolution Chromatography**, v.13, p.742-747. 1990.

Bagchi, D. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. **Molecular Pathology and Pharmacology**, v.95, n.2, p.179-189. 1997.

Baldwin, M. A. Modern mass spectrometry in bioorganic analysis. **Natural Products Reports**, p.33-44. 1995.

Barboza, Y. C. B.; Serra A. A. Ultra-som (I): Influência do Ultra-som na Química. **Química Nova**, v.15, n.4, p.302-316. 1992.

Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Ed. UNICAMP: Campinas, 2001. 299p.

Bell, A. A.; Stipanovic, R. D.; O'Brien, D. H.; Fryxell, P. A. Sesquiterpenoid Aldehyde quinines and derivatives in pigment glands of gossypium. **Phytochemistry**, v.17, n.8, p.1297. 1978.

Benthin, B.; Danz, H.; Hamburguer, M. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v.837, n.1-2, p.211-219. 1999.

Berlan, J.; Timothy, J. M. Sonochemistry: from research laboratories to industrial plants. 1992. **Ultrasonic**, v.30, n.4, p.203-212. 1992.

Berna, A.; Tárrega, A.; Blasco, M.; Subirats, S. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of height of the bed. **Journal of Supercritical Fluids**, v.18, n.3, p.227-237. 2000.

Berset, J. D.; Ejem, M.; Holzer, R.; Lischer, P. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. **Analytica Chimica Acta**, v.383, n.3, p.263-275. 1999.

Bertsch, W.; Jennings W. G.; Kaiser, R. **Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography**, Vol I. Edited by P. Sandra: Belgium State University of Ghent, 1985. 265p.

Bjorklund, E.; Jaremo, M.; Mathiasson, L.; Karlsson, L.; Strode, J. T.; Eriksson, J.; Torstensson, A. Determination of felodipine in tablets using accelerated solvent extraction. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technology**, v.21, n.4, p.535-549. 1998.

Björklund, E.; Bøwardt, S.; Nilsson, T.; Mathiasson, L. Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v.836, n.2, p.285-293. 1999.

Björklund, E.; Bøwardt, S.; Nilsson, T. Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.19, n.7, p.434-445. 2000.

Björklund, E.; von Holst, C.; Anklam, E. Fast extraction clean-up and detection methods for the rapid analysis and screening of seven indicator PCBs in food matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v.21, n.1, p.39-52. 2002.

Blanco, C. G.; Prado, J. G.; Guillén, M. D.; Borrego, A. G. Preliminary results of extraction in an oil shale. **Organical Geochemistry**, v.18, n.3, p.313-316. 1992.

Blumenthal, M.; Brusse, W. R.; Goldberg, A. The complete German Commission E. Monographs Therapeutic Guide to Herbal Medicines. **The American Botanical Council**, Austin, TX, USA. 1998

- Bombardelli, E. Technologies for the Processing of Medicinal Plants, in: Wijesekera, R.O.B., **The Medicinal Plant Industry**, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1991.
- Bott, T. R. Supercritical gas extraction. **Chemistry and Industry**, March, p.228-232. 1980.
- Box, G. E. P.; Whunter, J. S. **Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. New York, Wiley. 1978.
- Bremner, J. M.; Mulvaney, C. S. Nitrogen total. In: **Methods of Soil Analysis**, Part 2, 2nd Ed., Agronomy series n° 9, Madison, Wisc.: ASA, 1982. p.595-624.
- Brennecke, J. F.; Tomasko, D. L. ; Peshkin, J. ; Eckert, C. A. Fluorescence spectroscopy studies of dilute supercritical solutions. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.29, n.4, p.1682-1690. 1990.
- Brignolo, E. A. Supercritical fluid extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v.29, p. 133-144. 1986.
- Brito, A. R. M. S.; Nunes, D. S. Ethno pharmacology and sustainable development of new plant derives drugs. **Ciencia y Cultura**, v.49, n.5/6, p.402-408. 1997.
- Brondegaard, V. J. Contraceptive plant drugs. **Planta Medica**, v.23, p.167-172. 1973.
- Brunner, G.; Johannsen, M.; Birtigh, A.; Narendran, N. Supercritical fluid extraction of oil-palm components. **Journal of Supercritical Fluids**, v.8, n.1, p.46-50. 1995.
- Butala, S. J. M.; Medina, J. C.; Hulse, R. J.; Bartholomew, Lee, M. L. Pressurized fluid extraction of coal. **Fuel**, v.79, n.13, p.1657-1664. 2000.
- Campos, A. M.; Escobar, J.; Lissi, E. A. The Total Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.7, n.1, p.43-49. 1996.

Cão, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and pro oxidant behavior of flavonoid: Structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**. v.22, n.5, p.749-760. 1997.

Capriel, P.; Haisch, A.; Khan, S. U. Supercritical Methanol: an efficacious technique for the extraction of bound pesticide residues from soil and plant sample. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v.34, n.1, p.70-73. 1986.

Caramão, E. B. **Caracterização Química de Alcatrão de Carvão Brasileiro**. 1991. 162 p .Tese (Doutorado), IFQSC-USP.

Challem, J. The power of Flavonoid Antioxidant Nutrients in Fruits, Vegetables and Herbs. **The Nutrition Report**, p.1-3. 1998.

Chaudot, X.; Tambuté, A.; Caude, M. Simultaneous extraction and derivatization of 2-chlorovinylarsonous acid from soils using supercritical and pressurized fluids. **Journal of Chromatography A**, v.888, n.1-2, p.327-333. 2000.

Chaudot, X.; Tambuté, A.; Caude, M. Selective extraction of hydrocarbons, phosphonates and phosphonic acids from soils by successive supercritical fluid and pressurized liquid extractions. **Journal of Chromatography A**, v.866, n.2, p.231-240. 2000.

Chen, G. S.; Schramm, K. W.; Henkelmann, B.; Xu, Y.; Zhang, Y. Y.; Wotten, T.; Kettrup, A. Comparative evaluation of Soxhlet and accelerated solvent extraction (ASE) in the determination of PCDD/F in sediment. **Organohalogen Compounds**, v.31, p.114-118. 1997.

Chen, F. C.; Lin, Y. M.; Chen, A. H. Sesquiterpenes from heartwood of Chinese ELM. **Phytochemistry**, v.11, n.3, p.1190. 1972.

Chen R. T.; Fang, S. D. On the chemical constituents of Cotton rose *Hibiscus (Hibiscus mutabilis)*. **Chinese Traditional and Herbal Drug**, v. 24, n. 5, p. 227-229. 1993.

Chiu, K. L.; Cheng, Y. C.; Chen, J. H.; Chang, C. J.; Yang, P. W. Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids. **Journal of Supercritical Fluids**, v.24, n.1, p.77- 87. 2002.

Choi, M. P. K.; Chan, K. K. C.; Leung, H. W.; Huie, C. W. Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. **Journal of Chromatography A**, v.983, n.1-2, p.153-162. 2003.

Chrastill, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. **Journal of Physical Chemistry**, v.86, n.15, p.3016-3021. 1982.

Cochran, H. D.; Lee, L. L. Solvation structure in supercritical fluid mixtures based on molecular distribution functions. **American Chemical Society Symposium Series**, v. 406, p. 27. 1989.

Coelho, L. A. F.; Oliveira, J. V.; d'Ávila, S. G.; Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M. SFE of rosemary oil: assessment of influence of process variables and extraction characterization. **Journal of High Resolution Chromatography**, v.20, n.8, p.431-436. 1997.

Connors, T. A.; Nigam, S. N.; McBrien, D. C. H.; Slater, T. F. Eicosanoids, Lipid Peroxidation and Cancer. **Springer Verlag**, Berlin, 1989, p.143.

Conte, E.; Milani, R.; Morali, G.; Abballe, F. Comparison between accelerated solvent extraction and traditional extraction methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil. **Journal of Chromatography A**, v.765, n.1, p.121-125. 1997.

Cook, Y.; Hewett, C. L.; Hieger, I. Isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. I. Concentration as the active substance. 1933. *Journal of Chromatographic Science*. 1933, p.395-396; Idem II. Isolation of 1,2 and 4,5 benzopyrenes, perylene and 1,2-benzanthracene, J. C. S. 1933, p.296-398; idem III. Synthesis of 1,2 and 4,5 benzopyrenes **Journal of Chromatographic Science**, p.398-405.

Cordell, G. A. Champing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v.40, n.6, p.1585-1612. 1995.

Correa, P. M. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, V III. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984, p.581-584.

Costa, V.; Ferreira, P. M. Oxidative stress and signal transductions in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, p.217-246. 2001.

