



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos



LABORATÓRIO DE EXTRAÇÃO,
TERMODINÂMICA APLICADA
e EQUILÍBRIO

Extração supercrítica de folhas de *Eugenia uniflora* L.

Camila Arantes Peixoto

*Engenheira de Alimentos
Mestre em Engenharia de Alimentos*

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Orientador

Prof. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira

Co-orientadora

Tese apresentada à comissão julgadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de **Doutor em Engenharia de Alimentos** pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

CAMPINAS – SÃO PAULO

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P359e Peixoto, Camila Arantes
Extração supercrítica de folhas de *Eugenia uniflora* L. / Camila Arantes Peixoto. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Fernando Antonio Cabral
Co-orientador: Alessandra Lopes de Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de

1. *Eugenia uniflora*. 2. Extração supercrítica. 3. Atividade antioxidante. I. Cabral, Fernando Antonio. II. Oliveira, Alessandra Lopes de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Título em inglês: Supercritical extraction of leaves of *Eugenia uniflora* L.

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Eugenia uniflora*, Supercritical extraction, Antioxidant activity

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Fernando Antonio Cabral

Carmen Lúcia Queiroga

Cíntia Bernardo Gonçalves

Eduardo Augusto Caldas Batista

Maria Cristina Marcucci Ribeiro

Silvânia Regina Mendes Moreschi

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora

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

Dra. Carmen Lúcia Queiroga
CPQBA - UNICAMP / Membro Titular

Profa. Dra. Cíntia Bernardo Gonçalves
FZEA - USP / Membro Titular

Prof. Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista
DEA - FEA - UNICAMP / Membro Titular

Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro
UNIBAN / Membro Titular

Profa. Dra. Silvânia Regina Mendes Moreschi
UTFPR / Membro Titular

Prof. Dr. Antônio José de Almeida Meirelles
DEA – FEA – UNICAMP / Membro Suplente

Profa. Dra. Christianne E. da Costa Rodrigues
FZEA - USP / Membro Suplente

Ao meu pai, Tadeu, inspiração do meu esforço e minha orientação preciosa,
à minha mãe, Silóá, minha amorosa conselheira e incentivadora e
à minha linda irmã Lia, por sua luz e alegria.
Vocês nunca mediram esforços pra que eu chegasse até aqui.
Esta vitória também é de vocês!

Ao meu amado José Marques que faz minha vida completa e feliz
e a quem tanto admiro.

Com amor, dedico.

Agradecimentos

Muito obrigada **SENHOR!** “Ele é o Deus que me cinge de força e torna perfeito o meu caminho”. Sl 18:32.

Ao **Professor Dr. Fernando Antonio Cabral**, muito obrigada pela orientação, pela oportunidade de crescimento, pelo exemplo de beneficência e pela disponibilidade nestes cinco anos de trabalho juntos. Sinto-me privilegiada por ter acreditado em mim e na minha capacidade.

À querida **Alessandra**, muito obrigada pela confiança, pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa, pela acolhida em sua casa e pelas palavras de incentivo. Você sempre será meu modelo de profissionalismo.

A todos da **minha família**, obrigada pela torcida. Eu amo vocês!

À **família do meu companheiro José Marques**, agradeço pelo diário cuidado comigo.

Às minhas amigas de sempre: **Renata, Carina, Camila, Glória, Ana Lídia, Quel, Juliana, Flávia, Kênia e Janaína**. Obrigada me ajudarem a cultivar nossa amizade apesar da distância. Eu aprendo muito com cada uma de vocês.

Aos meus amados **Bia e Machadinho**, obrigada por dividirem esta etapa ao meu lado, por cada momento de desabafo e descontração, pela palavra de otimismo que nunca faltou.

Às minhas queridas amigas **Losi e Letícia**, obrigada pelo companheirismo, pela pronta ajuda, pelos conselhos e pelo carinho. Vocês são muito importantes para mim!

À **Luciana Malta**, obrigada pela presteza nas análises de avaliação da atividade antioxidante dos extratos e pela amizade.

Ao **Rodrigo Scherer**, agradeço pela valiosa colaboração nas análises de CG-EM.

Aos membros da **banca examinadora** agradeço pelas valiosas sugestões.

À **Fapesp** agradeço pelo financiamento deste trabalho.

Aos meus queridos: **Eliane, Márcia, Otávio, Marcelo, Tatiane, Leila, Veridiana, Lucielen, Danielle, Nirse, Patrícia, Raquel e Verônica**. Sempre presentes nesta etapa da minha vida.

Aos queridos **amigos e colegas do Extrae**, agradeço pela companhia agradável e mútua colaboração.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina
Poetisa do Estado de Goiás

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 A pitangueira (Eugenia uniflora L.)	5
3.2 Composição química de E. uniflora L.....	5
3.2.1 Farmacologia das folhas	7
3.2.2 Atividade antimicrobiana das folhas	8
3.3 Processo de extração com fluido supercrítico	9
3.3.1 O fluido supercrítico.....	9
3.3.2 O princípio do processo.....	11
3.3.3 O CO ₂ como fluido supercrítico	11
3.4 Atividade antioxidante	12
3.4.1 Compostos fenólicos como antioxidantes.....	13
3.4.2 Métodos de avaliação da atividade antioxidante.....	14
3.5 Modelagem termodinâmica	18
3.5.1 Critérios para o equilíbrio de fases	18
3.5.2 Emprego das equações de estado cúbicas para o cálculo do equilíbrio de fases.	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Matéria - Prima vegetal/ Produtos químicos diversos	25
4.1.1 Moagem e granulometria do material	25
4.1.2 Determinação da umidade.....	26
4.1.3 Determinação da densidade real das partículas.....	27
4.1.4 Cálculo da densidade aparente e da porosidade do leito	27
4.2 Métodos de obtenção de extrato de folhas de E. uniflora	28
4.2.1 Extração com solvente orgânico – Extrato etéreo.....	28
4.2.2 A extração a baixa pressão com etanol.....	28
4.2.3 Hidrodestilação.....	28
4.2.4 Extração supercrítica.....	29

4.3	Equipamentos e instrumentos	30
4.3.1	Sistema experimental para a medida da solubilidade e para as extrações com fluido supercrítico.....	30
4.3.2	Análises cromatográficas	32
4.4	Análise do potencial antioxidante dos extratos obtidos das folhas de <i>E. uniflora</i>.....	35
4.4.1	Determinação de fenóis totais das folhas de <i>E. uniflora</i>	36
4.4.2	Análise do potencial antioxidante dos extratos de <i>E. uniflora</i>	37
4.4.3	ORAC (Capacidade de absorver radicais livres).....	38
4.5	Modelagem termodinâmica	42
4.5.1	Equação de Estado e Propriedades críticas	42
4.5.2	Parâmetros de interação binária.....	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Caracterização da matéria prima vegetal	45
5.1.1	Umidade.....	45
5.1.2	Granulometria.....	45
5.1.3	Densidade real e densidade aparente	46
5.1.4	Porosidade	46
5.2	Extrato etéreo	46
5.3	Extrato etanólico das folhas de <i>E. uniflora</i>	46
5.4	Hidrodestilação	47
5.5	Testes preliminares de extração supercrítica	47
5.6	Extração supercrítica.....	50
5.7	Composição química do óleo volátil das folhas de <i>E. uniflora</i>.....	55
5.8	Composição química da microextração em fase sólida das folhas de <i>E. uniflora</i>	58
5.9	Composição química dos extratos supercríticos das folhas de <i>E. uniflora</i> ..	62
5.10	Identificação e composição dos extratos e extratos voláteis de <i>E. uniflora</i> obtidos por extração supercrítica e analisados por CG-DIC	68
5.11	Comportamento dos compostos majoritários presentes nos extratos supercríticos em função da pressão.....	75
5.12	Rendimentos de extração dos componentes majoritários dos extratos obtidos por extração supercrítica das folhas de <i>E. uniflora</i>.....	81
5.12.1	Rendimento de □-elemeno.....	81

5.12.2	Rendimento de germacreno D.....	82
5.13	Determinação do teor de fenóis totais dos extratos obtidos das folhas de E. uniflora	89
5.13.1	Determinação de fenóis e polifenóis.....	89
5.13.2	Avaliação <i>in vitro</i> de atividade antioxidante	90
5.14	Modelagem termodinâmica clássica.....	94
6	CONCLUSÕES.....	109
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	111
8	BIBLIOGRAFIA	112
8.	ANEXO	119

Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos de alguns compostos.....	9
Tabela 2: Propriedades físicas de gás, líquido e fluido supercrítico.....	10
Tabela 3: Umidade das folhas de <i>E.uniflora</i>	45
Tabela 4: Granulometria das folhas de <i>E.uniflora</i>	45
Tabela 5: Densidade aparente das folhas trituradas de <i>E.uniflora</i>	46
Tabela 6: Extrato etéreo das folhas de <i>E. uniflora</i>	46
Tabela 7: Rendimento médio da extração com álcool das folhas de <i>E. uniflora</i>	47
Tabela 8: Rendimento médio da hidrodestilação das folhas de <i>E. uniflora</i>	47
Tabela 9: Resultado dos testes preliminares, onde foi variada somente a massa de amostra utilizada nos experimentos.....	48
Tabela 10: Parâmetros de extração supercrítica após 60 minutos de extração a 40 °C..	51
Tabela 11: Parâmetros de extração supercrítica após 60 minutos de extração a 50 °C..	52
Tabela 12: Parâmetros de extração supercrítica após 60 minutos de extração a 60 °C..	52
Tabela 13: Composição química do óleo volátil das folhas de <i>E. uniflora</i> obtido por hidrodestilação.....	56
Tabela 14: Composição química da microextração em fase sólida das folhas de pitangueira.....	60
Tabela 15: Composição química do extrato supercrítico (EXT) e do extrato volátil (VOL) de folhas de pitangueira.....	63
Tabela 16: Comparação das composições químicas dos três extratos obtidos das folhas de <i>E.uniflora</i>	66
Tabela 17: Comparação da composição dos extratos obtidos na isoterma de 40 °C para as pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar.....	69
Tabela 18: Comparação da composição dos extratos obtidos na isoterma de 50 °C para as pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar.....	71
Tabela 19: Comparação da composição dos extratos obtidos na isoterma de 60 °C para as pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar.....	73

Tabela 20: Comparação entre os principais componentes encontrados em folhas e frutas da pitangueira, colhidos em diferentes regiões.....	75
Tabela 21: Rendimento de extração do γ -elemeno (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.....	81
Tabela 22: Rendimento de extração do germacreno D (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.....	83
Tabela 23: Rendimento de extração do curzereno (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.....	84
Tabela 24: Rendimento de extração do germacreno B (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.....	85
Tabela 25: Rendimento de extração do espatulenol (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.....	86
Tabela 26: Rendimento de extração do $C_{15}H_{20}O_2$ (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.....	87
Tabela 27: Atividade antioxidante, expressa em g ácido gálico/Kg de extrato, para os extratos obtidos via extração supercrítica, por hidrodestilação, com álcool hidratado e hexano.....	90
Tabela 28: Redução média do extrato etanólico das folhas de <i>E. uniflora</i>	91
Tabela 29: Valores de Cl_{50} para amostras de frutos do gênero <i>Eugenia</i> e de chás.....	92
Tabela 30: Valores de Trolox Equivalente para amostras de chás comparado aos de extrato de folhas de pitangueira.....	94
Tabela 31: Dados de propriedades críticas e fator acêntrico para os compostos escolhidos para a modelagem termodinâmica.....	95
Tabela 32: Estimativa da solubilidade em fração molar e mássica de γ -elemeno para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	97
Tabela 33: Estimativa da solubilidade em fração molar e mássica do curzereno para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	99
Tabela 34: Estimativa da solubilidade em fração mássica de espatulenol para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	101
Tabela 35: Fração mássica de veleral para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	103

Tabela 36: Estimativa da solubilidade em fração mássica de germacreno D para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	104
Tabela 37: Estimativa da solubilidade em fração mássica de germacreno B para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	105
Tabela 38 - Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 40°C e 100 bar, analisados por CG-DIC.....	139
Tabela 39: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 40°C e 150 bar, analisados por CG-DIC.....	140
Tabela 40: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 40°C e 200 bar, analisados por CG-DIC.....	141
Tabela 41: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 40°C e 250 bar, analisados por CG-DIC.....	142
Tabela 42: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 40 °C e 300 bar, analisados por CG-DIC.....	143
Tabela 43: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 50°C e 100 bar, analisados por CG-DIC.....	144
Tabela 44: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 50 °C e 150 bar, analisados por CG-DIC.....	145
Tabela 45: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 50 °C e 200 bar, analisados por CG-DIC.....	146
Tabela 46: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 50 °C e 250 bar, analisados por CG-DIC.....	147
Tabela 47: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 50 °C e 300 bar, analisados por CGIC.....	148

Tabela 48: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 60 °C e 100 bar, analisados por CG-DIC.....	149
Tabela 49: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 60 °C e 150 bar, analisados por CG-DIC.....	150
Tabela 50: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 60 °C e 200 bar, analisados por CG-DIC.....	151
Tabela 51: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 60 °C e 250 bar, analisados por CG-DIC.....	152
Tabela 52: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de <i>E. uniflora</i> obtido por extração supercrítica a 60 °C e 300 bar, analisados por CG-DIC.....	153

Lista de Figuras

Figura 1: Dependência da densidade de CO ₂ com a pressão e temperatura.....	10
Figura 2: Sistema experimental (Método dinâmico) para extração.....	31
Figura 3: Comportamento da massa acumulada de extrato em base seca para cada teste preliminar.....	49
Figura 4: Rendimento global e respectivos desvios pontuais obtidos para a temperatura de 40 °C em função da pressão.....	49
Figura 5: Rendimento global e respectivos desvios pontuais obtidos para a temperatura de 50 °C em função da pressão.....	53
Figura 6: Rendimento global e respectivos desvios pontuais obtidos para a temperatura de 60 °C em função da pressão.....	54
Figura 7: Rendimento global médio para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C em função da pressão.....	57
Figura 8: Cromatograma do óleo essencial de folhas de <i>E. uniflora</i> obtido por hidrodestilação.....	57
Figura 9: Cromatograma do óleo essencial de folhas de <i>E. uniflora</i> obtido por hidrodestilação.....	57
Figura 10: Compostos majoritários encontrados na extração por MEFS.....	59
Figura 11: Cromatograma do extrato obtido por microextração em fase sólida das folhas de pitangueira.....	61
Figura 12: Compostos majoritários encontrados no extrato supercrítico de folhas de pitangueira.....	64
Figura 13: Cromatograma do extrato obtido por extração supercrítica de folhas de pitangueira.....	64
Figura 14: Compostos majoritários encontrados no extrato volátil obtido por extração supercrítica de folhas de pitangueira.....	65
Figura 15: Comportamento do composto γ -elemeno para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	76
Figura 16: Comportamento do composto curzereno para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	77

Figura 17: Comportamento do composto germacreno B para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	78
Figura 18: Comportamento do composto espatulenol para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	79
Figura 19: Comportamento do composto C ₁₅ H ₂₀ O ₂ para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	80
Figura 20: Rendimento do γ -elemeno (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.....	82
Figura 21: Rendimento do germacreno D (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.....	83
Figura 22: Rendimento do curzereno (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.....	84
Figura 23: Rendimento do germacreno B (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.....	85
Figura 24: Rendimento do espatulenol (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.....	86
Figura 25: Rendimento do C ₁₅ H ₂₀ O ₂ (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.....	88
Figura 26: Curva padrão de ácido gálico.....	89
Figura 27: Curva de redução do extrato etanólico de folhas de <i>E. uniflora</i>	91
Figura 28: Trolox hidrofílico.....	93
Figura 29: Trolox lipofílico.....	93
Figura 30: Fórmula estrutural do componente γ -elemeno.....	97
Figura 31: Fórmula estrutural do componente curzereno.....	96
Figura 32: Fórmula estrutural do componente espatulenol.....	96
Figura 33: Fórmula estrutural do componente veleral.....	96
Figura 34: Fórmula estrutural do componente germacreno D.....	96
Figura 35: Fórmula estrutural do componente germacreno B.....	98
Figura 36: Estimativa da solubilidade em fração mássica do γ -elemeno para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	98

Figura 37: Estimativa da solubilidade em fração mássica do curzereno para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	100
Figura 38: Estimativa da solubilidade em fração mássica do espatulenol para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	101
Figura 39: Estimativa da solubilidade em fração mássica do veleral para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	103
Figura 40: Estimativa da solubilidade em fração mássica do germacreno D para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	104
Figura 41: Estimativa da solubilidade em fração mássica do germacreno B para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.....	106
Figura 42: Comparativo da solubilidade fração mássica dos compostos: γ -elemeno, curzereno, espatulenol, veleral, germacreno D e germacreno B em função da pressão, para a isoterma de 40 °C.....	107
Figura 43: Comparativo da solubilidade em fração mássica dos compostos: γ -elemeno, curzereno, espatulenol, veleral, germacreno D e germacreno B em função da pressão, para a isoterma de 50 °C.....	107
Figura 44: Comparativo da solubilidade da fração mássica dos compostos: γ -elemeno, curzereno, espatulenol, veleral, germacreno D e germacreno B em função da pressão, para a isoterma de 60 °C.....	108
Figura 45: Cromatograma do composto selina-1,3,7(11) – trien-8-ona.....	119
Figura 46: Espectro de massa do composto selina-1,3,7(11) – trien-8-ona.....	120
Figura 47: Espectro de massa do éster $C_{15}H_{20}O_2$	122
Figura 48: Espectro de massa do acetato $C_{17}H_{22}O_2$	123
Figura 49: Cromatograma do extrato obtido na condição de 40 °C e 100 bar.....	124
Figura 50: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 40 °C e 100 bar.	124
Figura 51: Cromatograma do extrato obtido na condição de 40 °C e 150 bar.....	125
Figura 52: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 40 °C e 150 bar.	125
Figura 53: Cromatograma do extrato obtido na condição de 40 °C e 200 bar.....	126
Figura 54: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 40 °C e 200 bar.	126
Figura 55: Cromatograma do extrato obtido na condição de 40 °C e 250 bar.....	127