Cygnarowicz-Provost, M.; O'Brien, D. J.; Maxwell, R. J.; Hampson, J. W. Supercritical Fluid Extraction of fungal lipids using mixed solvents: experiment and modeling. **Journal of Supercritical Fluids**, v.5, p. 24-30. 1992.

Da Costa, Cristina T.; Margolis, Sam A.; Benner, Bruce A. Jr.; Horton, Derek. Comparison of methods for extraction of flavanones and xanthenes from the root bark of the osage orange tree using liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**,v.831, p.167-178. 1999.

Da Luz, L. **Estudo do Ultra-Som Como Técnica de Extração de Carvões e Caracterização dos Hidrocarbonetos Poliaromáticos**. IQ-UFRGS, 1998. Dissertação de Mestrado.

Davies, I. L.; Raynor, M. W.; Kithnji J. P.; Bartle, K. D.; William, S. P.; Andrews, G. E. LC/SPE/GC/SFC: Interfacing. **Analytical Chemistry**, v.60, n.11, p.683A. 1988.

Davies, L. **Efficiency in Research, Development and Production: the Statistical Design and Analysis of Chemical Experiments**. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 1993.

Dean, J. R.; Santamaria-Rekondo, A.; Ludkin, E. Accelerated solvent extraction of phenols from soil. **Analytical Communications**, v.33, n.12, p.413-416. 1996.

- Debenedetti, P. G.; Kumar, S. K. The molecular basis of temperature effects in supercritical extraction. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v.34, n.4, p.645-657. 1988.
- De-Eknamkul, W.; Potduang, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v.62, p.389-398. 2003.
- Degnan, A. J.; von Elbe, J. H.; Hartel, R. W. Extraction of annatto seed pigment by supercritical carbon dioxide. **Journal Food Science**, v.56, n.6, p.1655-1659. 1991.
- Derome, A. E. The use of NMR Spectroscopy in the Structure Determinations of Natural Products: Two Dimensional Methods. **Natural Products Reports**, v.6, p.111-141. 1989.
- Desmarchelier, C.; Coussio, J.; Ciccía, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC ("marcela"); **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.9, p.1163-1170. 1998.
- Desmarchelier, C.; Repetto, M.; Coussio, J.; Lleusy, L.; Ciccía, G. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **Internatíonal Journal of Pharmacognosy**, v.35, n.4, p.288-296. 1997.
- Di Stasi, L. C.; Costa, M.; Mendacolli, S. L. J.; Kirizawa, M.; Gomes, C.; Trolin, G. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.24, p.205-211. 1988.
- Dohadwalla, A. N. Natural product pharmacology strategies in search of leads for new drug designs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.6, n.2, p.49-53. 1985.
- Domínguez, X. A. **Métodos de Investigación Fitoquímica**. México: Editorial Limusa Wiley, 1973. 280 p.

- Draisci, R.; Marchiafava, C.; Ferretti, E.; Palleschi, L.; Catellani, G.; Anastásio, A. Evaluation of musk contamination of fresh water fish in Italy by accelerated solvent extraxtion and gas chromatography with mass spectroscopy detection. **Journal of Chromatography A**, v.814, n.1-2, p.187-297. 1998.
- Eclwert, C. A.; Ziger, D. H.; Johnston, K. P.; Kim, S. Solute partial molal volumes in supercritical fluids. **Journal of Chemical Physics**, v.90, p.2738. 1986.
- Eckoldt, J.; Bushmann, R.; Wauschkuhn, C. Methods for determination of the total fat content in meat and sausage in comparison. **Lebensmittelchimie**, v.53, n.5, p.120. 1999.
- Eiceman, V. K.; Viau, A. C.; Karasek, F. W. Ultrasonic Extraction of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and other Organic Compounds from Fly Ash from Municipal Incinerators. **Analytical Chemistry**, v.59, n.2, p.42. 1980.
- Ekart, M. P.; Bennett, K. L.; Ekart, S. M.; Gurdial, G. S.; Liotta, C. L.; Eckert, C. A. Cosolvent interations in supercritical fluid solutions. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v.39, n.2, p.235-248. 1993.
- Elizabetsky, E.; Campos, L. C. Medicinal plant resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **The Journal of Ethnopharmacology**, v.51, n.1-3, p.111-120. 1996.
- Ertugrul, S.; Aeskihazi, O.; Akman, U.; Hortacsu, O. The 4Th International Symposium on Supercritical Fluids, Japan. Distributions of organum-oil components in oil and sub/supercritical carbon dioxide. p.417-420. 1997.
- Ezzell, J. Theuse of SW-846 method 3545 for automated extraction of environmental samples. **American Environmental Laboratory**, v.10, n.2, p. 24-25. 1998.
- Facino, R. M. Procyanides from *Vitis vinifera* seeds protect rabbit heart from ischemia/reperfusion injury: antioxidant intervention and/or Koper sequestrering ability. **Planta Medica**, v.62, n.6, p.495-502. 1996.

Farmacopéia Brasileira, **Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Parte I — Métodos Gerais**. IV Edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1996.

Ferreira, S. R. S. **Extração com Dióxido de Carbono Líquido Subcrítico de Óleo Essencial de Pimenta-do-Reino**. 1991. 191p. Dissertação (Mestrado) Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Ferreira, D. T.; Álvares, P. S. M.; Houghton, P. J.; Brás-Filho, R. Constituintes químicos importantes das raízes de *Pyrostegia venusa* e considerações sobre sua importância medicinal. **Química Nova**, v.23, n.1, p.42-46. 2000.

Ferreira, S. R. S.; Ângela, M.; Meireles, A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v.54, n.4, p.253-269. 2002.

Fifield, F. W.; Haines, P. J. **Environmental Analytical Chemistry**. London; Blackie Academic & Professional, 1995. 424p.

Fischer, N. H.; Vargas, D.; Menelaou, M. NMR Methods in Phytochemical Studies, In: **Modern Phytochemical Methods**, New York: Plenum Press, 1991. 578 p.

Fisher, J.; Scarlett, M. J.; Stott, A. D. Accelerated solvent extraction: an evaluation for screening of soils for selected U.S. EPA semivolatiles organic priority pollutants. **Environmental Science and Technology**, v.31, n.4, p.1120-1227. 1997.

Flotron, V.; Houessou, J.; Bosio, A.; Delteil, C.; Bermond, A.; Camel, V. Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using microwave-assisted solvent extraction — comparison with other extraction methods. **Journal of Chromatography A**, v.999, n.1-2, p.175-184. 2003.

Fontana, J. D.; Lanças, F. M.; Passos, M.; Cappelaro, E.; Vilegas, J.; Baron, M.; Nosedá, M.; Pomílio, A. B.; Vitale, A.; Webber, A. C.; Maul, A. A.; Peres, W. A.; Foerster, L. A. Selective polarity — and adsorption — guide extraction/purification of *Annona* sp. Polar ecetogenius and biological assay against agricultural pest. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.70, n.72, p.67-76. 1998.

Fotsis, T. Flavonoid, dietary-derivable inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Cancer Research**, v.57, n.14, p.2916-2921. 1997.

Gan, J.; Papiernik, S. K.; Koskinen, W. C.; Yates, S. R. Evaluation of accelerated solvent extraction (ASE) for analysis of pesticide residues in soil. **Environmental Science Technology**, v.33, n.18, p.3249-3253. 1999.

Gawdzik, J.; Bolibok, M. Accelerated solvent extraction (ASE) as a method of sample preparation for analysis of bitter a- acids in hops and hop pellets. **Przemylski. Ferment. Owocowo-Warzywny**, v.43, n.4, p.14-15. 1999.

Giergielewicz-Mozajska, H.; Da Browiski, L.; Namiesnik, J. Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples — some aspects of theory and practice. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.149-165. 2001.

Gonçalves, M.; Vasconcelos, A. M. P.; Azevedo, E. J. S. G.; Neves, H. J. C. Ponte. On the application of supercritical fluid extraction to the deacidification of olive oils. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.68, n.7, p.474-480, 1991.

Gopalakrishanan, N.; Narayman, C. S. Supercritical carbon dioxide extraction of cardamom. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.1976-1978. 1991.

Gottlieb, O.; Kaplan, M. A. C.; Borin, M. R. M. B. **Biodiversidade: Um Enfoque Químico-biológico**. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1996, 267p.

Grayson, M. A. The mass spectrometer as a detector for gas chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v.24, n.12, p.529. 1986.

Gros, E. G.; Polilio, B.; Seldes, A. M.; Burton, G. **Introducción al Estudio de los Productos Naturales**. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico Washington, D.C. 1985, 145 p.

Gunter, H. NMR spectroscopy. **Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry**. Second edition. John Wiley & Sons, 432. 1995.

Halliwel, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50. 1996.

Hannay, J.B.; Hogarth, J. On the Solubility of Solids in Gases, **The Royal Society Publishing**, London. v.29, p.324. 1879.

Hauck, M.; Hoefler, F.; Schultz, W. Fast elution by accelerated solvent extraction (ASE) in comparison with German standard DIN methods. **Labor Praxis**, v.22, n.6, p.44-47. 1998.

Hauffe, D.; Hofler, F.; Knowles, D. E.; Clark, J.; Ezzel, J. L.; Richter, B. The application of accelerated solvent extraction (ASE) to food samples. **Proceedings of the European Conference of Food Chemistry**, v.8, n.3, p. 766- 767. 1995.

Hawthorne, S. B.; Krieger, M. S.; Miller, D. J. Analysis of flavor and fragrance compounds using supercritical fluid extraction coupled with gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v.60, p.472-477. 1998.

Hawthorne, S. B.; Miller, D. J.; Galy, A. B.; Schmitt, V. O. Effect of SFE flow rate on extraction rates: classifying sample extraction behavior. **Analytical Chemistry**, v.67, p.2723-2732. 1995.

Hawthorne, B.; Riekkola, M-L.; Serenius, K.; Holm, Y.; Hiltunen, R.; Hartonen, K. Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. **Journal of Chromatography A**, v.634, p.297-308. 1993.

Hawthorne, S. B.; Grabanski, C. B.; Martin, E.; Miller, D. J. Comparison of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**, v.892, p.421-433. 2000.

Heemken, O. P.; Theobald, N.; Wenclawiak, B. W. Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. **Analytical Chemistry**, v.69, n.11, p.2171-2180. 1997.

Herman, A. S. **Biomedical Applications of Gas Chromatography**. New York: Plenum Press, 1964.

Hertog, M. G. L. Antioxidants flavonols and coronary heart disease risk. **Lancet**, n. 9053, p.649-699. 1997.

Hierro, M. T. G.; Santa-Maria, G. Extracción com fluidos supercríticos. Aplicación a los alimentos. **Cromatografía y Tecnicas Afines**, v.12, p.62-68. 1991.

Hirata, Y.; Tanaka, M.; Inomata, K. Purged splitless injection in microcolumn supercritical fluid chromatography, **Journal of Chromatographic Science**, v.27, n.7, p.395-398. 1989.

Holdworth, D.; Balun, L. Medicinal plant of the east and west sepik provinces, Papua, New Guinea. **Journal Pharmacology**, v.30, n.3, p.218-222. 1992.

Holdworth, D.; Wamoi, B. Medicinal plants of the Admiralty Island, Papua New Guinea, Part. I. **Journal of Crude Drug Research**, v.20, n.4, p.169-181. 1982.

Holdworth, D. Traditional medicinal plants of Rarotonga, Cook Island. Part. II. **Journal of Pharmacology**, v.29, n.1, p.71-79. 1991.

Hooijerink, H.; van Bennekom, E. O.; Nielen, M. W. F. Screening for gestagens in kidney fat using accelerated solvent extraction and liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry . **Analytical Chimica Acta**, v.483, n.1-2-51-59, p.1-9. 2002.

Hofler, F. Use of accelerated solvent extraction in environmental analysis. **LaborPraxis**, v.20, n.12, p.44-56. 1996.

Hostettmann, K.; Hostettmann, M.; Marston, A. **Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Products Isolation**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. 154p.

Hromádková, Z.; Ebringerová, A. Ultrasonic extraction of plant materials — investigation release from buckwheat hulls. **Ultrasonics and Sonochemistry**, v.10, n.3, p.127-133. 2003.

Hubert, P.; Vitzthum, O. G. Fluid extraction of hops, spices, and tobacco with supercritical gases. **Angewandte Chemie International Edition England**, v.17, p.710-715. 1978.

Huisman, R.; van Kamp, H. V.; Weyland, J. W.; Doornbos, D. A.; Bolhuis, G. K.; Lerk, C. F. Development and optimization of pharmaceutical formulations using a simplex lattice design. **Pharmaceutish Weekblad**, Scientific Edition, v.6, n.5, p.185-194. 1984.

Jankun, J. Why drinking green tea could prevent cancer. **Nature**, p.387-561. 1997.

Jaroszewski, J. W.; Thorbjorn, S-H.; Hanssen, S. H.; Thastrup, O.; Kofod, H. On the Botanical Distribution of Chiral Forms of Gossypol. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.58, p.389-484, October. 1992.

Jensen, D.; Hofler, F.; Ezzell, J.; Richter, B. Rapid preparation of environmental samples by accelerated solvent extraction (ASE). **Polycyclic Aromatic Compounds**, v.9, n.1-4, p.233-240. 1996.

Johnston, K. P.; Penninger, J. M. L. *Supercritical Fluid Science and Technology*, **American Institute of Chemical Engineers Meeting**, Washington D.C. 1988.

Kahl, R. Protective and adverse biological actions of phenolic antioxidants. In SIES, H.; **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants**. London: Academic Press, 1991, p.245-273.

Kajimoto, O.; Futakami, M.; Kobayashi, T.; Yamasaki, K. Charge-transfer-state formation in supercritical fluids (N,N-dimethylamino)benzotrile in CF₃H. **Journal of Chemical Physics**, v.92, n.5, p.1347. 1988.

Kakimoto, S.; Obana, H.; Okihashi, M.; Hori, S. Rapid analysis of fungicides in agricultural products and processed foods by applying an accelerated solvent extraction system. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v.38, n.5, p.358-362. 1997.

Kajiyama, T.; Ohkatsu, Y. Effect of para-sustituyentes of phenolic antioxidants. **Polymer Degradation and Stability**, v.71, n.3, p.445-452. 2001.

Karleski, D. L.; Rollie, M. E.; Warner, I. M. Sample Cleanup Procedure for Nuclear Aromatic Compounds in Comdex Matrices, **Analytical Chemistry**, v.58, p.1187. 1986.

Kerrola, K. Literature review: isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide. **Food Reviews International**, New York, v.11, n.4, p.547-573. 1995.

Kholkute, S.D.; Mudgal, V.; Udupa, K. N. Studies on the ant fertility potentiality of Hibiscus rosa sinensis. **Planta Medica**, v.31, n.2, p.35-39. 1977.

Kikuchi, Y.; Kawamura, F.; Ohira, T.; Yatagai, M. Accelerated solvent extraction of taxanes compounds from *Taxus cuspidata*. **Mokuzai Gakkaishi**, v.43, n.11, p.971-974. 1997.

King, J. W.; List, G. R. Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry. Champaign: **Journal of American Oil Chemistry Society**, p.435. 1996.

Kinsella, J. D.; Frankel, E.; German, B.; Kanner, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and foods. **Food Technology**, v.47, n.4, p.85-93. 1993.

Kirk-Ohmer. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 3rd ed., New York: John Wiley & Sons, Incorporation. v.23, p.469-490. 1981.

Knowles, D. E.; Richter, B. E.; Wygant, M. B.; Nixon, L.; Andersen, M. R. Supercritical fluid chromatography: a new technique for Association of Official *Analytical Chemistry* (AOAC). **Journal Association of Analytical Chemistry**, v.71, n.3, p.451-457. 1988.

Kobayashi, J. Early Hawaiian uses of medicinal plants in pregnancy and childbirth. **Journal of Tropical Pediatrics Environmental Child Health**, v.22, p.260-260. 1976.

Koh, T. S.; Ultrasonic preparation of fat-free biological-materials for elemental analysis, **Analytical Chemistry**, v.55, n.11, p.1814-1815. 1983

Köse, A. O.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö. Fractionation of origanum oil (*Origanum munitiflorum*). In: A continuous column by dense carbon dioxide. 1998. **Proceedings of the 5th Meeting on Supercritical Fluids – Materials and Natural Products Processing**, Tome 2, p.437-443.

Kubat, H.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö. Semi-batch packed - column deterpenation of origanum oil by dense carbon dioxide. **Chemical Engineering and Processing**, v.40, n.1, p.19-32. 2001.

Krukonis, V. J. Supercritical fluid processing of fish oil: extraction of polychlorinated biphenyls. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.66, n.6, p.818-821.1989.

Lanças, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta. 254 p.1993

Lanças, F. M.; Rissato, S. R.; Galhiane, M. S. Off-line SFE-CZE analysis of carbamates residues in tobacco samples. **Chromatographia**, v.42, n.5/6, p.323-328. 1996.

Lanças, F. M.; Galhiane, M. S.; Rissato, S. R. Supercritical Fluid Extraction of Flumetralin from Tobacco Samples. In: Willians, J.; Clifford, P. (Ed.); **Supercritical Fluid Methods and Protocols**. London: Humana Press. p.1375-1381. 2000.

Lang, Q.; Wai, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. **Talanta**, v.53, n.4, p.771-782. 2001.