Figura 56: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 40 °C e 250 bar.	127
Figura 57: Cromatograma do extrato obtido na condição de 40 °C e 300 bar.....	127
Figura 58: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 40 °C e 300 bar.	128
Figura 59: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 100 bar.....	128
Figura 60: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 100 bar.	129
Figura 61: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 150 bar.....	129
Figura 62: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 150 bar.	130
Figura 63: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 200 bar.....	130
Figura 64: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 200 bar.	131
Figura 65: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 250 bar.....	131
Figura 66: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 250 bar.	132
Figura 67: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 300 bar.....	132
Figura 68: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 300 bar.	133
Figura 69: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 100 bar.....	133
Figura 70: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 100 bar.	134
Figura 71: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 150 bar.....	134
Figura 72: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 150 bar.	135
Figura 73: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 200 bar.....	135
Figura 74: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 200 bar.	136
Figura 75: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 250 bar.....	136
Figura 76: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 250 bar.	137
Figura 77: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 300 bar.....	137
Figura 78: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 300 bar.	138

Nomenclatura e abreviações

AA = atividade antioxidante (%)

ABS_{DPPH} = Absorbância da mistura de 1000 µL de DPPH com 200 µL de etanol (nm)

ABS_{Extr.} = Absorbância da mistura de 1000 µL de DPPH com “x” µL de extrato (nm)

AUC = Area Under the Curve

b.s = base seca

BHA = butil-hidroxianisol

BHT = butil-hidroxitolueno

CG-EM = cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

CG-DIC = cromatografia gasosa acoplada ao detector de chamas

CG-O = cromatografia gasosa olfativa

D = Difusividade (cm²/sec)

da = densidade aparente (g/L)

dr = densidade real (g/L)

f = fugacidade (atm)

F.M. = Fórmula Molecular

IC₅₀ = concentração referente à inibição de 50 %

IR_i = índice de retenção do composto i;

K_{a_{ij}} e K_{b_{ij}} = parâmetros de interação binária

n = número de carbonos do alcano imediatamente anterior ao composto i

NPE = número de pontos experimentais

ORAC = capacidade de absorver radicais de oxigênio

P_c = Pressão Crítica (atm)

T_b = temperatura normal de ebulição (K)

T_c = Temperatura Crítica (°C)

T_R = Temperatura reduzida

tr_i = tempo de retenção do composto i (s)

tr_n = tempo de retenção do alcano imediatamente anterior a tr_i (s)

tr_{n+1} = tempo de retenção do alcano imediatamente posterior a tr_i (s)

USDA = United States Department of Agriculture

\underline{V} = volume molar (L/mol)

Z_c = fator de compressibilidade crítico

Letras gregas:

ε = porosidade

η = Viscosidade (poise)

ρ = Densidade (g/mL)

ρ_c = Densidade Crítica (g/mL)

ω = fator acêntrico

μ = potencial químico (joule/mol)

Resumo

Averiguado que não existe na literatura a caracterização de extratos obtidos por fluido supercrítico das folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), este trabalho visou à obtenção destes extratos variando as condições de extração supercrítica no que se refere à temperatura e pressão de 30, 40, 50 e 60 °C e 100, 150, 200, 250 e 300 bar. Verificou-se que as condições ótimas de rendimento para o processo foram as de 40 °C e 300 bar e a 60 °C, nas pressões de 250 e 300 bar, que corresponderam aos rendimentos: 3,68, 3,54 e 3,96 %, respectivamente. Os extratos das folhas obtidos por extração supercrítica, por hidrodestilação e por microextração em fase sólida foram caracterizados. Os compostos majoritários encontrados no extrato obtido por hidrodestilação foram curzereno (34,76 %), germacreno B (11,84 %) e $C_{15}H_{20}O_2$ (9,56 %). Os compostos: β -elemeno, β -cariofileno e γ -elemeno estão presentes tanto no óleo essencial das folhas como também no extrato obtido por microextração em fase sólida. O composto majoritário presente nos extratos supercríticos foi o $C_{15}H_{20}O_2$ seguido de curzereno e germacreno B. Pelo método de DPPH (1,1-difenil-2-pirilhidrazina) o extrato obtido com álcool hidratado é o que apresenta maior atividade antioxidante, visto o maior conteúdo de fenóis totais, dentre todos os extratos obtidos das folhas de *E. uniflora*. O valor da atividade antioxidante expressa em CI_{50} para o extrato etanólico das folhas de pitangueira foi 16,95 $\mu\text{g/mL}$. A modelagem termodinâmica clássica foi empregada para estimar a solubilidade dos componentes majoritários do extrato.

Palavras-chave: *Eugenia uniflora*, extração supercrítica, análise antioxidante, modelagem termodinâmica clássica.

Abstract

Examined in the literature that there is not the characterization of extracts obtained by supercritical fluid from the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Surinam cherry), this work aimed to obtain these extracts varying conditions of supercritical extraction as regards temperature and pressure of 30, 40, 50 and 60 °C and 100, 150, 200, 250 and 300 bar. It was found that the optimum operational conditions for the process were 40 °C and 300 bar and 60 °C, at pressures of 250 and 300 bar, which corresponded to yield of: 3,68; 3,54 and 3,96 %, respectively. The extracts of the leaves obtained by supercritical extraction, by hydrodistillation and by solid phase microextraction were characterized. The majority compounds found in the extract obtained by hydrodistillation were curzerene (34,76 %), germacrene B (11,84 %) and C₁₅H₂₀O₂ (9,56 %). The compounds: β-elemene, β-caryophyllene and γ-elemene are presented in the essential oil of the leaves as well in the extract obtained by solid phase microextraction. The major compound presented in supercritical extracts was C₁₅H₂₀O₂ followed by curzerene and germacrene B. By the DPPH antioxidant activity method, the extract obtained with hydrated alcohol presented the higher antioxidant activity, because the higher concentration of total phenols among all the extracts obtained of the leaves of *E. uniflora*. The value of antioxidant activity expressed in IC₅₀ for the hydrated alcohol extract of the leaves of *E. uniflora* was 16,95 g/mL. The classical thermodynamic modeling was used to estimate the solubility of major components of the extract.

Keywords: *Eugenia uniflora*, supercritical extraction, antioxidant activity, classical thermodynamic modeling.

1. Introdução

Planta nativa do Brasil, *Eugenia uniflora* L., a pitangueira, pertence à família das Mirtáceas e é uma das 14 espécies do gênero que pode ser encontrada no Brasil, no norte e nordeste argentinos, no Uruguai e no Paraguai (Consolini e Bandini, 1999).

Visto o uso extensivo e sem caráter científico das folhas de *Eugenia uniflora* L. na medicina popular, foram realizados numerosos estudos para comprovar sua possível atividade antioxidante. Foi comprovado que o extrato aquoso das folhas possui ação antiinflamatória (Weyerstahl et al., 1988; Kanazawa et al., 2000), vasodilatadora, age como anti-hipertensivo e diurético (Consolini e Bandini, 1999); abaixa os níveis de colesterol e ácido úrico do sangue (Matsumura et al., 2000; Ferro et al., 1988); atua contra febre, reumatismo (Weyerstahl et al., 1988; Kanazawa et al. 2000), é antipirético, antimaleico e inibe a ação das bactérias *Echerichia coli* e *Shigela dysenteriae*, microrganismos associados a problemas intestinais em crianças (Fadeyi e Akpan, 1989). O extrato etanólico demonstrou atividade contra hiperglicemia e hipertriglicemia, decompondo carboidratos e gorduras no intestino (Arai et al., 1999), como também foi comprovada sua ação anticarcinogênica (Lee et al., 2000) e no sistema nervoso central (Schapoval et al., 1994). O óleo essencial das folhas obtido por arraste a vapor apresentou ação em desajustes do trato intestinal (Adebajo et al., 1989a) e atividade antifúngica no tratamento de pacientes com dermatites (Lima et al., 1993); este também é considerado um digestivo, (Weyerstahl et al., 1988; Matsumura et al., 2000; Adebajo et al., 1989a) e possui atividade antimicrobiana (Matsumura et al., 2000).

Dentre os compostos majoritários que compõem o óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* L., encontram-se os furanodienos, os sesquiterpenos oxigenados (>65%) e os sesquiterpenos hidrogenados (>23 %) (Weyerstahl et al., 1988; Kanazawa et al., 2000). Também são encontrados no óleo essencial citronelol, geraniol e sesquiterpenos, que apresentam atividade antimicrobiana (Adebajo et al., 1989a). A atividade farmacológica dos extratos aquosos é atribuída à presença de monoterpenos (Schapoval et al., 1994). Já nos extratos etanólicos das folhas foram detectados os compostos epifriedelinol, friedelin, hexacosanol e β -sitosterol (Fadeyi e Akpan, 1989).

A produção de concentrados de compostos com propriedades, nutricionais e/ou terapêuticas exige muito das técnicas de separação, especialmente a de purificação, devido à rigorosa especificação dos produtos comuns nos setores alimentício, farmacêutico e cosmético, obrigando freqüentes evoluções nas técnicas de produção e purificação, visando sempre obter produtos de forma econômica e que satisfaçam às exigências de qualidade vigentes (Batistela e Wolf-Maciel, 1996).

Nas últimas décadas, os processos de separação que usam como solvente o dióxido de carbono como fluido supercrítico mereceram destaque especial, pois representam uma alternativa aos processos convencionais de separação de compostos oriundos de materiais biológicos e de interesse na área de alimentos, farmacêutica e química. O produto final obtido por este processo é isento de resíduos de solventes orgânicos, atende às restrições impostas pelos organismos de saúde e é de excelente qualidade. A decafeinação de café (Zozel, 1974) e a extração de lúpulo (Laws et al., 1980) são os exemplos mais conhecidos de aplicações comerciais em uso.

Para a otimização de processos de separação, é imprescindível dispor de uma modelagem termodinâmica que possa ser preditiva do equilíbrio de fases e também estimar a composição das fases em equilíbrio em função das condições operacionais de temperatura e pressão.

Baseado no exposto, e constatado que não existe na literatura a caracterização de extratos obtidos por fluido supercrítico das folhas de *Eugenia uniflora* L, este teve como objetivo obtê-los com dióxido de carbono supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão. Foram verificadas as condições ótimas de rendimento para o processo, os extratos foram caracterizados quanto à sua composição, a atividade antioxidante foi medida e a modelagem termodinâmica com regra de mistura clássica empregada pelo método ϕ - ϕ , usando a equação de estado de Peng-Robinson (Peng e Robinson, 1976).

2. Objetivos

2.1 *Objetivo geral*

- Obter extratos das folhas de *Eugenia uniflora* L. por extração com dióxido de carbono supercrítico, caracterizá-los quanto ao rendimento e à sua composição e modelar o equilíbrio de fases.

2.2 *Objetivos específicos*

- Obter as melhores condições operacionais de temperatura e pressão que maximizem o rendimento de extrato;
- Caracterizar a matéria-prima e os extratos quanto à sua composição e rendimento;
- Identificar os principais compostos dos extratos obtidos;
- Estimar a solubilidade dos principais compostos puros em dióxido de carbono supercrítico, em função de temperatura e pressão;
- Realizar testes que comprovem a atividade antioxidante dos extratos.

3. Revisão bibliográfica

3.1 A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

A *Eugenia uniflora* L. (a pitangueira) pertence à família Myrtaceae, é composta por mais de 100 gêneros e 3600 espécies de arbustos e árvores, verdes durante todo o ano, e é encontrada na Austrália, no Leste Asiático e nas Américas. No Brasil, *Eugenia uniflora* pode ser encontrada em Goiás, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Angely, 1965).

Schmeda-Hirschmann et al. (1987) registram a denominação “Ñangapiri” na Argentina e Paraguai; Weyerstahl et al. (1988), mencionam as denominações populares ibitanga, pitangatuba e pitanga, para os frutos de *Eugenia uniflora* L. no Brasil, e “brazil cherry” e “surinam cherry” na América de língua inglesa.

O fruto da pitangueira, bastante apreciado devido ao seu sabor agradável e refrescante, pode ser consumido sob a forma de refrescos e sucos. A polpa processada entra na composição de sucos engarrafados, sorvetes, doces, vinhos e geléias (Mélo e Lima, 2000). Suas folhas são usadas em infusões na medicina popular como anti-hipertensivo, no tratamento de desarranjos digestivos, assim como diurético e antiinflamatório (Consolini et al., 1999). Durante o processo de maturação, a cor do fruto evolui de verde à alaranjado atingindo a coloração vermelha intensa ou roxa ao apresentar-se completamente maduro (Gomes, 1975).

3.2 Composição química de *E. uniflora* L.

Em 1977, Rücker et al. isolaram vários componentes do óleo essencial de frutos de *E. uniflora* principalmente sesquiterpenos, como furanoelemento, germacreno, γ -elemento, selina-4(14),7(11)-dieno.

Wyerstahl et al. (1988) detalham a composição do óleo essencial de folhas de *E. uniflora*, obtido com rendimento de 1 %, como um óleo amarelo do qual cariofileno (5,7 %), furanodieno (24 %), germacreno B (5,8 %), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17 %) e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (14 %) são os componentes majoritários.

Morais et al. (1996) isolaram e identificaram os componentes do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* L obtido por hidrodestilação, colhidas na região Nordeste do Brasil, com rendimento de 0,74 %, do qual os componentes majoritários são selina-1,3,5(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona, com teores de 48,52 % e 17,33 % respectivamente.

A incidência dos flavonóides quercetina e miricetina é assinalada por Schmeda-Hirschmann (1995), em folhas de *Eugenia uniflora* coletadas no leste do Paraguai.

Lee et al. (1997), investigando os constituintes fenólicos de folhas de *E. uniflora*, relataram a presença de eugeniflorina D₁ (C₇₅H₅₂O₄₈) e eugeniflorina D₂ (C₆₈H₄₈O₄₅), dois taninos macrocíclicos hidrolisáveis, obtidos do extrato metanólico das folhas.

Oliveira (1999) verificou a presença de alcalóides por cromatografia em camada delgada em extratos de *Eugenia uniflora*, empregando o reativo de Dragendorff para revelação.

Maia et al. (1997) estudaram o óleo essencial de folhas e ramos de *E. uniflora* obtido por hidrodestilação, colhidos na cidade de Belém, no Pará, tendo sido obtido 1,8 % em óleo essencial, do qual o germacreno D (32,8 %), o germacreno B (15,6 %) e o curzereno (30 %) foram isolados como componentes mais abundantes.

Momose (2000) isolou das folhas de *Eugenia uniflora* as substâncias (-)-(1S,2R,6S,7R,8R,8aR)-1,2,6,7,8-pentaidroxindolizidina, (+)-(1S,2R,5R,7R,6S,8aS)-1,2,5,7,8, pentaidroxindolizidina e (+)-(3 α ,4 α ,5 β)-1- metilpiperidina-3,4,5- triol.

Theoduloz et al. (1988), avaliando espécies de Myrtaceae paraguaias quanto à inibição de 50 % da atividade da enzima xantina oxidase, e obtiveram índices de 22 μ g/mL para extrato de folhas de *E. uniflora*. Os índices obtidos para outras espécies da família, variaram de 3 a 50 μ g/mL. A ação inibitória dos padrões dos flavonóides quercitrina e miricitrina (miricetina-3-O-ramnósido), sobre a enzima xantina oxidase foi demonstrada.

Schmeda-Hirschmann (1995), também mencionou a presença de quercetina e miricitrina (miricetina-3-O-ramnósido) em folhas de *Eugenia uniflora*.

3.2.1 Farmacologia das folhas

Schmeda-Hirschmann et al. (1987), estudando a toxicidade do extrato hidroalcoólico de folhas de *E. uniflora* não verificaram toxicidade em doses até 4,2 g/kg, administradas em camundongos, por via oral.

Schapoval et al. (1994), estudando infusos (feitos de acordo com costume popular, onde as folhas secas ou não foram maceradas e as infusões preparadas na concentração de 5 %, por 15 minutos) e decoctos (preparados na concentração de 5 % com água a 100 °C, por 15 minutos) de folhas de *E. uniflora*, relataram efeito antiinflamatório com a infusão elaborada a partir de folhas, os infusos e decoctos testados mostraram ação analgésica, nas condições do ensaio. Os decoctos se revelaram mais ativos em relação à diminuição do trânsito intestinal, provavelmente, por extraírem os taninos mais eficazmente. Tanto infusos como os decoctos não exibiram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Após a administração de 3 mL de uma infusão de 16,67 g de folhas secas à temperatura ambiente em um litro de água, preparados como empregados na medicina popular, Almeida et al. (1995) constataram a diminuição da propulsão intestinal em ratos como conseqüência do aumento da densidade das fezes, causado pelo aumento de absorção de água em todas as porções do intestino. Gbolade et al. (1996) relataram a ação contrátil do extrato de acetato de etila, a partir das folhas de *E. uniflora*, sobre o duodeno isolado de rato, em comparação com acetilcolina. O óleo essencial não exibiu esta atividade, levando os autores a concluir que o extrato contém princípios anticolinérgicos, ausentes no óleo essencial.