Lasztity, R. Oatgrain — a wonderful reservoir of natural nutrients and biologically active substances. **Food Reviews International**, v.14, n.1, p.99-119. 1998.

Lee, F. S. C.; Pierson, W. P.; Ezike, J. The problem of PAH degradation during filter collection of airborne particulates — an evaluation of several commonly used filter medium. In: Bjorseth, A.; Dennis, A. J. (ed): **Polynuclear Aromatic Hydrocarbons**. Columbus, Ohio: Batelle Press, 1980, p. 543-563.

Lee, H.; Chung, B. H.; Park, Y. H. Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical carbon dioxide. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.68, n.8, p. 571-573. 1991.

Lemert, R. M.; Johnston, K. P.; Chemical Complexing Agents for Enhanced Solubilities in Supercritical Fluid Carbon Dioxide. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.30, p.1222. 1991.

Li, S.; Hartland, S. A new industrial process for extracting cocoa butter and xanthines with supercritical carbon dioxide. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.73, n.4, p.423-429. 1996.

Li, Y.; Michels, R.; Mansuy, L.; Fleck, S.; Faure, P. Comparison of pressurized liquid extraction with classical solvent extraction and microwave- assisted extraction – application to the investigation of the artificial maturation of Mahakam coal. **Fuel**, v. 81, n.6, p. 747- 756. 2002.

Linden, R. **Desenho Estatístico de Experimentos e Análise de Superfície de Respostas Aplicadas ao Desenvolvimento de Formas Farmacêuticas Sólidas Derivadas da *Paciflora edulis***. UFRGS. 1998. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Lim, S.; Hartland, S. A new industrial process for extracting cocoa butter and xanthines with supercritical carbon dioxide. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v.73, p.423-429. 1996.

Linskens, H. F.; Jakson, J. F. (Ed.) **Modern Methods of Plant Analysis**: Springer-Verlag, 1987. High performance liquid chromatography in plant sciences. New York, London, Paris, Tokyo: n.5 248 S., 74 Abb., 23 Tab.

Lissi, E. A.; Faure, M.; Clavero, N. Effect of additives on the inactivation of lysozyme mediated by free radicals produced in the thermolysis of lysozyme mediated by free radicals produced in the thermolysis of 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane). **Free Radical Research Communications**, v.14, n.5-6, p.373-384. 1991.

Lissi, E. A.; Modak, B.; Escobar, J.; Urzua, A. Total antioxidant potential of resinous from *Heliotropium* species, and a comparison of the ABTS and DPPH methods. **Free Radical Research Communications**, v.30, n.6, p.471-477. 1999.

Lissi, E. A.; Pascual, C.; Castillo, M. D. Luminol Luminescence induced by 2,2-azo-bis(2-amidinopropane) Thermolysis. **Free Radical Research Communications**, v.17, n.5, p.299-311. 1992.

Lissi, E. A.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Castillo, M. D. Evaluation of Total Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity from Luminol-Enhanced Chemiluminescence's Measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, n.2, p.153-158. 1995.

List, P. H.; Schmidt, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. Boca Raton: CRC, 1989. 374 p.

Lock de Ugaz, O. **Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales**. Pontificia Universidad Católica del Perú: Fondo Editorial, 1994, 290p.

Lopez-Avila, V. Sample preparation for Environmental Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.29, n.3, p.195-230. 1999.

Lopes, W. A.; Andrade, J. B. Sources, formation, reactivity and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in atmosphere. **Química Nova**, v.19, n.5, p.497. 1996.

López Planes, R. **Diseño Estadístico de Experimentos**. Mérida Yucatán, México: Coedición de la Universidad Autónoma de Yucatán y la Universidad de la Habana, 1994. p.25-75.

Lou, X.; Janssen, H-G.; Cramers, C. A. Parameters affecting the accelerated solvent extraction of polymeric samples. **Analytical Chemistry**, v.69, n.8, p.1598-1603. 1997.

Lowry, J. B. Floral anthocyanins of some Malaysian *Hibiscus* species. **Phytochemistry**, v.15, n.4, p.1395-1396. 1976.

Luche, J. L.; Dupuy, C.; Einhorn, J.; Einhorn, C.; Pétrier, C.; Barboza, J. C. S. Ultrasonic. **Ultrasonic**, v.25, p.40. 1987.

Luque-García, J. L.; Luque de Castro, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.1, p.41-47. 2003.

Mann, D. Grape juice and beer may prevent heart disease. **Medical Tribune News Service**, v.18, march. 1997.

Marcano, D.; Hasegawa, M. **Fitoquímica Orgânica**. Universidad Central de Venezuela. Consejo de desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, 1991. p.17-38.

Maron, D. M.; Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, n.3-4, p.173-215. 1983.

Marques, L.C.; Petrovick, P.R. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3.ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2001. Cap.14, p.261-299.

Marvin, C. H.; Allan, L.; Mccarry, B. E. A comparison of Ultrasonic Extraction and Soxhlet Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from sediments and Air Particulate Material. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.49, n.4, p.221-230. 1992.

Maul, A. A. **Extração de Insumos Farmacêuticos por Fluido Supercrítico**.1998. 142p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

Maul, A. A.; Wasichy, R.; Bacchi, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo, v.5, n.2, p.185-200. 1996.

McCant, D.D.; Inouye, L.S.; Mcfarland, V. A. A one-step ASE extraction method for TCCD TEQ determination. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.63, n.3, p.282-288. 1999.

McNally, M. E. P. Method development in supercritical fluid extraction. **Journal of the American Association of Oficial Analytical Chemists International**, Washington, 79, p. n.2, 380-387. 1996.

McKiernan, J. W.; Creed, J.T.; Brockhoff, C.A.; Caruso, J. A.; Lorenzana, R. M. A comparison of automated and traditional methods for the extraction of arsenicals from fish. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.14, n.4, p.607-613. 1999.

Metcalfe, L. D.; Schimitz, A. A. The rapid preparation of fatty acid esters for gas analysis. **Analytical Chemistry**, v.33, n.3, p.363-364. 1961.

Metcalfe, L. D.; Schimitz, A. A.; Pelka, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v.38, n.3, p.514-515. 1966.

Metsa-Ketelä, T.; Stanley, P. E.; Kricka, L. J. Luminescence assay for total peroxy radical trapping capability of plasma. In: Bioluminescence and Chemiluminescence's. **Current Status**, p. 389, 1991.

Michael, J. P. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. 2.ed. Makron Books do Brasil, S.Paulo.1996. 524p.

Miège, C.; Dugay, J.; Hennion, M. C. Optimization, validation and comparison of various extraction techniques for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.995, n.1-2, p.87-97. 2003.

Miguel, A.; Andrade, J. B. Rapid quantification of ten polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.35, p.35-41. 1989.

Miguel, A. H. Atmospheric reactivity of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with aged urban aerosols. In: COOKE, M; DENNIS, A. J. (Eds). **Polynuclear Aromatic Hydrocarbons**. Columbus, Ohio: Battelle Press, 1983. p. 897-904.

- Miller, J. M. **Separation Methods in Chemical Analysis**. Ed. John Wiley & Sons, 1975. p.303.
- Miller, J. C.; Miller, J. N. **Estadística para Química Analítica**. Segunda Edición, 1993. 209 p.
- Miranda, M.; Cuellar, A. **Farmacognosia y Productos Naturales**. Primeira Edición. La Habana – Cuba. Editorial Félix Varela, 2001, 60p.
- Miranda, M.; Cuellar, A. **Folleto de Prácticas de Farmacognosia y Productos Naturales**. La Habana – Cuba. Editorial UH, 2001b, p.90-91.
- Moyler, D. A.; Browning, R. M.; Stephens, M. A. Ten years of CO₂ extracted oils. IN: **Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils**, 12th Int., 1992, Áustria. Anais, Áustria,. p.53-93. 1992.
- Montanari, L.; King, J. W.; List, G. R.; Rennick, K. A. Selective extraction of phospholipid mixtures by supercritical carbon dioxide and cosolvents. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, p.1230-1233. 1996.
- Montgomery, D. C. **Diseño y Análisis de Experimentos**. México: Iberoamérica. 1991.
- Moore, S.; Samdani, S.; Ondrey, G.; Parkinson, G. New roles for supercritical. **Chemical Engineering**, v.101, n.1, p.32-35. 1994.
- Moradas-Ferreira, P.; Costa, V.; Piper, P.; Mager, W. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. **Molecular Microbiology**, v.19, n.4, p.651-658. 1996.
- Motoyo, O.; Hideko, M.; Hideo, I.; Shizuo, T.; Yoshiaki, S.; Michio, K.; Ryo, K. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linolenic acid peroxidación and Haemolysis. **Phytochemistry**, v.36, n.3, p.579-583. 1994.