Consolini et al. (1999), tendo em conta o uso popular de *Eugenia uniflora* como anti-hipertensiva, estudaram os efeitos da administração intraperitoneal de seu extrato aquoso bruto em ratos, nos quais observaram decréscimo dose-dependente de até 47,1 % nos níveis de pressão sanguínea. Nos estudos que se seguiram, a fim de elucidar o mecanismo desta ação, os autores concluíram que este é mediado pela vasodilatação

direta e uma fraca ação diurética que pode estar relacionada com o aumento do fluxo sanguíneo renal.

Momose (2000) atribuiu a atividade inibitória às folhas de *Eugenia uniflora* sobre as enzimas α -glicosidase, maltase e sucrase, sendo, por isso, útil no tratamento de diabetes. Os extratos obtidos por extração com água quente foram testados por via oral em camundongos e foi registrada uma significativa supressão do aumento dos níveis séricos de açúcar.

Na mesma linha de pesquisa, Matsumura et al. (2000) confirmaram a presença de componentes do extrato aquoso de folhas secas de *E. uniflora* capazes de inibir a degradação enzimática de polissacarídeos a monossacarídeos e determinaram a intensidade da inibição das α -glicosidases. O fracionamento do extrato aquoso por coluna de troca iônica levou à fração que exibiu atividades inibitória para estas enzimas, 13 ou 19 vezes maiores às anteriores.

3.2.2 Atividade antimicrobiana das folhas

Adebajo et al. (1989b), tendo por base informações anteriores de que a composição do óleo essencial de frutos e de folhas de *Eugenia uniflora* varia quali e quantitativamente, dependendo do momento da colheita, estação do ano e estágio de maturidade antes da colheita, estudaram estas variações por meio da avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e frutos de *E. uniflora*, colhidos em diferentes estágios de maturação. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi testada pelo método de difusão em placa e os resultados medidos em triplicatas. Os resultados obtidos para *Proteus vulgaris*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Trichophyton menthagrophytes* foram diversos para amostras colhidas em diferentes períodos do dia e em diferentes épocas do ano, indicando uma variação na composição do óleo das diferentes amostras. Comentam os autores que estas diferenças devem ser consideradas na otimização da atividade antimicrobiana de *E. uniflora*. A maioria das amostras foi inativa contra *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* e *Yersinia enterocolitica*. *Pseudomonas aeruginosa* foi a bactéria mais susceptível, enquanto *T. menthagrophytes* foi o fungo mais susceptível.

3.3 Processo de extração com fluido supercrítico

3.3.1 O fluido supercrítico

Obtemos um fluido supercrítico quando elevamos uma substância (líquido ou gás) a condições acima de seus pontos críticos de temperatura e pressão. É um estado intermediário em que o fluido se encontra, entre o líquido e o gás. A temperatura crítica de um gás é aquela temperatura acima da qual o gás não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve a pressão. Na região supercrítica somente uma fase existe, o fluido supercrítico (Bott, 1982).

Quando um composto é confinado em um espaço determinado, a fase líquida e seu vapor coexistem em equilíbrio. Aquecendo-se o sistema, as propriedades intensivas convergem até serem idênticas no ponto crítico (por exemplo: densidade, viscosidade, condutividade térmica e outros). O ponto crítico marca a temperatura mais alta de coexistência de duas fases. Na Tabela 1 são listados os parâmetros críticos de alguns fluidos e na Tabela 2 é mostrada uma comparação entre as propriedades físico químicas de maior interesse para visualizar a potencialidade da técnica de extração com fluido supercrítico (Lewis, 1961).

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos de alguns compostos.

Fluído	F.M.	Tc (°C)	Pc (atm)	Pc (g/mL)
Dióxido de carbono	CO ₂	31,3	72,9	0,47
Óxido Nitroso	N ₂ O	36,5	71,7	0,45
n-Pentano	C ₅ H ₁₂	196,6	33,3	0,23
Hexafluoreto de enxofre	SF ₆	45,5	37,1	0,74
Xenônio	Xe	16,6	58,4	1,10
Metanol	CH ₃ OH	204,5	78,9	0,27
Isopropanol	C ₃ H ₇ OH	235,3	47,0	0,27

F.M. = Fórmula Molecular, Tc = Temperatura Crítica, Pc = Pressão Crítica e pc = Densidade crítica

Tabela 2: Propriedades físicas de gás, líquido e fluido supercrítico.

Propriedade	Unidades	Gás	Líquido	Fluido Supercrítico
Densidade (ρ)	g/mL	$10^{-4}/10^{-3}$	≈ 1	0,2/0,9
Difusividade (D)	cm ² /sec	$10^{-2}/1$	$<10^{-5}$	$10^{-4}/10^{-3}$
Viscosidade (η)	poise	$\approx 10^{-4}$	10^{-2}	$10^{-4}/10^{-3}$

De acordo com Bott (1982), ocorre um rápido e significativo aumento na densidade da substância somente acima da sua temperatura crítica, entretanto, para altos valores de T_r (temperatura reduzida), é necessária uma variação considerável de pressão para que se produza mudança substancial na densidade. E como, das propriedades de transporte, a densidade é o principal parâmetro de interesse nos processos de separação, é interessante selecionar temperaturas e pressões apropriadas para que os processos de extração não sejam realizados empiricamente.

A Figura 1 ilustra mostra que pressão, temperatura e densidade estão totalmente relacionadas entre si, e a escolha da faixa de operação escolhida para a realização dos experimentos é fundamental a extração dos componentes de interesse (Giddings et al., 1968).

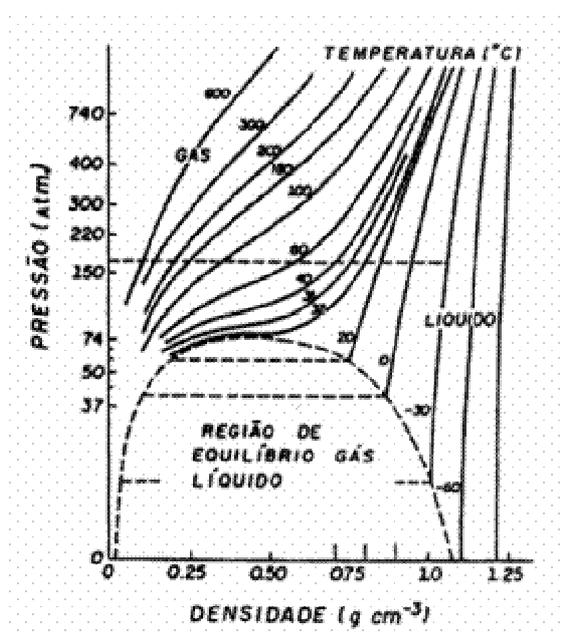


Figura 1: Dependência da densidade de CO₂ com a pressão e temperatura.

3.3.2 O princípio do processo

No processo de extração supercrítica em matrizes sólidas, o fluido supercrítico escoava através do leito fixo (de partículas sólidas) e solubiliza os compostos existentes na matriz, sendo o solvente alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. Durante a extração, a matriz sólida absorve o solvente supercrítico, dilatando a estrutura da célula, promovendo uma diminuição na resistência à transferência de massa, os compostos extraíveis são dissolvidos pelo solvente e transferidos por difusão para a superfície externa da matriz, em seguida, transportados pelo fluido, estes compostos podem mudar seu estado de agregação. Os compostos assim extraídos são removidos do extrator pelo escoamento do solvente (Brunner, 1994).

3.3.3 O CO₂ como fluido supercrítico

Através de uma gama de solventes que podem ser utilizados como fluidos supercríticos nas extrações, alguns se encontram em condições razoáveis de aceitação, mas não são adotados, pois em muitos casos requerem manuseio especial. O resultado é que o dióxido de carbono tornou-se popular pelo seu baixo custo, confiabilidade e segurança, não deixando traços no produto nem tampouco nas colunas e capilares dos equipamentos (Smith, 1999). O CO₂ é o fluido mais utilizado em extração supercrítica por ser de fácil manipulação, possuir temperatura e pressão crítica de 31,1 °C e 73,8 bar, respectivamente, ser um bom solvente e ser miscível em outros solventes, não ser tóxico, ser inerte, não inflamável, não corrosivo e ter custo moderado. O dióxido de carbono é um fluido de baixa polaridade, sendo assim inviável sua aplicação em compostos mais polares, mas a adição de um solvente polar pode agir significativamente e favorecer a extração de compostos com esta característica (Staub, 1997).

A extração dos princípios ativos é um processo fundamental para a indústria, pois permite a separação dos compostos que interessam nos materiais brutos para a produção de alimentos, cosméticos e medicamentos, por exemplo. Os solventes orgânicos são tóxicos em sua totalidade e causam danos, principalmente no momento de sua eliminação, após terem sido utilizados.

3.4 Atividade antioxidante

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais. (Atoui et al., 2005; Barreiros et al.2006).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis (Omoni e Aluko, 2005).

Oxidantes também são produzidos pelo metabolismo normal do corpo e se não controlados podem provocar danos extensivos. O *stress* oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas e Alzheimer, bem como está envolvido no processo de envelhecimento (Christen, 2000; Lang e Lozano,1998). O balanço entre o *stress* oxidativo e as funções antioxidantes dos organismos vivos parece ter um papel na carcinogênese (Weisburger,1999; Wettasinghe et al., 2002). Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos (Shahid, 1996). Desta forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos (Jayaprakasha e Jaganmohan Rao, 2000). Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis. Antioxidantes fenólicos são antioxidantes primários que agem como terminais para os radicais livres (Xing e White, 1996).

Um dos principais problemas na conservação dos alimentos lipídicos é o desencadeamento do processo oxidativo, que resulta na produção de odores e sabores desagradáveis, tornando os alimentos inadequados para o consumo. Como resultado da

reação entre o oxigênio e os ácidos graxos insaturados ocorre a formação de compostos de baixo peso molecular, os quais são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de odores indesejáveis. Como exemplo, o hexanal, produto da oxidação do ácido linoleico é um composto que está relacionado ao sabor de ranço dos alimentos; a quantidade de 2×10^{-6} % desta substância já é suficiente para que ocorra a presença de odores característicos da rancidez (Krinsky, 1989).

As reações oxidativas levam à diminuição do valor nutricional, pois os ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico) são os primeiros a serem oxidados, produzindo diversos compostos como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos que são potencialmente tóxicos (Spatz, 1994).

A vitamina E é a designação dada a um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis, entre os quais o α -tocoferol é a forma mais ativa. É encontrada em lipoproteínas e membranas, atuando no bloqueio da reação em cadeia da peroxidação lipídica, através do seqüestro do radical peroxila. A vitamina C tem muitas funções fisiológicas, entre elas, o alto poder antioxidante de reciclar a vitamina E no processo de peroxidação lipídica das membranas e lipoproteínas (Haslam, 2006). Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles.

3.4.1 Compostos fenólicos como antioxidantes

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Naczki e Shahidi, 2004).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (Soares, 2002). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na

neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Soares, 2002; Chun et al., 2005).

Embora as evidências sejam claras sobre a ação *in vitro* dos fenóis e polifenóis com espécies reativas de oxigênio, eles podem, em algumas circunstâncias, tal como o ascorbato e os carotenóides, mostrarem características pró-oxidantes (Haslam, 1996).

Antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT) são normalmente utilizados nas indústrias de óleos e de derivados lipídicos. Entretanto, estes compostos podem apresentar alguns inconvenientes; estudos têm demonstrado que essas substâncias podem causar efeitos adversos em animais, como por exemplo, hemorragia massiva nas cavidades pleurais e peritoneais (Takahashi e Hiraga, 1978) ou extensa proliferação de células no pulmão, com mudanças bioquímicas, atuando como agente promotor no desenvolvimento de adenoma (Witschi e Lock, 1978).

Devido a estes inconvenientes, nos últimos anos tem havido a preocupação na obtenção de substâncias naturais que tenham a mesma função e eficiência dos antioxidantes sintéticos.

3.4.2 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

3.4.2.1 Método de Folin Ciocalteu

Métodos para a medida do conteúdo de fenóis totais e determinação da capacidade antioxidante são geralmente baseados na possibilidade dos compostos fenólicos agirem como agentes redutores e fornecedores de hidrogênio ou elétron (Huang et al., 2005).

O método Folin Ciocalteu é comumente utilizado na determinação de componentes fenólicos em extratos de plantas e sucos (Stratil, et al., 2007). Ele é baseado na redução dos reagentes pelos componentes fenólicos presentes nas amostras,

até a formação concomitante de um complexo com coloração azul, cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm (Stratil et al., 2006; Roesler et al., 2007). O reagente de Folin Ciocalteu figura entre as quantificações espectrométricas de compostos fenólicos mais extensivamente utilizadas (Naczk e Shahidi, 2004; Bonoli et al., 2004; Hou et al., 2003; Roginsky e Lissi, 2005).

O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (Naczk e Shahidi, 2004; Ikawa et al., 2003).

3.4.2.2 Método do DPPH

O teste DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um dos mais antigos e mais frequentemente usados para a determinação da capacidade antioxidante em extratos de alimentos. (Stratil et al., 2006).

Ele é baseado na habilidade do antioxidante de doar um radical hidrogênio para o composto sintético nitrogenado DPPH (reações abaixo descrevem este processo). (Stratil et al., 2006).



A mudança gradual na coloração violeta até amarelo, e a diminuição na absorbância a 517 nm pode ser monitorada durante a reação. O método DPPH é usualmente interpretado de forma dependente da concentração de antioxidante

necessária para diminuir a concentração inicial do radical DPPH, logo há uma dependência da concentração inicial de DPPH (Stratil et al., 2006).

O decaimento na absorbância do DPPH quando este está na presença de um antioxidante é sinal que está ocorrendo a transferência do átomo de hidrogênio e isso pode ser visualizado com a mudança da cor de violeta para amarelo, e quanto mais forte for a capacidade antioxidante da amostra, mais amarelada ficará a solução (Sun et al., 2007).

A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (Souza et al., 2007).

3.4.2.3 Método ORAC

O método ORAC (capacidade de absorver radicais de oxigênio) é utilizado pelo USDA (United States Department of Agriculture) para selecionar alimentos com grande poder antioxidante, sendo conhecido como valor ORAC. Estes alimentos são destacados por apresentar proteção antioxidante *in vivo* para os consumidores. Este método está sendo utilizado por permitir uma medida global do poder antioxidante de substâncias puras e misturas como em frutas e extratos de plantas. O teste ORAC é realizado em espectrofotômetro e consiste na medida da proteção exercida pelas moléculas contra a oxidação da fluoresceína pelo radical livre AAPH (2,2' – azobis 2 – amidino – propano diidroclorido). Os resultados são dados referentes à proteção exercida por um composto de referência, o Trolox (Ou et al., 2002).

O ensaio ORAC foi desenvolvido inicialmente por Cao et al., (1993) e melhorado significativamente por Ou et al. (2002). No ensaio modificado, a fluoresceína substituiu a ficoeritrina por ser muito mais estável durante o mesmo período de tempo (Cao et al., 1993). A complexidade experimental e as limitações de se monitorar a cinética da reação de auto-oxidação dos lipídeos conduziram ao desenvolvimento do ORAC. (Zhou e Yu, 2004). Este ensaio fluorimétrico leva em consideração a etapa de propagação, que é

essencial na auto-oxidação lipídica. O experimento utiliza um radical térmico para dar um fluxo constante de radicais peróxidos na solução. O antioxidante adicionado inibe ou retarda a oxidação. O ORAC tem os seguintes componentes: (Huang et al., 2005):

- (a) iniciador (radical azo), AAPH;
- (b) fluoresceína, para monitorar o progresso da reação;
- (c) antioxidante;
- (d) parâmetros cinéticos da reação coletados durante certo período de tempo, utilizados na quantificação da capacidade antioxidante.

Na solução saturada com oxigênio, o radical gerado AAPH reage rapidamente com o gás oxigênio para gerar radical peróxido mais estável. A diminuição da fluorescência da fluoresceína é um indicativo de extensão dos danos provindos da reação com o radical peróxido. Na presença do antioxidante, o radical peróxido abstrai um átomo de hidrogênio do antioxidante para formar hidroperóxido e um radical antioxidante estável é formado e os danos para a fluoresceína induzida pelo radical peróxido são inibidos (Ou et al., 2002).

O efeito protetor de um antioxidante é medido pela área de decaimento da fluorescência (AUC – “Area Under the Curve”) da amostra comparada com a área do branco, em que não há presença de antioxidantes (Ou et al., 2002). A presença dos antioxidantes resulta na inibição dos danos causados pelos radicais livres ao composto fluorescente (Wu et al., 2004).

A maioria das amostras não é afetada pela decomposição térmica do AAPH, e o AAPH não reage diretamente com a amostra. Como resultado, o ensaio ORAC mede diretamente a atividade antioxidante contra os radicais peróxidos (Ou et al., 2002).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos complexos compostas de unidades de glicose unidas por ligações tipo α -1,4. Pela geometria da molécula, e cavidade interna relativamente hidrofóbica, em contraste com a característica hidrofílica das hidroxilas presentes na parte externa da molécula, as ciclodextrinas formam facilmente complexos com uma grande variedade de moléculas e íons moleculares (Bangalore et al., 2005; Ficarra et al., 2002). Estes complexos foram utilizados para aumentar a solubilidade da fração lipídica dos extratos nos ensaios de ORAC lipofílico.

3.5 Modelagem termodinâmica

A modelagem termodinâmica consiste em usar uma equação de estado com regra de mistura apropriada para calcular a fugacidade dos componentes no equilíbrio e com isso descrever o comportamento da solubilidade dos componentes puros e prever o comportamento da solubilidade da mistura multicomponente, a qual será composta pelos principais componentes do extrato, aqueles em maior concentração, visando representar o comportamento da solubilidade do extrato como um todo.

3.5.1 Critérios para o equilíbrio de fases

Para que um sistema se encontre em equilíbrio, o potencial químico de cada componente (i) deve possuir o mesmo valor em todas as fases do sistema:

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^\beta = \mu_i^\delta \quad [1]$$

Onde : α , β , δ são as fases do sistema.

Outros dois critérios de equilíbrio, além do equilíbrio químico, para um sistema composto por “n” componentes são: equilíbrio térmico ($T^\alpha = T^\beta = \dots = T^\pi$), equilíbrio mecânico ($P^\alpha = P^\beta = \dots = P^\pi$) além de também ser expresso em termos da igualdade da fugacidade dos componentes nas diversas fases $f_i^\alpha = f_i^\beta = \dots = f_i^\delta$, para $i = 1, 2, \dots, n$).

No tratamento termodinâmico, dois métodos distintos são comumente empregados para cálculo do equilíbrio de fases: 1) Método γ - ϕ que faz um tratamento distinto entre a fase líquida e a fase vapor. Emprega modelos para cálculo do coeficiente de atividade (γ_i) na fase líquida e, de maneira diferente, calcula-se o coeficiente de fugacidade (ϕ_i) na fase vapor. Normalmente é aplicado a sistemas em condições de pressão ao redor da atmosférica. 2) Método ϕ - ϕ que calcula coeficientes de fugacidade dos componentes de uma mistura por intermédio de uma única equação de estado que pode representar as propriedades PVT de qualquer fase fluida (líquidos, gases e fluidos supercríticos). É muito empregado a pressões elevadas, nas quais o método γ - ϕ não é adequado. Necessita de

parâmetros de interação binária entre os pares de componentes que compõem o sistema em equilíbrio, sendo obtidos a partir de dados experimentais de sistemas binários de equilíbrio e estes sendo usados na mistura multicomponente.

No método ϕ - ϕ , uma equação cúbica de estado pode ser usada para representar o comportamento e as não idealidades de ambas as fases em equilíbrio. A principal vantagem desta abordagem consiste na representação uniforme do equilíbrio de fases, sem usar estados hipotéticos de referência. Este método pode ser aplicado a uma ampla faixa de pressões e temperaturas, incluindo condições críticas e supercríticas.

Pelo método ϕ - ϕ , as duas fases do sistema são representadas pelos coeficientes de fugacidade:

$$\hat{f}_i^L = \hat{\phi}_i^L x_i P \quad [2]$$

$$\hat{f}_i^V = \hat{\phi}_i^V y_i P \quad [3]$$

No equilíbrio: $\hat{f}_i^L = \hat{f}_i^V$

Então:

$$\hat{\phi}_i^L x_i = \hat{\phi}_i^V y_i \quad [4]$$

A aplicação do método requer uma equação de estado que possa representar adequadamente as duas fases, como função da temperatura, pressão e composição química. As equações cúbicas de estado são particularmente interessantes pela sua simplicidade, além disso, as raízes têm solução analítica e os parâmetros da equação possuem um significado físico. O cálculo dos coeficientes de fugacidade para ambas as fases, usando uma equação cúbica de estado, pode ser realizado através da equação [5]:

$$\ln \phi = \ln \left(\frac{f_i}{x_i P} \right) = \left(\frac{1}{RT} \right) \int (\bar{V}_i - V^d) dP \quad [5]$$

Onde:

ϕ = coeficiente de fugacidade

x_i = fração molar do componente i na mistura

\bar{V}_i = volume parcial molar do componente i na mistura

$V^d = \left(\frac{RT}{P}\right)$ = volume molar de gás ideal

O volume parcial molar (\bar{V}_i) para uma mistura multicomponente com volume molar da mistura V_m pode ser escrito como na equação [6]:

$$\bar{V}_i = \left(\frac{\partial V_m}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_{j \neq i}} = V_m + \left(\frac{\partial V_m}{\partial x_i}\right)_{T,P,n_{j \neq i}} - \sum_{j=1}^k x_j \left(\frac{\partial V_m}{\partial x_j}\right)_{T,P,x_{i \neq j}} \quad [6]$$

$$\text{Onde } V_m = \sum_{i=1}^n x_i \bar{V}_i = f(T, P, x_1, \dots, x_k)$$

Para estimar o valor de \bar{V}_i uma equação de estado pode ser empregada e com isso calcula-se o valor de coeficiente de fugacidade ϕ_i .

3.5.2 Emprego das equações de estado cúbicas para o cálculo do equilíbrio de fases

As equações de estado cúbicas são usadas na simulação e no cálculo do equilíbrio de fases e têm sido aplicadas com sucesso para a representação de propriedades de compostos puros e misturas, em razão de apresentar uma descrição consistente do equilíbrio de fases tanto as altas quanto a baixas pressões.

van der Waals em 1873, propôs a primeira equação cúbica de estado (EDE) introduzindo o conceito de que a pressão é proveniente de duas contribuições; uma de caráter repulsivo e outra de caráter atrativo. Entretanto, esta equação não é muito precisa e sua importância provem principalmente em razão de ser a primeira equação de estado capaz de prever a transição entre a fase vapor e líquida e por apresentar os principais elementos que caracterizariam a posterior evolução das equações de estado cúbicas:

$$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a}{V^2} \quad [7]$$

Onde: a e b são constantes positivas, características de cada substância em particular.

O termo em a/V^2 leva em conta as forças de atração entre as moléculas, que torna a pressão mais baixa do que a exercida por um gás ideal. Analogamente, a constante b leva em conta a dimensão das moléculas, que torna o volume maior que de um gás ideal. Quando as constantes a e b são nulas, a equação se reduz à equação do gás ideal.

van der Waals em 1890, estendeu a uso das equações de estado cúbicas para o cálculo do equilíbrio de fases, considerando a misturas de componentes como sendo pseudocomponentes puros nas mesmas condições de temperatura e pressão.

A partir da equação de van der Waals, diversas equações cúbicas de estado têm sido apresentadas na literatura para a descrição do equilíbrio de fases. A maioria dos estudos para melhorar a representação das propriedades termodinâmicas através das equações cúbicas de estado está baseada nas seguintes modificações:

- forma funcional (termo atrativo ou repulsivo);
- dependência com a temperatura do parâmetro a do termo atrativo;
- regras de mistura.

O emprego de equações de estado cúbicas para o cálculo do equilíbrio de fases ganhou grande aplicação graças à precisão alcançada com as modificações propostas no termo atrativo por Redlich e Kwong (1949), Soave - Redlich e Kwong (1972) e Peng e Robinson (1976).

Redlich e Kwong (1949) propuseram a primeira equação de estado cúbica com alta aceitabilidade como ferramenta para cálculos de fugacidade de fluidos não polares. Entretanto, a primeira fórmula que expressa a dependência do parâmetro “ a ” com a temperatura, que obteve maior divulgação, foi a simplificação proposta por Soave (1972).

Soave (1972) fez com que a equação reproduzisse pressões de vapor para substâncias não polares para $T_R = 0,7$; correlacionando o parâmetro “ a ” com a

temperatura e o fator acêntrico (ω). A equação de estado Soave - Redlich e Kwong com dois parâmetros foi escrita como:

$$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a(T)}{V(V+b)} \quad [8]$$

$$a = 0,427447 \frac{R^2 T_c^2}{P_c} \quad [9]$$

$$b = 0,08664 \frac{RT_c}{P_c} \quad [10]$$

$$a(T) = a(T_c) \cdot \alpha(T_r, \omega) \quad [11]$$

$$Z_c = 1/3 \quad [12]$$

Peng e Robinsom (1976) modificaram o termo de atração, escrevendo a equação de estado com $Z_c = 0,307$, pois comparando valores observados experimentalmente notaram que o fator de compressibilidade no ponto crítico da equação de estado de Peng e Robinsom e Soave - Redlich e Kwong eram superestimados. A equação de estado de Peng e Robinsom manteve as mesmas características da equação de estado de Soave - Redlich e Kwong, na forma:

$$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a(T)}{V(V+b) + b(V-b)} \quad [13]$$

$$b = 0,0778 \frac{RT_c}{P_c} \quad [14]$$

$$a(T_c) = 0,45724 \frac{R^2 T_c^2}{P_c} \quad [15]$$

$$a(T) = a(T_c) \cdot \alpha(T_r, \omega) \quad [16]$$

$$Z_c = 0,307 \quad [17]$$

$$\alpha^{\frac{1}{2}} = 1 + K_m \left(1 - T_R^{\frac{1}{2}} \right) \quad [18]$$

$$K_m = 0,37464 + 1,54226\omega - 0,26992\omega^2 \quad [19]$$

Onde os dois parâmetros $a(T)$ e b são relacionados às forças de atração intermolecular e volume das moléculas, \underline{V} é volume molar, α é uma função da temperatura usada para corrigir o parâmetro $a(T_c)$, e K_m é uma função do fator acêntrico ω .

A equação de estado de Peng e Robinsom e Soave - Redlich e Kwong são amplamente utilizadas para prever o equilíbrio líquido-vapor de misturas de componentes apolares, no entanto por considerar um fator de compressibilidade universal para todos os componentes, as predições de propriedades tais como densidade de líquidos são relativamente pobres, e os piores valores são encontrados para líquidos próximos do ponto crítico.

O método mais amplamente usado para estender o uso das equações de estado para misturas de componentes é adotar a mistura como sendo um pseudocomponente puro nas mesmas condições de temperatura e pressão, como proposto por van der Waals, em 1890. As constantes médias características da composição da mistura são obtidas, a partir de uma regra de mistura clássica relacionada às constantes dos componentes puros na forma de uma função quadrática em fração molar:

$$a_m = \sum_i \sum_j a_{ij} x_i x_j \quad [20]$$

$$a_{ij} = \sqrt{a_{ii} a_{jj}} \cdot (1 - K_{a_{ij}}) \quad [21]$$

$$b_m = \sum_i \sum_j b_{ij} x_i x_j \quad [22]$$

$$b_{ij} = (1 - K_{b_{ij}}) \left(\frac{b_{ii} + b_{jj}}{2} \right) \quad [23]$$

Onde:

$K_{a_{ij}}$ e $K_{b_{ij}}$ = parâmetros de interação binária

$a_{ii} = a_i =$ parâmetro $a(T)$ do componente (i)

4. Material e Métodos

4.1 Matéria - Prima vegetal/ Produtos químicos diversos

Foram utilizadas folhas de *Eugenia uniflora* L., secas à temperatura ambiente, que foram cultivadas e fornecidas pelo “Clube da Semente” (Olhos d’Água, Goiás, Brasil) em abril de 2004.

As partículas das folhas selecionadas foram acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno e armazenadas em freezer doméstico (Cônsul, Modelo 220, São Paulo, Brasil), em temperatura inferior a -5 °C, para uso nos experimentos.

Dióxido de carbono, pureza 99 %, White Martins (Campinas, SP, Brasil); Solventes e produtos químicos para análises químicas (caracterização das frações do equilíbrio de fases e dos extratos) foram de grau analítico.

4.1.1 Moagem e granulometria do material

As folhas secas foram trituradas em moinho elétrico de facas (Tecnal, modelo TE 631/1, Piracicaba, São Paulo, Brasil) na velocidade de 14000 rpm durante 12 segundos. As folhas moídas foram introduzidas num jogo de peneiras da série padrão Tyler de tamanhos 9 a 48 meshes. A distribuição granulométrica foi realizada com o auxílio de um agitador mecânico de peneiras (Bertel, série 01.05, Caieiras, São Paulo, Brasil). As massas retidas sobre cada peneira foram pesadas em balança semi-analítica (Marte, modelo AS 5500C, São Paulo, Brasil).

Todas as partículas de tamanho de 9 a 48 meshes foram utilizadas nos ensaios. Isto se justifica porque neste trabalho não foi pretendida a uniformidade das partículas no leite do extrator, mas sim o conhecimento do diâmetro geométrico médio das mesmas.

Na determinação do diâmetro médio das partículas foi utilizada a metodologia para cálculo do diâmetro médio geométrico de acordo com o método ASAE S319.3, recomendado pela ASAE Standards (1997) através da equação [24].

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (m_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n m_i} \right] \quad [24]$$

Onde:

$\bar{d}_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$, d_i : abertura nominal da i -ésima peneira (mm); d_{i+1} : abertura nominal da peneira maior que a i -ésima peneira (mm); m_i : massa do material retido na i -ésima peneira.

4.1.2 Determinação da umidade

Para determinação da umidade da amostra foi utilizado um método que é aplicado quando se deseja distinguir água do material volátil (destilação de solvente imiscível), descrito por Jacobs (1973). Este método é indicado para matérias-primas que contêm material volátil

O equipamento utilizado para essa determinação consta de um condensador, um tubo coletor graduado que recebe a água evaporada da amostra, uma manta de aquecimento e um balão de 250 mL. Para o experimento, foram utilizados 10 g das folhas imersas em 100 mL de xilol (Ecibra, Lote 15860, Santo Amaro, São Paulo, Brasil). Conectou-se o tubo coletor graduado ao condensador e ao balão, ligou-se a manta de aquecimento e iniciou-se o refluxo até o esgotamento de água, por 5 horas. A umidade da amostra foi calculada pela equação [25] e a análise realizada em triplicata.

$$U = 100 * \left(\frac{V_{H2O} \cdot \rho_{H2O}}{m_{(amostra)}} \right) \quad [25]$$

Onde:

U é umidade;

V_{H_2O} é o volume de água extraída da amostra;

ρ_{H_2O} é a densidade da água;

$m_{(amostra)}$ é a massa da amostra.

4.1.3 Determinação da densidade real das partículas

A densidade real das partículas foi determinada pela Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp, utilizando-se a técnica de picnometria em gás hélio, com picnômetro gasoso Multivolume Picnometer 1305. Este equipamento utiliza o gás hélio para medir o volume e a densidade real das partículas sólidas através da técnica de deslocamento de gás. Foram feitas duas determinações de uma amostra representativa das folhas moídas de *E. uniflora*.

4.1.4 Cálculo da densidade aparente e da porosidade do leito

A densidade aparente foi calculada usando-se o volume total da célula de extração e a massa total de folhas de *E. uniflora* necessária para empacotá-la. A coluna de extração do sistema consiste de um cilindro de aço inox com 100 cm³ de volume total. A porosidade do leito foi calculada através da equação [26]. A porosidade do leito é um dos parâmetros mais importantes para a caracterização de estruturas de materiais secos.

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad [26]$$

Onde:

d_a = densidade aparente

d_r = densidade real

4.2 Métodos de obtenção de extrato de folhas de *E. uniflora*

4.2.1 Extração com solvente orgânico – Extrato etéreo

A análise do extrato etéreo foi realizada segundo método da A.O.A.C. (1997), que visa determinar substâncias solúveis em éter de petróleo.

Na extração com solvente orgânico utilizou-se um aparelho Soxhlet de 500 mL. Adicionou-se cerca de 3,0 g das folhas e éter de petróleo (Mallinckrodt, Lote Y49755, Paris, França) até que a altura do cartucho que continha as folhas fosse alcançada. O sistema foi mantido em refluxo durante 16 horas. Evaporou-se o solvente remanescente em estufa (Fanem, Modelo 315 SE, Guarulhos, São Paulo), até peso constante ($\pm 0,01$ g), os resultados foram expressos em relação à massa da amostra inicial.

4.2.2 A extração a baixa pressão com etanol

A extração a baixa pressão com etanol foi realizada com folhas de *E. uniflora* colocando 0,5 g de matéria-prima seca com 4 mL de etanol (Ecibra, lote 17.136, Santo Amaro, São Paulo) em frascos de 10 mL. Segundo o método de Pesek et al (1985), os frascos foram centrifugados durante 5 minutos a 2000 rpm (Jouan, modelo BR4i, St Herblain, França), depois mantidos em repouso por 30 minutos. O material foi filtrado à vácuo e o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador (Laborota, modelo 4001, Vitrieb, Alemanha) a 40 °C e 150 mbar.