Moundipa, F. P. Effects of aqueous extracts of *Hibiscus macranthus* and *Basella alba* Linn in mature rat testis function. Andrology in the nineties. **Book of Abstracts of the International Symposium on Male Infertility and Assisted Reproduction**. Belgium. 1993.

Mutholland, C. W.; Strain, J. J. Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) of plasma. Effects of supplementation of young healthy volunteers with large doses of alpha-tocopherol and ascorbic acid. 1993. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.63, p.27-32. 1993.

Mzoughi, N.; Faycal, H.; Dachraou, M.; Villeneuve, J. P.; Cattini, C.; Mora S. J.; Abed, A. E. Méthodologie de l'extraction des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Application à des sédiments de la lagune de Bizerte (Tunisie). **C.R. Geoscience** v.334, n.12, p.893-901. 2002.

Nair, A. G. R.; Subramanian, S. S.; Swamy, M. N. Glycosides from the flowers of *Hibiscus tiliaceus*. **Journal of Science Indian Research**, v.20-B, p.553-554. 1961.

Nilson, W. B.; Gauglitz Jr., E. J.; Hudson, J. K. Solubilities of fish oil esters using incremental pressure and a temperature gradient. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.66, p.1596-1600. 1989.

Nishikawa, S.; Yasuda, S.; Hanzawa, M.; Mokuzai, G. Extractives of ohyonire, *Ulmus laciniata*. V Isolation of mansonone, F. lignoceryl ferulate, and lacinilene D from the heartwood. **Journal of Science Indian Research**, v.18, p. 623. 1973.

NRSP 309. **Drogas Crudas. Métodos de Análisis**. Norma ramal. Ministerio de Salud Pública, Cuba. 1992.

Nunes, G. S.; Santos, T. C.; Barceló, D.; Pimenta, A. S.; Ribeiro, M. L. Extração por fluído supercrítico de alguns inseticidas carbamatos em amostras de batata, com determinação por HPLC/espectrometria de massas. **Química Nova**, v.25, n.2, p.214-220. 2002.

Obana, H.; Kikuchi, K.; Okihashi, M.; Hori, S. Determination of organophosphorus pesticides in food using an accelerated solvent extraction system. **The Analyst**, v.12, n.3, p.217- 220. 1997.

Ohkatsu, Y.; Kajiyama, T.; Arai, Y. Antioxidant activities of tocopherols **Polymers Degradation and stability**, v.72, n.2, p.303-311. 2001.

Okihashi, M.; Obana, H. Determination of N-methylcarbamate pesticides in foods using accelerated solvent extraction with a mini-column cleanup. 1998. **The Analyst**, v.123, n.4, p.711- 714. 1998.

Ong, E. S.; Woo, S. O.; Yong, Y. L. Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v.904, n.1, p.57- 64. 2000.

Ovadia, M. E.; Skauen, D.M. Effect of ultrasonic waves on extraction of alkaloids. **Journal Pharmacology Science**, v.54, n.7, p.1013. In ref. List, P.H.; Schmidt, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**, 1989. Boca Rato. 1965.

Ozcan, A.; Ozcan, A. S. Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*. **Talanta**, v.64, p.491-495. 2004.

Palma, M.; Piñeiro, Z.; Barroso, C. G. In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. **Journal of Chromatography A**, v.968, n.1-2, p.1-6. 2002.

Palozza, P.; Luberto, C.; Calviello, G. Antioxidant and pro oxidant role of beta-carotenes in murine normal and tumor thymocytes: Effects of oxygen in murine normal and tumor thymocytes, **Free Radical Biology and Medicine**, v.22, n.6, p.1065-1073. 1997.

- Papagiannopoulos, M.; Zimmermann, B.; Mellenthin, A.; Krappe, M.; Maio, G.; Galensa, R. Online Coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt. **Journal of Chromatography A**, v.958, p.9-16. 2002.
- Parkinson, G.; Johnson, E. Supercritical Process win CPI Acceptance. **Chemical Engineering I**, v.96, n.7, p.35-39. 1989.
- Pellerin, P. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. **Perfumer and Flavorist**, Wheaton, v.16, p.37-39. 1991.
- Percorelli, I.; Galarini, R.; Bibi, R.; Casciarri, A.; Floridi, A. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. **Analytical Chimica Acta**, v.483, p.81-89. 2003.
- Peker, H.; Srinivasan, M. P.; Smith, J. M.; McCoy, B. J. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. **Aiche Journal**, v.38, n.5, p.761-769. 1992.
- Petsche, I. B.; Debenedetti, P. G. Solute-solvent interactions in infinitely dilute supercritical mixtures: a molecular dynamics investigation. **Journal of Chemical Physics**, v.91, n.11, p.7075. 1989.
- Péres, V. F. **Estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar de *Piper gaudichaudianun* Kunth**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Cuba. 2003.
- Phillipson, J. D. A matter of some sensitivity. **Phytochemistry**, v.6, n.38 p. 1319-1343. 1995.
- Pin-Der, D.; Gow-Chin, Y. Ant oxidative activity three herbal water extracts. **Food Chemistry**, v.60, n.4, p.639-645. 1997.

Popp, P.; Keil, P.; Möder, M.; Paschke, A.; Thuss, U. Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectroscopy for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in solid wastes. **Journal of Chromatography A**, v.774, n.1-2, p.203-211. 1997.

Pörschmann, J.; Plugge, J.; Toth, R. In situ derivatization using pressurized liquid extraction to determine phenol, sterols and carboxylic acids in environmental samples and microbial biomasses. **Journal of Chromatography A**, v.909, n.1, p.95-109. 2001.

Pörschmann, J.; Plugge, J. Extraction of polar and hydrophobic pollutants using accelerated solvent extraction (ASE). **Journal of Analytical Chemistry**, v.364, n.7, p.643-644. 1999.

Przybylski, R.; Lee, Y. C. I.; Eskin, N. A. M. Antioxidant and radical-scavenging activities of buckwheat seed components. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.75, n.1, p.1595-1601, 1998.

Queckenberg, O. R.; Frahm, A. W. Supercritical fluid extraction and selectivity in der naturstoffanalytik. **Pharmazie**, v.49, p.159-166, 1994.

Reeve, R. N. **Environmental Analysis**, Editor: John D. Barnes, 1994. p.235-236.

Reverchon, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, v.10, p.1-37. 1997.

Reverchon, E.; Della Porta, G.; Lamberti, G. Modeling of orange flower concrete fractionation by supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p.115-121. 1999.

Reverchon, E.; Osséo, S. Comparison of processes for the supercritical carbon dioxide extraction of oil from soybean seeds. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.71, n.9, p.1007-1012. 1994.

Reverchon, E.; Della Porta, G. Supercritical CO₂ extraction and fractionation of lavender essential oils and waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.1654-1658. 1995.

Reverchon, E.; Della Porta, G.; Taddeo, R.; Pallado, P.; Stassi, A. Solubility and micronization of griseofulvin in supercritical CHF₃. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.34, n.11, p.4087-4091. 1995.

Reverchon, E.; Donsì, G.; Osséo, L. S. Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.32, n.11, p.2721-2726. 1993.

Reverchon, E.; Donsì, G.; Pota, F. Extraction of essential oils using supercritical CO₂: effect of some process and pre-process parameters. **Italian Journal of Food Science**, v.3, p.187-194. 1992.

Reverchon, E.; Marrone, C. Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. **Journal of Supercritical Fluids**, v.19, n.2, p.161-175. 2001.

Reverchon, E.; Senatore, F. Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography — mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.1, p.154-158. 1994.

Richards, W. T.; Loomis, A. I. The chemical effects of high frequency sound waves. I. A preliminary survey. **Journal of American Chemistry Society**, v.49, p.3086. 1927.

Richter, B. E. Extraction of hydrocarbon contamination from soils using accelerated solvent extraction. **Journal of Chromatography A**, v.874, n.2, p.217-224. 2000.

- Richter, B. E.; Ezzell, J. L.; Knowles, D.E.; Hoefler, F. Extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans from environmental samples using accelerated solvent extraction (ASE). **Chemosphere**, v.34, n.5-7, p.975-987. 1997.
- Richter, M.; Sovová, H. The solubility of two monoterpenes in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v.85, p.285-300. 1993.
- Rizvi, S. S. H.; Daniel, J. A.; Benado, A. L.; Zollweg, J. A. Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. **Food Technology**, p.57-64, Jul. 1986.
- Roberts, J. E.; Tyler, V. E. Tyler's Herbs of Herba of Choise. **The Therapeutic Use of Phytomedicinals**. The Haworth Press. Inc., New York. 1998.
- Rocha, S. R. P. **Extração de Compostos Voláteis de Carvões Minerais Utilizando-se Fluidos Supercríticos**, Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, Dissertação de Mestrado. 1995.
- Rodrigues, M. R. A.; Caramão, E. B.; Dos Santos, J. G.; Dariva, C.; Oliveira, J. V. The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from high-pressure CO₂ extraction of *Majorana hortensis* Moench. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.2, p.453-456. 2003.
- Roig, J. T. **Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba**. Ciudad Habana: Editorial Científico Técnica. 1988, p.584.
- Rostagno, M. A.; Araújo, J. M. A.; Sândi, D. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. **Food Chemistry**, v.78, n.1, p.111-117. 2002.
- Rowe, J. W.; Seikel, M. K.; Roy, D. N.; Jorgensen, E. Chemotaxonomy of ulmus. **Phytochemistry**, v.11, n.8, p.2513. 1972.