4.2.3 Hidrodestilação

O óleo volátil foi obtido por hidrodestilação, seguindo o método da A.O.A.C. 962.17 (1995). Foram pesados 50 g de folhas de *E. uniflora* (com partículas de tamanhos 24, 32 e 48 mesh, em partes iguais). A amostra das folhas foi inserida em um balão de 1000 mL,

seguido da adição de água destilada até cobrir completamente a matéria-prima. Conectou-se o tubo coletor graduado a um condensador e ao balão, ligou-se a manta de aquecimento e iniciou-se a destilação lentamente. Após duas horas do início da destilação, observou-se que não havia alteração no volume de extrato na parte inferior do tubo coletor graduado. O óleo volátil foi então armazenado em frasco de vidro âmbar (5 mL) e acondicionado em freezer doméstico (-5 °C) até análise da composição química.

4.2.4 Extração supercrítica

4.2.4.1 Testes preliminares

Foram realizados experimentos na unidade extratora, a fim de verificar a reprodutibilidade dos dados. As condições selecionadas para essa etapa foram: P = 200 bar, T = 40 °C, $Q_{CO_2} = 14$ mL/s (a 0,93 bar e T ambiente) e quatro razões mássicas de leite ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ e leite cheio). Foram avaliados os rendimentos globais de cada razão. Esta análise foi realizada em duplicata.

4.2.4.2 Experimentos

As condições operacionais elegidas para a realização dos experimentos foram de 30 a 60 °C e de 100 a 350 bar. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a formação do leite, a amostra foi acomodada uniformemente na saída do extrator, o restante da célula de extração foi preenchida com esferas de vidro (leite inerte) de mesh 6. O dióxido de carbono, alimentado pela entrada do extrator, passou inicialmente pelo leite inerte e posteriormente pela matriz vegetal.

Para capturar os voláteis arrastados pelo CO₂ durante as extrações, foram utilizadas colunas de vidro (8×10^{-3} m de diâmetro) empacotadas com adsorvente Porapak-Q de mesh 80 a 100 (Supelco, Lote 132, Bellefonte, Pensilvânia, EUA). As colunas foram instaladas na saída do frasco coletor.

4.3 Equipamentos e instrumentos

4.3.1 Sistema experimental para a medida da solubilidade e para as extrações com fluido supercrítico

A Figura 2 mostra de forma esquemática o sistema que foi empregado na extração. Este sistema consta de um cilindro sifonado de CO₂ (1), banho de refrigeração (2), bomba de alta pressão (3), tanque pulmão (4), manômetros tipo Bourdon (6 e 8), extrator (9), coletor de extrato (13), bomba peristáltica (17); trap de Porapak-Q (14), medidor digital de vazão (15), totalizador de vazão (16) e válvulas (4,7,10,11,12).

O sistema de extração foi mantido sob temperatura controlada por um banho termostático (18), que se mantinha aquecido por uma resistência elétrica.

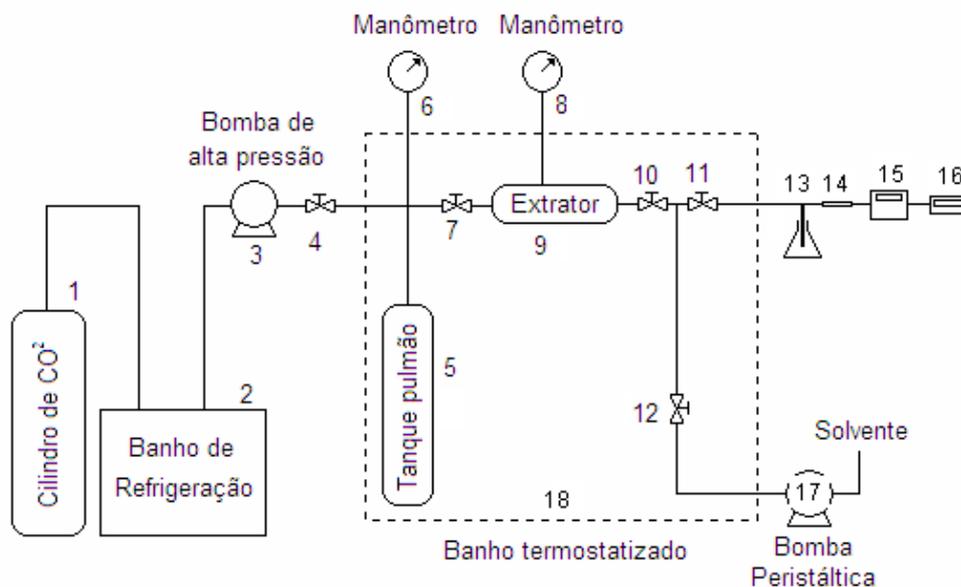


Figura 2: Sistema experimental (Método dinâmico) para extração.

4.3.1.1 *Procedimento experimental para extração*

Os procedimentos experimentais descritos a seguir podem melhor compreendidos quando visualiza-se a Figura 2.

- 1) Inseriu-se a amostra no extrator (9);
- 2) Encheu-se de água o banho termostático (18) e ajustou-se a temperatura;
- 3) Ligou-se o banho de refrigeração (2);
- 4) Atingida a temperatura operacional, ligou-se a bomba de alta pressão (3). A pressurização se deu primeiro no tanque pulmão (5) e depois no extrator (9);
- 5) Alcançada a pressão operacional no extrator (9), aguardou-se o tempo de equilíbrio termodinâmico estipulado previamente para o experimento, e depois disso deu-se início à extração;
- 6) Escoou-se CO₂ continuamente pelo leito de extração até retirada total dos solutos de interesse;
- 7) Após o tempo pré-estabelecido de extração, recolheu-se a amostra (13);
- 8) Uma lavagem da linha com solvente foi enfim realizada utilizando a bomba peristáltica (17) com a finalidade de recuperar massa de extrato ainda remanescente no sistema de extração;
- 9) As amostras foram fechadas, lacradas e mantidas sob refrigeração (-5 °C). Estas amostras foram denominadas extratos supercríticos (EXT).

O CO₂ no estado gasoso que deixa o coletor (13) é conduzido a um trap (14) com a finalidade de capturar os compostos voláteis extraídos, estes extratos foram denominados extratos voláteis (VOL). Finalmente, o CO₂ é conduzido a um medidor de vazão (15) e a um totalizador (16) com a finalidade de quantificar o volume de dióxido de carbono usado na extração.

4.3.2 Análises cromatográficas

Os extratos obtidos via extração supercrítica, hidrosdestilação e microextração por fase sólida foram submetidos a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) para análise qualitativa de seus constituintes; estas análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Posteriormente, foi empregada a cromatografia gasosa com detector por ionização de chamas (CG-DIC) para a análise quantitativa dos extratos obtidos via extração supercrítica nas diferentes condições operacionais; estas análises foram realizadas no Instituto de Química da Unicamp.

4.3.2.1 Condições de análise CG-EM

O cromatógrafo gasoso usado foi um Shimatzu CG17A, acoplado a um espectrômetro de massas tipo quadrupolo (QP5000, Shimatzu), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida BD-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, J&W Scientific, Folson, EUA). O gás de arraste foi o hélio (White Martins, 99,9%, Campinas, São Paulo) com vazão de 1,0 mL/min. Quatro miligramas de cada amostra do extrato – EXT foram diluídos em 1 mL de acetato de etila (PA, Ecibra, lote 16285, Santo Amaro, São Paulo). No caso do extrato adsorvido em Porapak-Q - VOL, o extrato também foi dissolvido usando acetato de etila. O solvente foi aplicado em uma das bases da coluna. O volume que permitiu fácil manipulação e eluição do extrato VOL foi de 3 mL. O volume injetado foi de 1 μ L. A injeção foi realizada em modo splitless. A temperatura do injetor foi de 220 $^{\circ}$ C e a temperatura do detector foi de 240 $^{\circ}$ C; a programação de aquecimento do forno temperatura foi de 60 $^{\circ}$ C a 240 $^{\circ}$ C com aquecimento de 3 $^{\circ}$ C/min; a temperatura final foi mantida por 7 minutos. A temperatura no detector ou na interface foi mantida a 240 $^{\circ}$ C. A identificação de cada composto presente nos extratos foi feita com base nos Índices de Kovats (IK) e nos Índices de Retenção (IR) obtidos, comparados com dados da literatura (Adams, 1995) e/ou por comparação com seus espectros de massa (NIST database/ChemStation data system), para a mesma coluna cromatográfica (DB₅) comprovando a identificação dos compostos.

4.3.2.2 Condições de análise MEFS-CG-EM

A microextração por fase sólida (MEFS) foi realizada com fibra de revestimento misto Carboxen / PDMS de 75 µm de espessura de filme e 10 mm de comprimento (Supelco, Bellefonte, EUA). A fibra foi pré-condicionada a 280 °C por 60 min no injetor do cromatógrafo gasoso. A amostra (folhas secas e moídas de pitangueira), foi pesada (2,5 g) em frasco de 24 mL (Chromatography Research Supplies) e imediatamente tampada com septos de silicone, com face interna de PTFE (Fluoropolímero). Antes da extração, cada frasco foi colocado em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, a fibra foi introduzida num frasco através do septo e exposta no *headspace* para extração dos compostos voláteis. Após o tempo de exposição de 10 minutos, a fibra foi removida do frasco e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso para desorção térmica dos analitos. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e a identificação dos compostos presentes na amostras, foram realizadas segundo o item 4.3.2.1.

4.3.2.3 Condições de análise CG-DIC

As análises por CG-DIC foram realizadas em um cromatógrafo gasoso HP (6890N, Little Falls, EUA) equipado com detector de ionização de chama. A coluna usada foi uma BD-5 (20 m, 0,25 mm, 0,25 µm, HP, Wilmington, EUA), e o gás de arraste foi o hélio (White Martins, 99,99%, Campinas, São Paulo); 1 µL de amostra dissolvida em éter etílico foi ejetada no cromatógrafo (PA, Ecibra, Lote 16826, Santo Amaro, São Paulo), razão de split de 1:50, a temperatura do injetor foi de 220 °C e a temperatura do detector foi de 240 °C; a programação de aquecimento do forno temperatura foi de 60 °C a 240 °C com aquecimento de 3 °C/min e de 240 °C a 300 °C com aquecimento de 30 °C em 2 min. O tempo total de análise foi de 64 minutos. O equipamento foi operado pelo CG *Chemstation* programa responsável pela integração e processamento dos cromatogramas.

A co-injeção de uma mistura de uma série homóloga de alcanos (C₁₀ – C₂₅) preparada com acetato de etila (Merck, lote 205055, Darmstadt, Alemanha) como solvente permitiu calcular o IR (Índice de Retenção) na mesma condição cromatográfica descrita na seção 4.3.2.1.

A quantificação dos componentes foi feita por padronização interna e consistiu em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância padrão na amostra a ser analisada e relacionar a composição conhecida do padrão com razão entre a área do composto e a área do padrão (Collins et al., 1997). A substância usada como padrão interno foi o óxido de cariofileno ($\geq 99\%$, Fluka, lote 22076, Neu-Alm, Suíça) na concentração de 106 ppm. Os outros componentes com composições conhecidas que foram adicionados à amostra para o cálculo da curva padrão são: n-icosano ($> 98\%$ Carlo Erba, lote 446313, Milão, Itália) na composição de 53 ppm, decano (99+ %, Aldrich, lote D90-1, St. Louis, EUA) na composição de 70 ppm e o α -pineno ($> 98\%$, Aldrich, lote 14,752-4, St. Louis, EUA) na composição de 86 ppm. Tais componentes são semelhantes àqueles presentes na amostra visto à ausência de padrões comerciais dos componentes identificados no extrato. As amostras dos extratos foram diluídas nesta solução e analisadas nas condições descritas.

Para cada injeção determinou-se a curva padrão correspondente. A equação da curva gerada pelo ajuste forneceu a concentração dos compostos identificados de cada extrato.

Os índices de retenção dos picos detectados foram calculados com base no tempo de retenção observados para a solução de n-alcenos injetada nas mesmas condições cromatográficas das análises anteriormente descritas e calculados segundo a equação [27]:

$$IR_i = 100 \left(\frac{tr_i - tr_n}{tr_{n+1} - tr_n} + n \right) \quad [27]$$

Onde:

IR_i = índice de retenção do composto i ;

tr_i = tempo de retenção do composto i ;

tr_n = tempo de retenção do alcano imediatamente anterior a tr_i ;

tr_{n+1} = tempo de retenção do alcano imediatamente posterior a tr_i ;

n = número de carbonos do alcano imediatamente anterior ao composto i.

As amostras de voláteis adsorvidas em Porapak-Q (Lote 132, Supelco, Bellefonte, EUA) foram extraídas usando-se 3 mL da solução de acetato de etila (Merck, lote 205055, Darmstadt, Alemanha) com os compostos padrões e também foram analisadas como descrito por Adams (1995).

4.4 Análise do potencial antioxidante dos extratos obtidos das folhas de *E.uniflora*

As análises de potencial antioxidante foram realizadas com os extratos obtidos por extração supercrítica (como descrito na seção 4.2.4.2), pelo extrato obtido por hidrodestilação (como descrito na seção 4.2.3) e por extratos obtidos com álcool hidratado e com hexano; segundo metodologia que segue.

A extração com álcool hidratado utilizou solução aquosa de etanol (5:95, v/v, água:etanol), (Merck, lote 1009711000, Alemanha) na proporção de 1:3 (m/m) folhas: solução de etanol. Folhas mais solução foram mantidas em liquidificador por 5 minutos. O material foi filtrado em gaze e em seguida foi colocado em rota-evaporador (Laborota, modelo 4001, Vitrieb, Alemanha) a 40 °C, sendo que o extrato concentrado foi liofilizado (LTS Systems, New York, USA) -18 °C a 13,3 Pa e armazenado em frascos âmbar a -5 °C até sua utilização.

A extração com hexano utilizou hexano (Ecibra, lote 16.755, Santo Amaro, SP, Brasil) a proporção de 1:3 (m/m) folhas:hexano. Folhas mais solução foram mantidas em liquidificador por 5 minutos. O material foi filtrado em gaze o material obtido foi colocado em rota-evaporador a 40 °C, sendo que o extrato concentrado foi liofilizado (LTS Systems, New York, USA) a -18 °C a 13,3 Pa (Laborota, modelo 4001, Vitrieb, Alemanha) e armazenado em frascos âmbar a -18 °C até sua utilização.

As análises de avaliação da atividade antioxidantes dos extratos de folhas de *E. uniflora* foram realizados no Laboratório de Bioaromas do Departamento de Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

4.4.1 Determinação de fenóis totais das folhas de *E. uniflora*

O extrato das folhas foi preparado na concentração de 0,5 mg/mL em metanol e ultrassonicado por duas horas. O extrato foi filtrado em membrana 0,22 µm de acetato celulose. Misturou-se no tubo de ensaio, sempre seguindo a seguinte ordem: 0,5 mL de extrato, 2,5 mL de Folin Ciocalteau e 2,0 mL de Carbonato de Sódio. Agitou-se o tubo e o mesmo ficou incubado por cinco minutos em banho-maria a 38 °C. Após a incubação fez-se a leitura no espectro a 760 nm, o equipamento foi zerado com solução 0,5 mL de metanol, 2,5 mL de Folin Ciocalteau e 2,0 mL de Carbonato de Sódio. Fez-se uma curva de ácido gálico utilizando-se diferentes concentrações deste padrão antioxidante. O resultado final foi expresso em mg ácido gálico/ g extrato (Roesler et al., 2006).

Os reagentes utilizados foram:

- Folin Ciocalteau: Marca – QEEL, código C046171
- Carbonato de Sódio – Sigma Aldrich

Os equipamentos utilizados foram:

- Espectrofotômetro: Beckman Coulter™, Made in USA. D.U. 640;
- Filtro Milli Q: Milli Q Plus, Millipore, Ultra Pure Water System, Catalogue number: ZD5211584, Número de série: B5JM13963A.

O preparo das soluções seguiu o seguinte protocolo:

- Folin Ciocalteau: Foi preparado na concentração de 10 % em água Milli Q.
10 % = 10 mL em 100 mL de água
- Carbonato de Sódio: Foi preparado na concentração de 7,5 % em água Milli Q.
7,5 % = 7,5 g em 100 mL de água

A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos das folhas de pitangueira foi realizada em triplicata.

4.4.2 Análise do potencial antioxidante dos extratos de *E. uniflora*

No procedimento do ensaio DPPH para obter o CI_{50} utilizou-se o Espectofotômetro. A partir dos resultados obtidos na análise de Fenóis Totais, o extrato foi preparado na concentração inicial de 0,25 mM expressa em ácido gálico. Este extrato foi dissolvido em etanol, ultrassonicado por 1 hora e filtrado em membrana de 0,22 μm de acetato celulose. 200 μL do extrato na concentração de 0,25 mM de ácido gálico foram colocados na presença de 1000 μL de DPPH, esta mistura foi agitada e incubada por 30 minutos. Após este tempo, fez-se a leitura a 517 nm. O mesmo foi feito misturando-se 200 μL de etanol com 1000 μL de DPPH. O equipamento foi zerado com etanol (Roesler et al., 2006).

Se esta mistura do extrato a 0,25 mM expressa em ácido gálico não tivesse inibido o radical DPPH no mínimo em 70 %, então o extrato foi novamente preparado em concentrações maiores. Após definir a concentração ideal para cada amostra, fez-se a mistura do radical DPPH com diferentes volumes do extrato, sendo que o volume de DPPH era fixo em 1000 μL e o do extrato era no máximo de 200 μL , logo o volume final era de 1200 μL (Roesler et al., 2006).

Cada absorbância da amostra foi transformada em Redução (%), através da fórmula abaixo.

$$\% \text{ Inibição} = [(ABS_{DPPH} - ABS_{Extr.}) / A_{DPPH}] \times 100 \quad [28]$$

Onde:

ABS_{DPPH} = Absorbância da mistura de 1000 μL de DPPH com 200 μL de etanol

$ABS_{Extr.}$ = Absorbância da mistura de 1000 μL e DPPH com "x" μL de extrato (onde x varia de 10 a 200 μL)

Foi construída uma curva para cada extrato, onde no eixo x tinha-se a concentração de extrato em ($\mu\text{g}/\text{mL}$) e no eixo y os valores de redução. Encontrou-se o

CI₅₀ (µg/mL) que refere-se à concentração (µg/mL) de extrato necessária para reduzir 50% do radical DPPH.

Foram utilizados:

- DPPH: 2,2- Diphenyl – 1 – picrylhydrazil, CAS number: 1898-99-4, Peso Molecular = 394,32, Aldrich.
- Ácido Gálico: Sigma, CAS number = 149-91-7, Peso Molecular = 170,12
- Espectrofotômetro: Beckman Coulter™, Made in USA. D.U. 640;
- Filtro Milli Q: Milli Q Plus, Millipore, Ultra Pure Water System, Catalogue number: ZD5211584, Número de séria: B5JM13963A.

4.4.3 ORAC (Capacidade de absorver radicais livres)

O ensaio ORAC feito seguindo o procedimento descrito por Davalos et al. (2004), com algumas modificações. Este ensaio foi dividido em duas etapas, a partir da extração etanólica das folhas foi feito o ensaio ORAC hidrofílico, e a partir do extrato hexânico das folhas fez-se o ORAC lipofílico. A análise de ORAC foi realizada apenas com os extratos etanólico e hexânico das folhas de *E. uniflora*.

Os Reagentes utilizados foram:

- AAPH: 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride, 97% - Peso Molecular: 271,20. Fórmula molecular: $[=NC(CH_3)_2C(=NH)NH_2]_2 \times 2 HCl$. Empresa: Aldrich, lote 11120JC-505, número do catálogo: 44,091-4. Validade: 02/2010.
- Trolox: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid – Aldrich. Peso Molecular = 364,33.
- FL: Fluoresceína Sódica. Fórmula molecular: $C_{20}H_{10}Na_2O_5$. Empresa: VETEC, Lote 0604815. Validade 08/2011.
- Tampão Fosfato de Potássio pH 7.0, 0.075 M
- RMCD: Randomly Methyl β - Cyclodextrin: Empresa Cyclodex

O Fluorímetro utilizado foi um Novo Star, BMG Labtechnologies. Serial number 700-0054. Placa preta, 96 poços, marca Greiner 655096 uclear 96.

Após a adição de todos reagentes na placa, fez-se a leitura da fluorescência a cada 1 minuto, durante 80 minutos. Foram utilizados os seguintes filtros: emissão 520 nm e excitação 485 nm. A temperatura no equipamento era de 37 °C. Todos os extratos foram preparados em duplicata e lidos em triplicata. Para cada placa lida, fez-se uma nova curva do padrão Trolox.

As leituras da fluorescência a cada minuto foram utilizadas no cálculo da AUC, que é a área abaixo da curva, formada no gráfico, onde x corresponde ao tempo e y ao decaimento da fluorescência. A fórmula utilizada para o cálculo da AUC foi a seguinte:

$$AUC = 1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + f_4/f_1 + f_n/f_1 \quad [29]$$

Onde:

f_1 = leitura da fluorescência no tempo 1 minuto

f_2 = leitura da fluorescência no tempo 2 minutos

f_n = leitura da fluorescência no tempo 80 minutos

Foi calculado o valor de AUC para todas as amostras, nas diferentes concentrações do Trolox e para o Branco. O valor do AUC do branco foi subtraído dos valores do AUC do padrão e das amostras. Fez-se um gráfico do padrão Trolox onde o eixo X refere-se ao AUC e o eixo Y à concentração (μM) do padrão na placa. Pela equação da reta, utilizou-se a AUC de cada amostra para que fosse encontrada a concentração de Trolox. O resultado final foi expresso em μM Trolox Equivalente/ g extrato. Para os demais padrões lidos, o resultado final foi expresso em μM Trolox Equivalente/ μM padrão, pois o mesmo foi preparado na concentração de 1 μM (concentração final).

O preparo das soluções para a análise do ORAC hidrofílico foi a seguinte:

- Tampão Fosfato de Potássio: Para 1 L de Fosfato de Potássio Dibásico, com Peso Molecular de 174,18, pesou-se 13,06 g. Pesou-se 10,21 g de Fosfato de Potássio Monobásico, cujo peso molecular é 136,09, para o preparo de 1 L de solução. Adicionou-se o fosfato de potássio monobásico em um béquer contendo o fosfato de potássio dibásico, até pH 7,4. Este tampão foi armazenado em geladeira por 1 semana.
- Fluoresceína: A concentração estoque de Fluoresceína foi de 3,87 mg/mL, esta solução foi dissolvida em Tampão e ficou armazenada por até 2 semanas na geladeira, envolvida com papel alumínio. Antes do ensaio, preparou-se a partir da solução estoque, uma segunda solução na concentração de 0,0387 mg/mL e fez-se uma última diluição até concentração de 0,000378 mg/mL. Para o ensaio, retirou-se desta terceira solução um volume de 120 µL de FL para cada poço na placa. Logo, a concentração final (placa) de Fluoresceína foi de 0,0002322 mg/mL.
- AAPH: A concentração estoque do radical foi de 108 mg/mL, completando o volume com água. Desta solução, retirou-se 60 µL para cada poço na placa. Logo a concentração final (placa) de AAPH foi de 32,4 mg/mL. A solução de AAPH foi sempre preparada minutos antes de ser colocada na placa.
- Trolox: Este análogo da vitamina E serviu como padrão para o ensaio ORAC. Ele foi utilizado nas concentrações finais de: 0,5; 1,0; 10; 25; 50; 80 e 100 µM. O Trolox mais concentrado (1000 µM) foi preparado em eppendorfs e mantido em biofreezer na temperatura de -80 °C, as diluições foram feitas com Tampão Fosfato de Potássio, pH = 7.

Os reagentes previamente preparados foram adicionados na seguinte ordem dentro de cada poço na placa:

1º) 20 µL de Extrato, na concentração inicial de 6 mg/mL. Para o branco foram adicionados 20 µL Tampão e para o Padrão, 20 µL de Trolox.

2º) 120 µL de Fluoresceína

4º) 60 µL de AAPH

Logo o ensaio ORAC hidrofílico teve como volume final 200 µL.

O preparo das soluções para a análise do ORAC lipofílico foi a seguinte:

- Tampão Fosfato de Potássio: Para 1 L de Fosfato de Potássio Dibásico, com Peso Molecular de 174,18, pesou-se 13,06 g. Pesou-se 10,21 g de Fosfato de Potássio Monobásico, cujo peso molecular é 136,09, para o preparo de 1 L de solução. Adicionou-se o fosfato de potássio monobásico em um béquer contendo o fosfato de potássio dibásico, até pH 7,0. Este tampão foi armazenado em geladeira por 1 semana.
- Fluoresceína: A concentração estoque de Fluoresceína foi de 3,87 mg/mL, esta solução foi dissolvida em Tampão e ficou armazenada por até 2 semanas na geladeira, envolvida com papel alumínio. Antes do ensaio, preparou-se a partir da solução estoque, uma segunda solução na concentração de 0,0387 mg/mL e fez-se uma última diluição até concentração de 0,000378 mg/mL. Para o ensaio, retirou-se desta terceira solução um volume de 120 µL de Fluoresceína para cada poço na placa. Logo, a concentração final (placa) de Fluoresceína é de 0,0001786 mg/mL.
- AAPH: A concentração estoque do radical foi de 108 mg/mL, completando o volume com água. Desta solução, retirou-se 120 µL para cada poço na placa (dobro do volume adicionado de AAPH na reação hidrofílica). Logo a concentração final (placa) de AAPH foi de 49,85 mg/mL. A solução de AAPH foi sempre preparada minutos antes de ser colocada na placa.
- Trolox: Foi utilizado nas concentrações finais de: 0,5; 1,0; 10; 25; 50; 80 e 100 µM. A concentração estoque do Trolox mais concentrado (1500 µM) foi preparada em eppendorfs e mantida em biofreezer na temperatura de -80 °C, as diluições foram feitas com Tampão Fosfato de Potássio.
- Methyl β-Ciclodextrina randomizada: A ciclodextrina foi preparada na concentração de 7 % em solução de Acetona:Água (1:1).

Os reagentes previamente preparados foram adicionados na seguinte ordem dentro de cada poço na placa.

1º) 20 µL de extrato, na concentração inicial de 1 mg/mL (ou 1g/L), dissolvido com etanol, ultrassonificado por 2 horas e filtrado com membrana de acetato celulose 0,22 µm. Para o branco foram adicionados 20 µL de Ciclodextrina no lugar do extrato e para o Padrão, 20 µL de Trolox.

3º) 120 µL de Fluoresceína

4º) 120 µL de AAPH

Logo, o ensaio ORAC hidrofílico teve como volume final 260 µL.

4.5 Modelagem termodinâmica

4.5.1 Equação de Estado e Propriedades críticas

As propriedades PVT foram calculadas pela equação de Peng-Robinson (1976), com regra de mistura clássica.

As propriedades críticas dos constituintes dos extratos das folhas *Eugenia uniflora* L. foram estimadas pelo método de contribuição de grupos de Somayajulu (1989) e o fator acêntrico de acordo com a equação [30]:

$$\omega = \frac{3}{7} \left(\frac{T_b}{T_b - T_c} \right) \log_{10} \left(\frac{P_b}{P_c} \right) - 1.000 \quad [30]$$

Onde T_b é a temperatura normal de ebulição, valor experimental ou estimado pelo método de contribuição de grupos de Tsibanogiannis (1995), usando valores experimentais de densidade ou preditos pelo método de Immirzi (1977), e P_b é a pressão atmosférica normal (1,0132 bar).

A dados para o CO₂, empregado como solvente supercrítico, foram determinados para as condições operacionais através das tabelas de Angus et al. (1976), baseada em dados experimentais.

4.5.2 Parâmetros de interação binária

Um programa computacional (Cabral, 1993), em linguagem Pascal, teria sido empregado na busca do parâmetro de interação binária $K_{a_{ij}}$ que minimiza a função objetivo nos sistemas binários:

$$S(K_{a_{ij}}) = \sum_{j=1}^{NPE} \sum_{i=1}^2 \left[\left(\frac{y^c(i) - y^e(i)}{y^e(i)} \right)^2 \right]_j \quad [31]$$

Onde NPE é o número de pontos experimentais, $y(i)$ são as frações molares dos componentes (i) nas fases em equilíbrio, (e) valores experimentais e (c) valores calculados pela modelagem.

Tal procedimento de cálculo consiste em atribuir valores de $K_{a_{ij}}$ e calcular a composição $y(i)$ decorrente e buscar o valor de $K_{a_{ij}}$ que minimiza a função objetivo nos sistemas binários.

Os parâmetros de interação binária ($K_{a_{ij}}$ e $K_{b_{ij}}$) são obtidos pelo ajuste da modelagem termodinâmica a dados experimentais de equilíbrio binário de todos os pares de componente da mistura. Não foi possível no presente trabalho realizar estas medidas pelo fato de não haver tais componentes isolados, nem mesmo sintetizados, e também não foi encontrado estes dados da literatura; por isso, foram adotados $K_{a_{ij}}=0,11$ e $K_{b_{ij}}=0$, como feito por Akgün et al. (1999), que mediram o equilíbrio de fases de componentes de óleos essenciais em dióxido de carbono supercrítico, também usando a equação de Peng-Robinson.

Como os parâmetros de interação binária ($K_{a_{ij}}$ e $K_{b_{ij}}$) são obtidos pelo ajuste da equação a dados experimentais de equilíbrio binário de todos os pares de componente da mistura, e não foi possível no presente trabalho realizar estas medidas pelo fato de não haver tais componentes isolados, nem mesmo sintetizados, foram adotados $K_{a_{ij}}=0,11$ e $K_{b_{ij}}=0$, como feito por Akgün et al (1999), que mediram o equilíbrio de fases de componentes de óleos essenciais em dióxido de carbono supercrítico, também usando a equação de Peng-Robinson.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização da matéria prima vegetal

A caracterização da matéria-prima é um parâmetro importante para conhecer fatores que podem influenciar e auxiliar no desenvolvimento do projeto de pesquisa. A determinação da umidade, da densidade e da porosidade do leito são fundamentais no entendimento do comportamento do fluido supercrítico junto à matriz vegetal composta por folhas de *E. uniflora*.

5.1.1 Umidade

Os valores de umidade obtidos em análise realizada em triplicata com folhas de *E. uniflora*, apresentam um valor médio de 2,40 %.

Tabela 3: Umidade das folhas de *E. uniflora*.

Ensaio	m (g)	V H ₂ O (mL)	U (%)
1	15,19	0,4	2,63
2	15,61	0,3	1,92
3	15,18	0,4	2,64
Média			2,40 ± 0,41

5.1.2 Granulometria

Foi obtida uma massa total de folhas moídas de *E.uniflora* de 1329,55 g. Deste total, 50,65 % encontrava-se nas granulometrias entre 16 e 24 meshes. O diâmetro médio geométrico das partículas, calculado de acordo com o método recomendado pela ASAE Standards, foi de 0,74 mm, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Granulometria das folhas de *E. uniflora*.

Mesh	Abertura nominal (mm)	Massa retida (g)	Quantidade de amostra (%)
9	2,00	30,45	2,29
12	1,41	95,93	7,22
16	1,00	351,06	26,40
24	0,71	322,40	24,25
32	0,50	359,69	27,05
48	0,30	170,02	12,79
Diâmetro médio (mm)			0,74

5.1.3 Densidade real e densidade aparente

A média dos valores de densidade real das folhas de *E. uniflora* foi 1,43 g/cm³, a densidade aparente, como apresentado na Tabela 5, a seguir, foi 0,27 (± 0,004) g/cm³.

Tabela 5: Densidade aparente das folhas trituradas de *E. uniflora*.

Ensaio	Massa das folhas (g)	Densidade aparente (g/cm ³)
1	27,00	0,27
2	26,40	0,26
3	27,10	0,27
Média	26,83	0,27 ± 0,004

5.1.4 Porosidade

O valor calculado da porosidade das folhas de *E. uniflora*, a partir dos valores médios de densidade real e aparente foi de **0,81** ou 81 % permeável ao fluido.

5.2 Extrato etéreo

O rendimento do extrato etéreo, obtido pelo valor médio de quatro experimentos, foi de 5,92 (± 0,37) %, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Extrato etéreo das folhas de *E. uniflora*.

Ensaio	Extrato etéreo (%)
1	6,27
2	5,74
3	6,18
4	5,48
Média	5,92 ± 0,37

5.3 Extrato etanólico das folhas de *E. uniflora*

A Tabela 7 apresenta os resultados de rendimento de 3 ensaios feitos com o objetivo de conhecer os rendimentos da extração realizada a baixa pressão com etanol com folhas de *E. uniflora*. A metodologia empregada foi apresentada na seção 4.2.2.

Tabela 7: Rendimento médio da extração com álcool das folhas de *E. uniflora*.

Ensaio	Massa de folhas	Rendimento (%)
1	0,505	2,95
2	0,517	3,23
3	0,499	2,40
Média		2,86 ± 0,04

5.4 Hidrodestilação

A Tabela 8, a seguir, apresenta os resultados de rendimento da hidrodestilação feita com folhas de *E. uniflora* com objetivo de conhecer seu rendimento em óleo volátil. A metodologia empregada é a da seção 4.2.3 e o óleo volátil obtido foi analisado por CG-EM para posterior comparação da composição do mesmo com os extratos obtidos via extração supercrítica.

Tabela 8: Rendimento médio da hidrodestilação das folhas de *E. uniflora*.

Ensaio	Massa de folhas	Rendimento (%)
1	50,56	0,46
2	52,18	0,60
3	50,59	0,56
Média		0,54 ± 0,04

5.5 Testes preliminares de extração supercrítica

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos na análise do rendimento global (b.s., %) para quatro proporções mássicas no leito do extrator. Estes testes preliminares de extração supercrítica realizados com massas de amostras equivalentes a $\frac{1}{4}$ do leito do extrator (cerca de 6,5 g de amostra), $\frac{1}{2}$ do leito do extrator (cerca de 13 g de amostra), $\frac{3}{4}$ do leito do extrator (cerca de 19,5 g de amostra) e em quantidade de amostra equivalente à totalidade do leito do extrator (cerca de 26 g de amostra). Experimentos foram realizados em duplicata a $P=200$ bar, $T=40$ °C, $Q_{CO_2}=14$ mL/s (a $P=0,93$ bar e T ambiente) e tempo de extração de 240 minutos para as proporções mássicas de $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ do leito do extrator e 300 minutos para as proporções mássicas de $\frac{3}{4}$ de leito e leito cheio.

Tabela 9: Resultado dos testes preliminares, onde foi variada somente a massa de amostra utilizada nos experimentos.