Roy, B. C.; Goto, M.; Hirose, T. Extraction of ginger oil with supercritical carbon dioxide: experiments and modeling. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.35, n.2, p.607-612. 1996.

Roy, B. C.; Goto, M.; Kodama, A.; Hirose, T. Supercritical CO₂ extraction of essential oils and cuticular waxes from peppermint leaves. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.67, p.21-26. 1996.

Rucker, G.; NEugebauer, M.; Willems, G. G.; **Intrumentelle Pharmazeutische Analytik**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1998.

Ryan, T. W.; Yocklawich, S. G.; Watkins, J. C.; Levy, E. J. Quantitative analysis of additives in polymers using coupled supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography. **Journal Chromatography A**, v.505, n.1, p.273-282. 1990.

Ryan, D.; Robards, K.; Prenzler, P.; Antolovich, M. Applications of mass spectrometry to plant phenols. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, m.5, p.362-372. 1999.

Sadaquat, A.; Pahup, S.; Thomson, R. H. Naturally occurring quinones. Oart 28. Sesquiterpenoid quinones and related compounds from *Hibiscus tiliaceus*. **Journal of the Chemical Society, Perkin I**. v.1, n.1, p.257-259. 1980.

Saim, Jr.; Dean, M. D. P.; Abdullah, Z. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurized and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. **Journal of Chromatography A**, v.791, p.361-366. 1997.

Saito, K.; Takekuma, M.; Ogawa, M.; Kobayashi, S.; Sugawara, Y.; Ishizuka, M.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y. Extraction and clean up methods of dioxins in house dust from two cities in Japan using accelerated solvent extraction and a disposable multi-layer silica-gel cartridge. **Chemosphere**, v.53, n.2, p.137-142. 2003.

- Sakagami, H.; Satoh, K. Pro oxidant action of two antioxidants: Ascorbic acid and gallic acid. **Anticancer Research**, v.17, n.1 p.221-224. 1997.
- Saldaña, M. D. A.; Mazzafera, P.; Mohamed, R. S. Uso de fluidos supercríticos para obtenção de alcalóides de plantas naturais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.1, p.80-88. 1998.
- Sankara, S. S.; Narayana, M. S. Pigments on the flowers of *Hibiscus tiliaceus*. **Journal of Science Indian Research**, v.20-B, p.133-134. 1961.
- Santiago, L. S.; Lau, T. S.; Melcher, P. J.; Steele, O. C.; Goldstein, G. Morphological and physiological responses of Hawaii *Hibiscus tiliaceus* population to light and salinity. **International Journal of Plants Sciences**, v.161, n.1, p.99-106. 2000.
- Sargenti, S. R.; Lanças, F. M. Influence of the extraction mode and temperature in supercritical fluid extraction of brazilian citrus. Part i. Riva Del Garda, 1994. p.1800-1812. **International Symposium on Capillary Chromatography**, 16, Riva Del garda. 1994.
- Sargenti, S. R.; Vichnewsi, W. Sonication and liquid chromatography as a rapid technique. for extraction and fractionation of plant material. **Phytochemical Analysis**, v.11, n.2, p.69-73. 2000.
- Scalia, S.; Giuffreda, L.; Pallado, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.21, n.3, p.549-558. 1999.
- Schafer, K. Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material. **Analytical Chimica Acta**, v.358, n.1, p.69-77. 1998.
- Schinor, E. C.; Salvador, M. J.; Turatti, I. C. C.; Zucchi, O. L. A. D.; Dias, D. A. Comparision of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three Chresta ssp. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.11, p.415-421. 2004.

Schroeter, F.; Anastassiades, M.; Scherbaum, E. Comparison of ASE (accelerated solvent extraction) with traditional extraction methods. **CLB Chemical Labor Biotech**, v.50, n.1, p.4-6. 1999.

Schultz, A. R. **Botânica Sistemática II**, 3ed. Porto Alegre: Globo, 1963. p.189.

Schwesig, D.; Gottlein, A.; Haumaier, L.; Blasek, R.; Elgen, G. Soil organic matter extraction using water at high temperature and elevated pressure (ASE) as compared to conventional methods. **Environmental Analytical Chemistry**, v.73, n.4, p.253-268. 1999.

Sebastián, S. L.; Ramos, E.; Ibáñez, E.; Bueno, J. M.; Ballester, L.; Tabera, J.; Reglero, G. Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.13-19. 1998.

Seca, A. M. L.; Silva, A. M. S.; Silvestre, A. J. D.; Cavaleiro, J. A. S. ; Domingues, F. M. J.; Pascoal-Neto, C. P. Phenolic constituents from the core of Kenaf (*Hibiscus cannabinus*). **Phytochemistry**, v.56, n.7, p.759-767. 2001.

Seca, A. M. L.; Silva, A. M. S.; Silvestre, A. J. D.; Cavaleiro, J. A. S.; Domingues, F. M. J.; Pascoal-Neto, C.P. Chemical composition of the light petroleum extract of *Hibiscus cannabinus* bark and core. **Phytochemistry Analysis**, v.11, n.6, p.345-350. 2001 b.

Seif-EI-Nasr, M.; El-Fattall, A. A. A. Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischemia: effect of ginkgo biloba extract. **Pharmacological Research**, v.32, n.5, p.273-278. 1995.

Sharma, A. K.; Prokopczyk, B.; Hoffmann, D. Supercritical fluid extraction of mois snuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.508-510. 1991.

Shi, H.; Noguchi, N.; Niki, E. Comparative study on dynamics of ant oxidative action of α -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and α -tocopherol against lipid per oxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, n.3-4, p.334-346. 1999.

- Shu, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n.8, p. 1053-1071. 1998.
- Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 4.ed. Califórnia: Willey, 1981.
- Simándi, B.; Oszagyán, M.; Lemberkovics, É.; Kéry, Á.; Kaszács, J.; Thyron, F.; Mátyás, T. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. **Food Research International**, v.31, n.10, p.723-728. 1998.
- Singh, Y. H.; Ikaiahifo, T.; Panuve, M.; Slatter, C. Folk medicine in Tonga. A study on the use of herbal medicines for obstetric and gynecological conditions and disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v.12, n.3, p.305-329. 1984.
- Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, 2.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1979. p.246.
- Soave, R. C. F.; Mendes, J. A.; Beltrati, C. M. Estudo morfo anatômico das sementes de *Hibiscus tiliaceus* L. Malváceas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.33, n.1, p.141-148. 1990.
- Soejarto, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspective from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p.1-5. 1996.
- Soto, R. Nutrient concentration and retranslocation in coastal vegetation and mangroves from the pacific Coast of Costa Rica. 1992. **Brenesia**. v.37, p. 33-50.
- Souza Brito, A. R. M.; Souza Brito, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, n.1, p.53-67. 1993.
- Srivastava, D. N.; Bhatt, S. K.; Udupa, K. N. Gas chromatographic identification of fatty acids, fatty alcohols, and hydrocarbons of *Hibiscus rosa-sinensis* leaves. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.53, n.10, p.607-608. 1976.

Staby, A.; Forskov, T.; Mollerup, J. Phase equilibria of fish oil fatty acid ethyl esters in sub and supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v.87, p.309-340. 1993.

Stahl, E.; Schultz, E.; Mangold, H. K. Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, n.6, p.1153-1157. 1980.

Stuart, G. R. **Extração Subcrítica e Supercrítica de Óleo Essencial de *Ocimum basilicum* L.**, Florianópolis, Universidade federal de Santa Catarina, Dissertação de Mestrado. 1995.

Subramanian, S. S.; Nair, A.G. R. Chemical constituents of the fruits of *Hibiscus tiliaceus*. **Current Science India**, v.42, n.21, p.770-771. 1973.

Sun, R.; Sivik, B.; Larsson, K. The fractional extraction of lipids and cholesterol from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. **Fat Science Technology**, Leinfelden-Echterdingen, v.97, n.6, p.214-219. 1995.