Massa de amostra (g)	Tempo (min)	Massa acumulada (g)		Rendimento global (b.s., %)	
		1º exp.	2º exp.	1º exp.	2º exp.
6,5	60	0,151	0,146	2,499	2,617
	120	0,163	0,179	2,706	3,206
	180	0,172	0,193	2,847	3,444
	240	0,174	0,193	2,882	3,456
13	60	0,189	0,200	1,467	1,529
	120	0,225	0,269	1,739	2,064
	180	0,228	0,275	1,771	2,105
	240	0,255	0,276	1,977	2,108
19,5	60	0,277	0,250	1,426	1,292
	120	0,371	0,346	1,910	1,791
	180	0,405	0,395	2,087	2,043
	240	0,428	0,439	2,207	2,268
	300	0,453	0,509	2,334	2,634
26	60	0,357	0,306	1,399	1,168
	120	0,412	0,399	1,615	1,519
	180	0,481	0,467	1,883	1,783
	240	0,488	0,543	1,893	2,072
	300	0,590	0,569	2,252	2,172

Os testes preliminares foram realizados objetivando o rendimento global para experimentos realizados nas mesmas condições operacionais ($P=200$ bar, $T=40$ °C, $Q_{CO_2}=14$ mL/s (a $P=0,93$ bar e T ambiente)), variando apenas a quantidade material contida no leito de extração. Observou-se que foram alcançados resultados satisfatórios quanto à reprodutibilidade dos dados, pois foi mantido praticamente o mesmo rendimento global para as mesmas condições de extração, como ilustra os valores da Tabela 9. A Figura 3 descreve o comportamento da massa acumulada de extrato obtida em base seca para cada um dos experimentos.

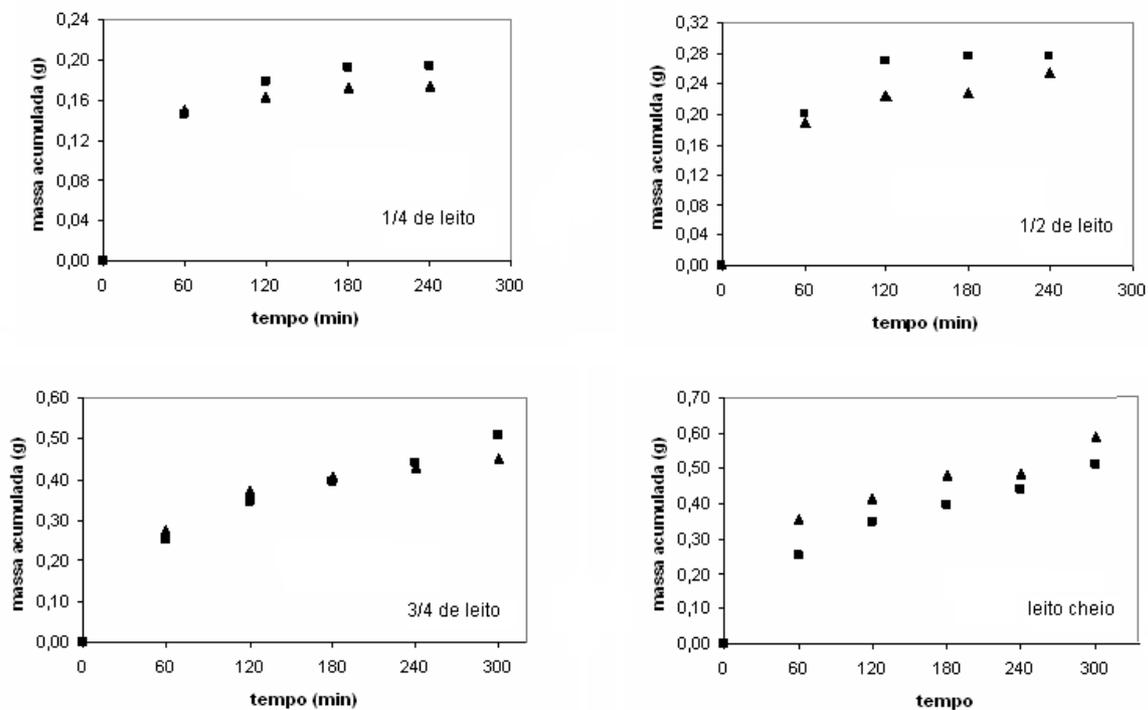


Figura 3: Comportamento da massa acumulada de extrato em base seca para cada teste preliminar.

Os valores de rendimento se mostraram compatíveis nas diversas condições operacionais analisadas. Sendo assim, foi escolhida a relação de massa de amostra equivalente a $\frac{1}{4}$ do leito do extrator (aproximadamente 6,5 g de amostra), uma vez que esta condição proporcionaria economia de matéria-prima bem como de recursos energéticos. Nesta proporção mássica observou-se também que a quantidade de massa acumulada nos extratos nos tempos de 180 e 240 minutos manteve-se praticamente constante, o que asseguraria a finalização da extração no tempo de 240 minutos, fato que não foi observado nas outras proporções mássicas analisadas, onde pode ser notada uma tendência ainda crescente da massa acumulada nos extratos, mesmo depois de mais de 240 minutos de extração.

Visto que não foram alteradas as condições operacionais, somente a quantidade de material no extrator, esperou-se encontrar resultados compatíveis nos extratos quanto à composição e perfil dos compostos voláteis extraídos.

O extrato etéreo, obtido com éter de petróleo à alta temperatura por várias horas de refluxo, forneceu o rendimento alcançado com emprego de um solvente bem mais agressivo que o CO₂ e em condições de extração diferentes às propostas pela extração supercrítica. Neste caso, o rendimento do extrato etéreo (5,92 %) foi superior ao obtido via extração supercrítica (≈3,0 %), uma vez que o éter de petróleo é um solvente menos seletivo que o CO₂.

A literatura relata valores de rendimento em óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas de *E. uniflora* de 1 % (Weyerstahl et al., 1988), 1,8 % (Maia et al., 1997) e 0,74 % (Morais et al., 1996). Para a amostra analisada deste trabalho, o valor médio de rendimento do óleo essencial obtido por hidrodestilação foi de 0,54 %, abaixo dos valores citados na literatura e também abaixo do rendimento médio obtido nos extratos com extração supercrítica.

Quanto ao rendimento mássico dos voláteis retidos nas colunas com adsorvente sintético, este valor esteve na ordem de 0,1 % do rendimento global. Observou-se também que a coloração amarelada do adsorvente era alterada até a segunda hora de extração, depois disso, a coloração mantinha-se visualmente a mesma, indicando que os compostos voláteis são extraídos até a segunda hora de extração.

5.6 Extração supercrítica

Avaliando os dados obtidos nos testes preliminares, verificou-se que uma quantidade apreciável de extrato supercrítico ficava na tubulação de saída do extrator, em alguns ensaios estes valores alcançaram 50 % do rendimento. Sendo assim, não foram mais feitas medidas pontuais para avaliação da massa acumulada nem curvas de extração para os demais experimentos. As condições experimentais estabelecidas foram as seguintes: pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar e temperaturas de 40, 50 e 60 °C. Os experimentos, realizados em triplicata, somaram 45 ensaios, onde foram avaliadas as melhores condições operacionais que maximizam o rendimento de extrato. Quanto à massa de amostra colocada no extrator, foram utilizadas 4,0 g de folhas; massa aproximadamente 30 % menor do que a equivalente a ¼ do leite, como descrito na etapa de testes preliminares. Esta escolha justifica-se pela maior garantia de exaustão do leite e economia de matéria-prima e recursos energéticos, nas condições de 30 minutos de

equilíbrio estático decorridos de 60 minutos de extração. Os resultados de rendimento global em base seca obtidos nos ensaios, a massa dos extratos obtidos, a média dos valores de rendimento, o desvio padrão e o erro experimental para cada isoterma analisada estão apresentados nas Tabelas 10, 11 e 12, a seguir.

Tabela 10: Parâmetros de extração supercrítica após 60 minutos de extração a 40 °C.

P (bar)	ρ (Kg/m ³)	EXT (mg)	VOL (mg)	Rendimento (%)	Média	Desvio padrão	Erro (%)
100	632,44	85,80	4,7	2,16	1,97	0,17	8,53
		73,20	3,8	1,86			
		76,90	2,2	1,88			
150	782,73	115,80	2,7	2,86	2,92	0,13	4,48
		121,30	2,8	3,07			
		113,90	1,2	2,83			
200	841,59	121,30	2,8	3,07	3,07	0,25	7,99
		111,10	0,8	2,82			
		132,70	1,0	3,31			
250	880,82	96,80	0,7	2,43	2,56	0,12	4,50
		105,20	3,5	2,63			
		104,50	2,5	2,63			
300	910,89	160,00	2,7	4,22	3,68	0,47	12,82
		132,40	4,4	3,38			
		137,30	4,9	3,43			

Erro (%)= (desvio padrão/média)x100

Para a temperatura de 40 °C, a média dos valores obtidos para a pressão de 100 bar foi de 1,97 %, para a pressão de 150 bar foi de 2,92 %, para a pressão de 200 bar foi de 3,07 %, para a pressão de 250 bar foi de 2,56 % e para a pressão de 300 bar foi de 3,68 %. O valor médio dos rendimentos obedeceu ao incremento gradual da densidade do CO₂, com exceção da pressão de 250 bar. O erro experimental alcançou 7,99 %, no caso da condição 40 °C e 200 bar e 12,82 % no caso da condição 40 °C e 300 bar.

Para a temperatura de 50 °C, a média dos valores obtidos para a pressão de 100 bar foi de 1,70 %, para a pressão de 150 bar foi de 2,42 %, para a pressão de 200 bar foi de 2,49 %, para a pressão de 250 bar foi de 2,76 % e para a pressão de 300 bar foi de 3,17 %. O valor médio dos rendimentos obedeceu ao incremento gradual da densidade do CO₂. Os erros experimentais alcançaram 15,06 %, no caso da condição 40 °C e 100 bar, e 4,85 % no caso da condição 50 °C e 200 bar; para a condição de 50 °C e 250 bar o erro experimental foi de aproximadamente 10,61 %, já nas condições de 40 °C e 250 bar e 40 °C e 300 bar estes valores foram de, respectivamente, de 10,61 e 1,07 %.

Tabela 11: Parâmetros de extração supercrítica após 60 minutos de extração a 50 °C.

P (bar)	ρ (Kg/m ³)	EXT (mg)	VOL (mg)	Rendimento (%)	Média	Desvio padrão	Erro (%)
100	391,01	78,00	6,6	1,99	1,70	0,26	15,06
		62,80	7,4	1,58			
		59,70	8,0	1,52			
150	702,44	97,20	4,1	2,43	2,42	0,12	4,85
		92,10	5,7	2,29			
		101,40	5,9	2,53			
200	786,07	92,10	4,3	2,25	2,49	0,22	4,85
		102,10	2,6	2,54			
		106,70	1,6	2,69			
250	835,49	103,60	2,9	2,59	2,76	0,29	10,61
		102,20	4,4	2,60			
		123,30	5,0	3,10			
300	871,42	124,90	2,6	3,15	3,17	0,03	1,07
		125,50	4,1	3,15			
		127,80	9,4	3,21			

Erro (%)= (desvio padrão/média)x100

Na temperatura de 60 °C, a média dos valores de rendimento global para as pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar, foram, respectivamente, 1,45; 2,10; 3,55; 3,54 e 3,96 %. Estes valores obedeceram ao incremento gradual da densidade do CO₂. Na condição de 60 °C e 150 bar o erro experimental foi de 19,91 %. Os outros valores de erros experimentais foram de 5,35 % para 60 °C e 100 bar; 1,83 % para 60 °C e 200 bar; 6,15 % para 60 °C e 250 bar e 5,74 % para 60 °C e 300 bar.

Tabela 12: Parâmetros de extração supercrítica após 60 minutos de extração a 60 °C.

P (bar)	ρ (Kg/m ³)	EXT (mg)	VOL (mg)	Rendimento (%)	Média	Desvio padrão	Erro (%)
100	291,61	58,00	8,9	1,47	1,45	0,08	5,35
		60,10	7,8	1,52			
		53,70	7,1	1,36			
150	607,34	96,70	6,4	2,44	2,10	0,42	19,91
		64,00	5,3	1,64			
		89,00	5,4	2,23			
200	725,47	142,60	4,8	3,59	3,55	0,06	1,83
		138,30	4,1	3,48			
		143,30	5,1	3,59			
250	787,73	147,00	3,7	3,72	3,54	0,22	6,15
		129,50	5,1	3,30			
		143,90	4,1	3,61			
300	830,58	168,90	1,0	4,22	3,96	0,23	5,74
		150,10	3,8	3,79			
		155,90	4,5	3,88			

Erro (%)= (desvio padrão/média)x100

As Figuras 4, 5 e 6, a seguir, apresentam os gráficos obtidos com os valores de rendimento global em base seca, para cada temperatura estudada, com os respectivos desvios pontuais. Estas figuras ilustram o comportamento dos rendimentos globais numa mesma temperatura e possibilitam avaliar o quanto os desvios são representativos em comparação com o valor médio de rendimento encontrado.

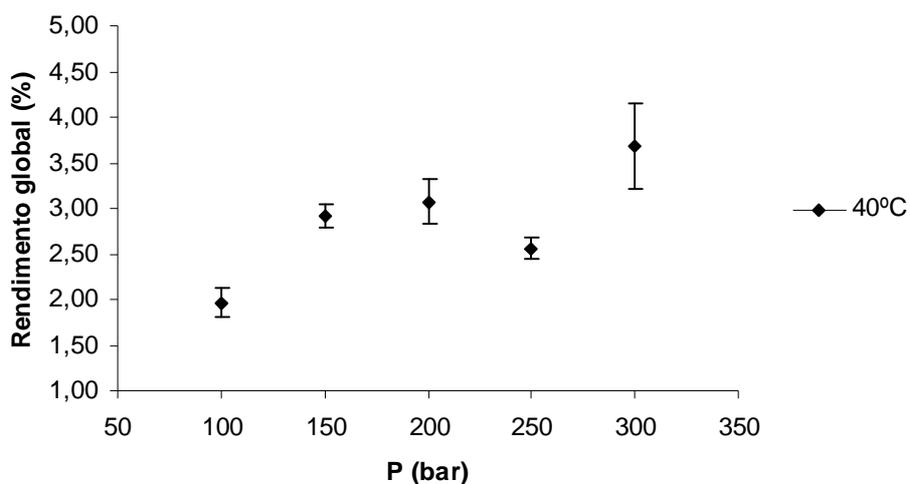


Figura 4: Rendimento global e respectivos desvios pontuais obtidos para a temperatura de 40 °C em função da pressão.

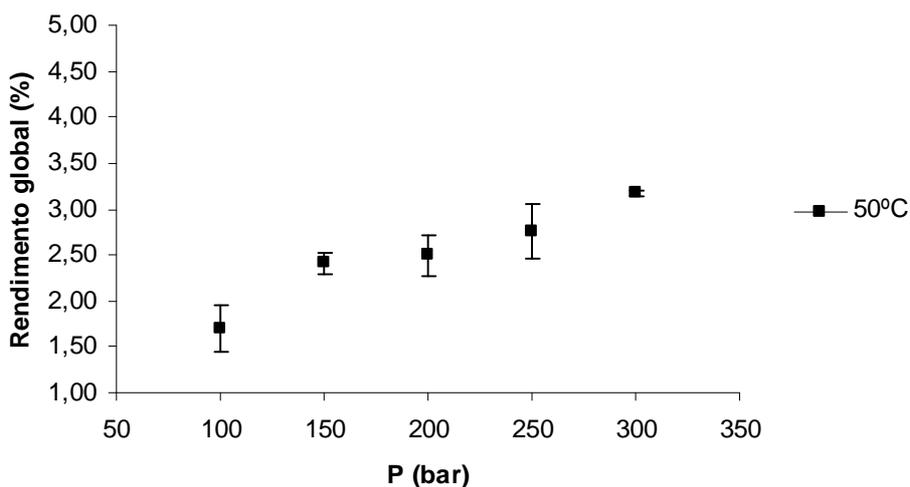


Figura 5: Rendimento global e respectivos desvios pontuais obtidos para a temperatura de 50 °C em função da pressão.

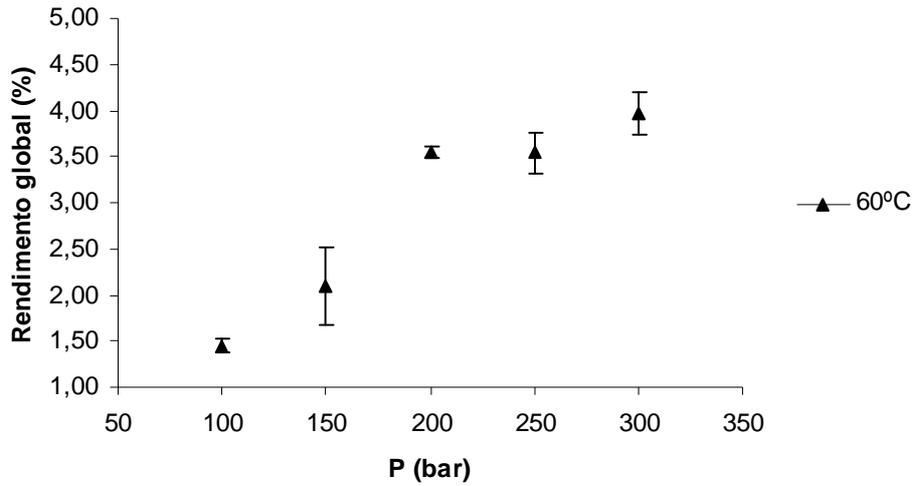


Figura 6: Rendimento global e respectivos desvios pontuais obtidos para a temperatura de 60 °C em função da pressão.