Sunol, A. K.; Beyer, G. H. Mechanism of supercritical extraction of coal. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.29, p.842-849. 1990.

Suomi, J.; Sirén, H.; Hartonen, K.; Riekkola, M. L. Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar eletrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.868, p.73-83. 2000.

Suss, W. Pharmazie. 1972. v.27, p.615. In ref. List, P.H.; Schmidt, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. Boca Raton. 1989

Suzuki, T.; Koyama, T.; Suzuki, S. Mutagenicities of mononitrobenzene derivatives in the presence of norharman. **Mutation Research**, v.120, p.105-110. 1983.

- Tabatai, M. A.; Bremner, J. M. A simple turbidimetric method of determining total sulfur in plant materials. **Agronomy Journal**, v.62, p.805-806. 1970.
- Tanaka, T. Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination, **Cancer Research**, v.57, p.246-252. 1997.
- Tedesco, M. J. Extração Simultânea de N, P, K, Ca e Mg em Tecido de Plantas por Digestão com H₂O₂.H₂SO₄. **Informativo interno 01/82. Departamento de solos.** Porto Alegre: UFRGS, 1982. p.23.
- Telefo, P. B.; Moundipa, P. F.; Tchana, A. N.; Tchouanguép, C. D.; Mbiapo, F. T. Effects of an aqueous extract of *Aloe buettneri*, *Justicia insularis*, *Hibiscus macranthus*, *Dicliptera verticillata* on some physiological and biochemical parameters of reproduction in immature female rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.63, n.3, p.193-200. 1998.
- Temelli, F.; Chen, C. S.; Braddock, R. J. Supercritical fluid extraction in citrus oil processing. **Food Technology**, v.42, p.145-150. 1988.
- Tena, M. T.; Varcárcel, M.; Hidalgo, J.; Ubera, L. Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from Rosemary: Comparison with liquid solvent sonication. **Analytical Chemistry**, v.69, p.521-526. 1997.
- Thayer, S. S.; Bjorkman, O. Leaf xanthophylls content and composition in sun and shade determined by HPLC. **Photosynthesis Research**, v.23, n.3, p. 331-343. 1990.
- Thurman, D. I.; Situnayake, R. D.; Koottathep, S.; McConkey, B.; Davis, M. Antioxidant status measured by the TRAP assay in rheumatoid arthritis. In: Rice-Evans, C. ed. **Free Radicals Oxidative Stress and Drug Action.** London: Richelieu Press, 1987, p.169-191.

- Toma, M.; Vinatoru, M.; Paniwnyk, L.; Mason, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics and Sonochemistry**, v.8, p.137-142. 2001.
- Tomkins, B. A.; Griest, W. H. Liquid-chromatographic determination of benzo (α)pyrene at part-per-billion concentrations in highly refined coal-derived and petroleum-derived fuels. **Journal Chromatography A**, 386, p.103. 1987.
- Tracor and Yitco. US Public Health Publication N^o 149, Rockwell, Md.: YF Thomson & Company, 1961-1967.
- Trease, G. E.; Evans, W. C. **Pharmacognosy**. 14.ed. London: W. B. Saunders, 1996. 120p.
- Tseng, T. H.; Kao, E. S.; Chu, C. Y.; Chou, F. P.; Lin, W. U. H. W.; Wang, C. J. Protective effects of dried flowers extracts of *Hibiscus sadariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, n.12, p.1159-1164. 1997.
- Tsui-Hwa, T.; Chau-Jong, W.; Erl-Shyh, K.; Hia-Yih, C. *Hibiscus* protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by ter-butylhidroperoxide in rat primary hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v.101, p.137-148. 1996.
- Vale, M. G. R. **Extração de Hidrocarbonetos em Carvão Mineral Usando SFE, US e Soxhlet**. 1997. 152 p Tese de Doutorado - PPGEMM-UFRGS.
- Valachovic, P.; Pechova, A.; Mason, T. J. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, n.2, p.111-117. 2001.
- Vannoort, R. W.; Chervet, J. P.; Lingeman, H.; Dejong, G. J.; Brinkman, U. A. Coupling of supercritical fluid extraction with chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v.505,p.45-77. 1990.

- Vega, P. J.; Balaban, M. O.; Sims, C. A.; O'Keefe, S. F.; Cornell, J. A. Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RSM.1996. **Journal Food Science**, v.61, n.4, p.757-759. 1996.
- Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, n.25, p.303-313. 2001.
- Viswewara, R.; Seshadri, T. R. Constitution of gossypin. Part I. **Proceedings - Indian Academy of Sciences**, V.24 A, p.375. 1946 a.
- Viswewara, R.; Seshadri, T. R. Colorings matter of the flowers of *Hibiscus vitifolius*. **Proceedings - Indian Academy of Sciences**, v.24 A, p.352. 1946 b.
- Wagenaar, H. The Well-Tempered Interviewer. **Beleid & Maatschappij**, v.23, n.3, p.152-157. 1996.
- Wang, Z.; Fingas, M.; Li, K. Fractionation of a light crude oil and identification and quantitation of aliphatic aromatic and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS. Part.1 **Journal of Chromatographic Science**, v.32, p.367-382. 1994.
- Watanabe, M. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.839-845. 1998.
- Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Look, S. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled lipid peroxidation. **Federation of European Biochemical Societies Letters (FEBS)**, v.187, p.33-37. 1985.
- Webber, I. E. Systematic anatomy of the woods of the *Malvaceae*. **Tropical Woods**, v.38, p.15-36. 1934.
- Wender, I. Coal Science in a changing world ender I. **Fuel**, v.64, n.8, p.1035. 1985.

- Wenzel, K. D.; Hubert, A.; Manz, M.; Weissflog, L.; Engewald, W.; Scheuermann, G. Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses. **Analytical Chemistry**. V.70, n.22, p.4827-4835. 1998.
- Wehrlé, P.; Nobelis, A.; Stamm, A. **Science Technologie Pharmaceutique**. v.5. n.6/7, p.471-489. 1989.
- Whistler, W. A. Traditional and herbal medicine in Cook Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v.13, n.3, p.239-280. 1985.
- Whitehead, T. P.; Thorpe, G. H. G.; Marshall, S. R. J. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. **Analytical Chimica Acta**, v.266, p.265-277.1992.
- WHO. Quality Control methods for medicinal plant materials. 1992. **World Health Organization**. WHO/Pharm/92, 559, p. 88.
- Williams, A. R. **Ultrasound: Biological Effects and Potential Hazards**. London: Academic Press, 1983.
- Williams, D. F. Extraction with supercritical gases. **Chemical Engineering Science**, v.36, n.11, p.1769-1788. 1981.
- Wise, S. A.; Benner, B. A.; Chesler, S. N.; Hilpert, L.; Vogt, C. R.; May, W. E. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons from two standard references material particulate samples. **Analytical Chemistry**, v.58, p.3067. 1986.
- Wolfender, J. L.; Hostettmann, K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the investigation of medicinal plants. In: Arnason J.T.; Mata, R.; Romeo, J. T. (ed). **Recent Advances in Phytochemistry (29)**: Phytochemistry of medicinal plants. New York: Plenum. 1995.
- Wolthers, B. G.; Kraan, G. P. B. Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography – mass spectroscopy of steroids. **Journal of Chromatography A.**, v.843, p.247-274. 1999.

Womerley, J. S. **Botanical Validification in Medicinal Plant Investigations**. Report regional, 1974. Popeete, Tahiti, 1973, South Pacific commission, Noumea, New Caledonia, p.117.

Wood, R. W.; Loomis, A. L. Phil, M. Physical and biological effects of high-frequency sound waves. **Journal of American Chemistry Society**, v.7, n.4, p.417-436. 1927.

Xing, Y.; White, P. J. Identification and function of antioxidants from oat groats and hulls. 1997. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.74, n.3, p.303-307. 1997.

Yamasaki, H.; Uefuji, H.; Sakihoma, Y. Bleaching of the read anthocyanin induced by superoxide radical. 1996. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.332, n.1, p.183-186.1996.

Yates, F. **Technical Comunication No. 35**. Bucks: Commonwealth Agricultural Bureau. 1935.

Zheng, R. L.; Zhang, H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm mobility, viability, lipid peroxidation and cyclic nucleotides. **Free Radical Biology & Medicine**, v.22, n.4, p.581-586. 1997.

Zuloaga, O.; Etxebarria, N.; Fernández, L. A.; Madariaga, J. M. Comparision of accelerated solvent extraction with microwave- assisted extraction and Soxhlet for the extraction of chlorinated biphenyls in soil samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v.17, n.10, p. 642- 647. 1998.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados aqui apresentados e discutidos, tem-se como metas para futuros trabalhos:

1. Isolar os fitosteróis usando HPLC em escala preparativa e identificá-los através de NMR, UV-Vis e GC/MS;
2. Estudar a presença de flavonóides nos extratos obtidos;
3. Estudar aplicações farmacológicas para a planta *Hibiscus tiliaceus* L, baseadas em suas propriedades químicas.

8 PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA

8.1 Resumos em anais de eventos

1. MELECCHI, Maria Inês Soares; MARTINEZ, Migdalia Miranda; ABAD, Fernanda Contieri; ZINI, Priscila Peterlevitz; NASCIMENTO FILHO, Irajá do; CARAMÃO, Elina Bastos. Chemical Composition of *Hibiscus tiliaceus* L. Flowers: a Study of Extraction Methods. IN: 24th International Symposium on Capillary Chromatography And Eletrophoresis. 2001, Las Vegas – Nevada.2001.
2. MELECCHI, Maria Inês Soares; ABAD, Fernanda Contieri; SCHOSSLER, Patrícia; ZANIN, Kelen; CARAMÃO, Elina Bastos. Extração Acelerada Com Solvente Aplicada Ao Estudo da Composição Química do Extrato da Flor de *Hibiscus tiliaceus* L. In:12 ENQA, 2003, Maranhão. ANAIS 12 ENQA.2003. p.PCO14.
3. MELECCHI, Maria Inês Soares; MARTINEZ, Migdalia Miranda; ABAD, Fernanda Contieri; ZINI, Priscila Peterlevitz; RODRIGUES, Ana Paula Vargas; CARAMÃO, Elina Bastos. Optization Of The Sonication Extraction of *Hibiscus tiliaceus* L. In: 26ISCC, 2003, Las Vegas. Anais 26 ISCC. 2003.
4. MELECCHI, Maria Inês Soares; MARTINEZ, Migdalia Miranda; ABAD, Fernanda Contieri; ZINI, Priscila Peterlevitz; SIQUEIRA, Ionara Rodrigues; ALEXANDRE NETO, Carlos; CARAMÃO, Elina Bastos. Association of the Antioxidant Capacity and the Chemical Composition of the Extracts of *Hibiscus tiliaceus* L. In: 25th International Symposium on Capillary Chromatography And Eletrophoresis. 25th International Symposium on Capillary Chromatography And Eletrophoresis. 2002, Riva del Garda. Itália.

5. MELECCHI, Maria Inês Soares; MARTINEZ, Migdalia Miranda; ABAD, Fernanda Contieri; RODRIGUES, Ana Paula Vargas; CARAMÃO, Elina Bastos. Caracterização Cromatográfica do Extrato de n-hexano da Flor de *Hibiscus tiliaceus* L. In: Salão de Iniciação Científica. 2002.
6. MELECCHI, Maria Inês Soares; MARTINEZ, Migdalia Miranda; ABAD, Fernanda Contieri; ZINI, Priscila Peterlevitz; SIQUEIRA, Ionara Rodrigues; ALEXANDRE NETO, Carlos; CARAMÃO, Elina Bastos. Estudo da Capacidade Antioxidante e Identificação dos Extratos Obtidos por Diferentes Métodos das Flores de *Hibiscus tiliaceus* L. In: 24ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2001. Poços de Caldas. Livro de Resumos. 2001. v.22.
7. MELECCHI, Maria Inês Soares; MARTINEZ, Migdalia Miranda; ABAD, Fernanda Contieri; ZINI, Priscila Peterlevitz;; CARAMÃO, Elina Bastos. Estudio por el Sistema Acolado Cromatografia Gaseosa Espectrometria de Masas Del Extracto Obtenido com n-hexano por Diferentes Métodos de Extracción a partir de las Flores de *Hibiscus tiliaceus* L. In: IV CONGRESO INTERNACIONAL DE QUÍMICA, 2001, Havana – Cuba. Revista Cubana de Química. 2001. v. XIII.
8. MELECCHI, Maria Inês Soares; MARTINEZ, Migdalia Miranda; ABAD, Fernanda Contieri; ZINI, Priscila Peterlevitz;; SAFFI, Jenifer; RAMOS, Ana Lúgia de Paula; Lenzi, C.; ROEHRs, R; COMPARSI, F.P.; CARAMÃO, Elina Bastos. Estudo da Atividade dos Extratos das Flores de *Hibiscus tiliaceus* L Frente a ação Antioxidante da Enzima Superóxido Dismutase na Levedura *Saccharomyces Cerevisiae*. In: XLI CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2001, Porto Alegre. 2001.
9. MELECCHI, Maria Inês Soares; MARTINEZ, Migdalia Miranda; ABAD, Fernanda Contieri; ZINI, Priscila Peterlevitz;. CARAMÃO, Elina Bastos. Extração e Análise de Compostos Fungicidas a partir de *Hibiscus tiliaceus* L (Algodoeiro da Praia). In: VII ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 2000. Santa Cruz do Sul. Livro de Resumos. 2001.
10. MELECCHI, Maria Inês Soares; MARTINEZ, Migdalia Miranda; ABAD, Fernanda Contieri; ZINI, Priscila Peterlevitz;. CARAMÃO, Elina Bastos. Otimização do Tempo de

Extração or Ultra-Som da Flor de *Hibiscus tiliaceus* L. In: II ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 2001. Campinas. Livro de Resumos. Campinas-SP: R. Vieira Gráfica e Editora Ltda., 2001.

11. CARAMÃO, Elina Bastos; PÉREZ, Valéria Flores; ABAD, Fernanda Contieri; MELECCHI, Maria Inês Soares;; MARTINEZ, Migdalia Miranda. Accelerated Solvent Extraction of *Piper gaudichaudianum* Kunth. In: 28TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY AND ELETROPHORESIS, 2005, Las Vegas. **Proceeding of the 28th International Symposium on Capillary Chromatography and Eeletrophoresis.**

12. PÉREZ, Valéria Flores; CARAMÃO, Elina Bastos; MARTINEZ, Migdalia Miranda; MELECCHI, Maria Inês Soares; ABAD, Fernanda Contieri. Comparison of accelerated Solvent Extraction, Soxhlet Extraction and *Piper gaudichaudianum* Kunth. In: 28TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY AND ELETROPHORESIS, 2005, Las Vegas.

13. PÉREZ, Valéria Flores; MELECCHI, Maria Inês Soares; ABAD, Fernanda Contieri.; Soares, Rafael Dutra; CARAMÃO, Elina Bastos. Chromatographic analysis of sonication extracts of *Piper gaudichaudianum* Kunth. In: 27TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY AND ELETROPHORESIS, 2004, Riva del Garda. **Proceeding of the 27th International Symposium on Capillary Chromatography and Eeletrophoresis. 2004.**

14. MELECCHI, Maria Inês Soares; ABAD, Fernanda Contieri; CARAMÃO, Elina Bastos; DARIVA, Cláudio; OLIVEIRA, José Vladimir de; GIRARDI, J S. The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from high-pressure CO₂ extraction of *Hibiscus tiliaceus* L. In: 27TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY AND ELETROPHORESIS, 2004, Riva del Garda. **Proceeding of the 27th International Symposium on Capillary Chromatography and Eeletrophoresis. 2004.**

8.2 Artigos Completos publicados em periódicos

1. PÉREZ, Valéria Flores; SAFFI, Jenifer; MELECCHI, Maria Inês Soares; ABAD, Fernanda Contieri; JACQUES, Rosângela de Assis; MARTINEZ, Migdalia Miranda; OLIVEIRA, Eniz da Conceição; CARAMÃO, Elina Bastos. Comparison of Soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. Journal of Chromatography A. 2005, *in press*, *disponível on line*.
2. PÉREZ, Valéria Flores; SAFFI, Jenifer; MELECCHI, Maria Inês Soares; ABAD, Fernanda Contieri; JACQUES, Rosângela de Assis; MARTINEZ, Migdalia Miranda; OLIVEIRA, Eniz da Conceição; CARAMÃO, Elina Bastos. Optimization of pressurized liquid extraction of *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. Journal of Chromatography A. 2005, *in press*, *disponível on line*.
3. MELECCHI, Maria Inês Soares; ABAD, Fernanda Contieri; PÉREZ, Valéria Flores; DARIVA, Cláudio; MARTINEZ, Migdalia Miranda; CARAMÃO, Elina Bastos. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L flowers. Ultrasonics sonochemistry, 2005, *in press*, *disponível on line*.
4. MELECCHI, Maria Inês Soares; Nascimento Filho, Irajá Do; ABAD, Fernanda Contieri; MARTINEZ, Migdalia Miranda; CARAMÃO, Elina Bastos. Chemical Composition of *Hibiscus tiliaceus* L flowers: A study of Extraction Methods. Journal of Microcolumn Separations, Alemanha. V.22, p.86-90. 2002