A Figura 7 apresenta a comparação dos valores médios de rendimento global obtidos. Tal comparação facilita avaliar como as condições operacionais influem no rendimento; analisar os efeitos de retrogradação e também avaliar as condições operacionais em que foram obtidos os mais altos valores de rendimento. Como mostra a Figura 7, o maior rendimento foi obtido na temperatura de 60 °C e 300 bar.

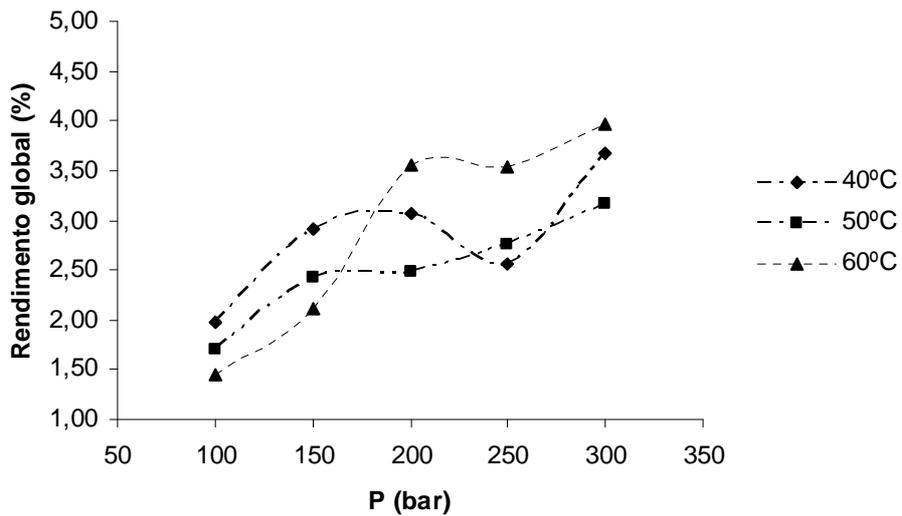


Figura 7: Rendimento global médio para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C em função da pressão.

Na Figura 7 pode-se observar o efeito de retrogradação abaixo de 200 bar, onde o aumento de temperatura a pressão constante reduz o rendimento, isto normalmente está associado ao comportamento da solubilidade dos principais componentes do extrato. Acima de 200 bar, observa-se o comportamento inverso.

As três condições que apresentaram maior rendimento foram a 40 °C e 300 bar e a 60 °C nas pressões de 250 e 300 bar, que correspondem à 3,68, 3,54 e 3,96 %, respectivamente, com os respectivos erros de 12,82; 6,15 e 5,74 %.

5.7 Composição química do óleo volátil das folhas de *E. uniflora*

Foi feita análise do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* obtido por hidrodestilação. As condições de extração estão descritas na seção 4.2.3 e a descrição analítica na seção 4.3.2. A Tabela 13 a seguir apresenta todos compostos identificados. A Figura 8 mostra os principais compostos presentes do óleo essencial.

O cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* obtido por hidrodestilação está apresentado na Figura 9. Os componentes majoritários identificados pela análise cromatográfica foram curzereno (34,76 %), germacreno B (11,84 %) e o $C_{15}H_{20}O_2$ (9,56 %). Estes três compostos somam 46,60 % dos compostos identificados neste extrato. Na Figura 9, estes compostos estão identificados pelos picos: 14, 18 e 31, respectivamente.

Tabela 13: Composição química do óleo volátil das folhas de *E. uniflora* obtido por hidrodestilação.

Pico	Composto	Tempo de retenção (min)	KI calc	KI tab ^a	AREA %
1	β-mirceno	7,06	995	991	0,25
2	para-cimeno	8,04	1026	1026	0,05
3	cis-ocimeno	8,55	1042	1040	0,08
4	trans-ocimeno	8,86	1051	1050	0,19
5	linalol	10,75	1101	1098	0,14
6	Δ-elemeno	20,48	1341	1339	0,63
7	β-elemeno	22,76	1394	1391	6,34
8	β-cariofileno	23,84	1422	1418	3,45
9	γ -elemeno	24,42	1436	1434	3,89
10	allo-aromadendreno	25,47	1463	1461	0,05
11	γ -selineno	26,06	1477	1477	0,11
12	germacreno D	26,32	1483	1480	2,22
13	β-selineno	26,51	1488	1485	0,37
14	curzereno	26,97	1498	1496	34,76
15	germacreno A	27,35	1508	1503	0,13
16	Δ-cadineno	27,98	1526	1524	0,18
17	α-cadieno	28,67	1544	1538	0,11
18	germacreno B	29,29	1560	1554	11,84
19	espatulenol	29,88	1575	1576	0,14
20	NI	30,05	1579		1,40
21	NI	30,25	1584		0,93
22	viridiflorol	30,56	1592	1590	0,29
23	C ₁₅ H ₂₂	31,37	1614		0,30
24	NI	31,99	1626		0,15
25	NI	32,90	1630		0,18
26	germacrona	34,44	1697	1693	0,73
27	bioaletrina	35,75	1735		0,84
28	NI	36,01	1743		0,50
29	vellerdiol	36,33	1752		0,20
30	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	40,55	1875		1,22
31	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	40,81	1883		9,56
32	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	44,30	1989		4,40
Total					85,65

^a KI: identificação de Adams (1995).

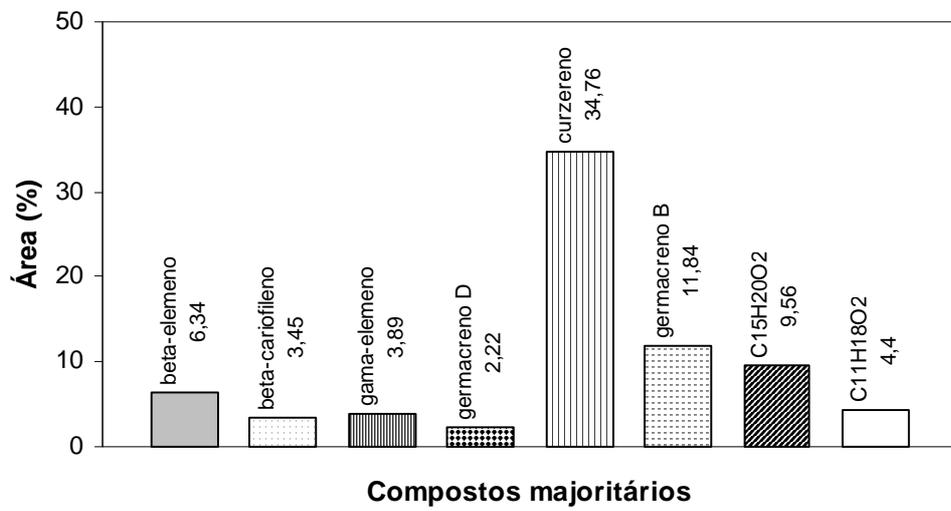


Figura 8: Compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas de *E. uniflora*.

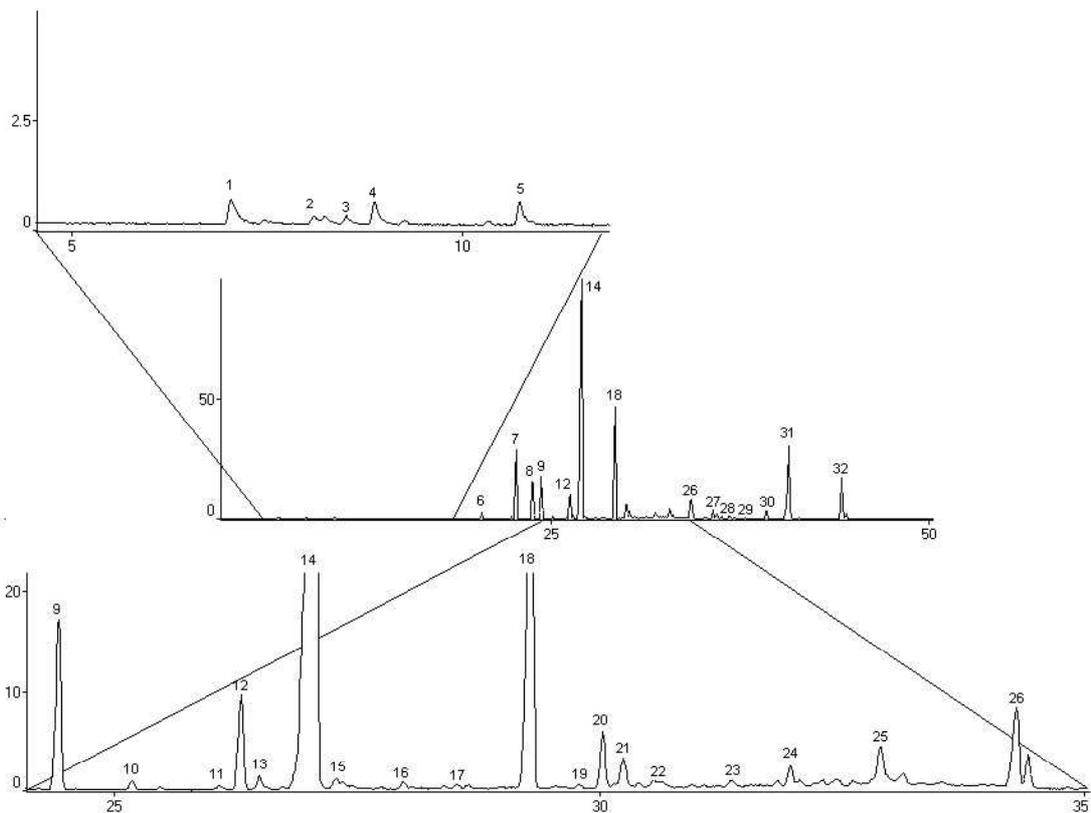


Figura 9: Cromatograma do óleo essencial de folhas de *E. uniflora* obtido por hidrodestilação.

O óleo volátil de *E. uniflora* já foi previamente estudado, este óleo apresentou diferentes composições de acordo com a origem geográfica da planta. O óleo obtido na Argentina, por exemplo, contém limoneno, carvona e nerolidol como os componentes majoritários (Ubiero et al., 1978). A análise do óleo volátil da Nigéria contém uma mistura de furanodieno, furanoelemeno, selina-1,3,7(11)-trie-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona como os principais componentes (Weyerstahl et al., 1988). Do Brasil, o óleo produzido no Rio Grande do Sul continha β -selineno, α -selineno e nerolidol como os componentes majoritários (Henriques et al., 1993). Já no estado do Ceará, o óleo volátil continha selina-1,3,7(11)-trie-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona como os constituintes majoritários (Morais et al., 1996). As composições dos compostos curzereno e germacreno B do presente trabalho sinaliza um desvio entre o óleo analisado aqui, dos óleos descritos por Morais et al. (1996), Henriques et al., (1993) e Weyerstahl et al., (1988). Os resultados indicam que não se trata da mesma variedade de *E. uniflora*.

Uma nova variedade de *E. uniflora* foi descrita por Maia et al. (1999), tal variedade, assim como a variedade descrita na Tabela 13, não apresenta em sua composição o componente selina-1,3,7(11)-trie-8-ona. Com a finalidade de confirmar essa informação, foi realizada um análise cromatográfica com um padrão sintetizado do composto selina-1,3,7(11)-trie-8-ona, que foi gentilmente fornecido pelo professor Andrew E. Greene, da Universidade Joseph Fourier de Grenoble, da França, que sintetizou com sucesso este composto (Kanazawa et al., 2000). Esta análise provou que este componente não está presente nas amostras analisadas neste trabalho, como apresentado no Figuras 35 e 36 do Anexo. Provavelmente a variedade descrita por Maia et al.(1999) seja a mesma que do trabalho aqui apresentado.

5.8 Composição química da microextração em fase sólida das folhas de *E. uniflora*

Foi feita análise qualitativa do extrato obtido por microextração em fase sólida das folhas de *E. uniflora*. As condições de extração e de análises estão descritas na seção 4.3.2.2.

Foram identificados 32 compostos, o que corresponde a 86,99 % da totalidade da composição do extrato. A Tabela 14 apresenta a composição química da microextração em fase sólida das folhas de pitangueira. A Figura 10 apresenta os compostos majoritários encontrados na extração por MEFS.

Os compostos majoritários encontrados neste extrato foram 2-hexen-1-ol (18,37%), β -mirceno (6,15 %), β -elemeno (6,24 %), β -cariofileno (6,46 %) e curzereno (6,05 %). A Figura 11 apresenta cromatograma do extrato obtido por microextração em fase sólida das folhas de pitangueira, os cinco compostos majoritários estão indicados na figura pelos picos 2, 5, 16, 17, 18 e 25, respectivamente.

Os compostos: β -elemeno, β -cariofileno e γ -elemeno estão presentes tanto no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas como também no extrato obtido por microextração em fase sólida em concentrações apreciáveis. Já o composto curzereno, majoritário no óleo essencial e presente no extrato por microextração em fase sólida, apesar de que em menor quantidade (6,05 %) continua se apresentando como um dos principais compostos que constituem o presente extrato.

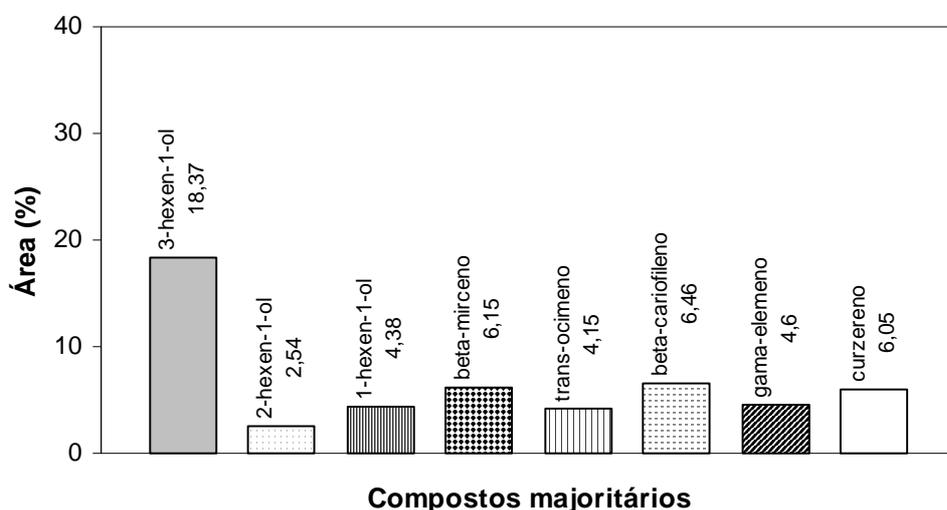


Figura 10: Compostos majoritários encontrados na extração por MEFS.

Tabela 14: Composição química da microextração em fase sólida das folhas de pitangueira.

Pico	Composto	Tempo de retenção (min)	KI calc	KI tab	AREA %
1	hexanal	3,05			1,14
2	3-hexen-1-ol	3,95			18,37
3	2-hexen-1-ol	4,09			2,54
4	1-hexen-1-ol	4,12			4,38
5	β -mirceno	7,06	995	991	6,15
6	3-careno	7,68	1014	1011	0,85
7	para-cimeno	8,04	1026	1026	0,98
8	cis-ocimeno	8,55	1042	1040	1,45
9	trans-ocimeno	8,86	1051	1050	4,15
10	NI	8,99	1055		2,26
11	terpinoleno	10,35	1091	1088	0,78
12	linalol	10,75	1101	1098	1,12
13	Δ -elemeno	20,48	1341	1339	1,53
14	α -cubebeno	20,94	1352	1351	0,68
15	α -copaeno	22,03	1378	1376	0,72
16	β -elemeno	22,76	1394	1391	6,24
17	β -cariofileno	23,84	1422	1418	6,46
18	γ -elemeno	24,42	1436	1434	4,60
19	β -farneseno	24,68	1443	1443	1,07
20	α -humuleno	25,23	1457	1454	0,91
21	allo-aromadendreno	25,47	1463	1461	0,86
22	γ -muuroloeno	26,19	1480	1477	1,26
23	germacreno D	26,32	1483	1480	1,43
24	β -selineno	26,51	1488	1485	1,82
25	curzereno	26,97	1498	1496	6,05
26	germacreno A	27,35	1508	1503	0,74
27	γ -cadieno	27,66	1517	1513	0,93
28	Δ -cadineno	27,98	1526	1524	0,81
29	NI	28,06	1528		1,34
30	α -cadieno	28,67	1544	1538	0,92
31	NI	28,99	1552		1,70
32	germacreno B	29,29	1560	1554	1,90
33	NI	29,55	1567		0,69
34	NI	30,05	1579		0,64
35	C ₁₅ H ₂₂	31,97	1631		0,67
36	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	40,55	1875		0,63
Total					91,36

^a KI: identificação de Adams (1995).

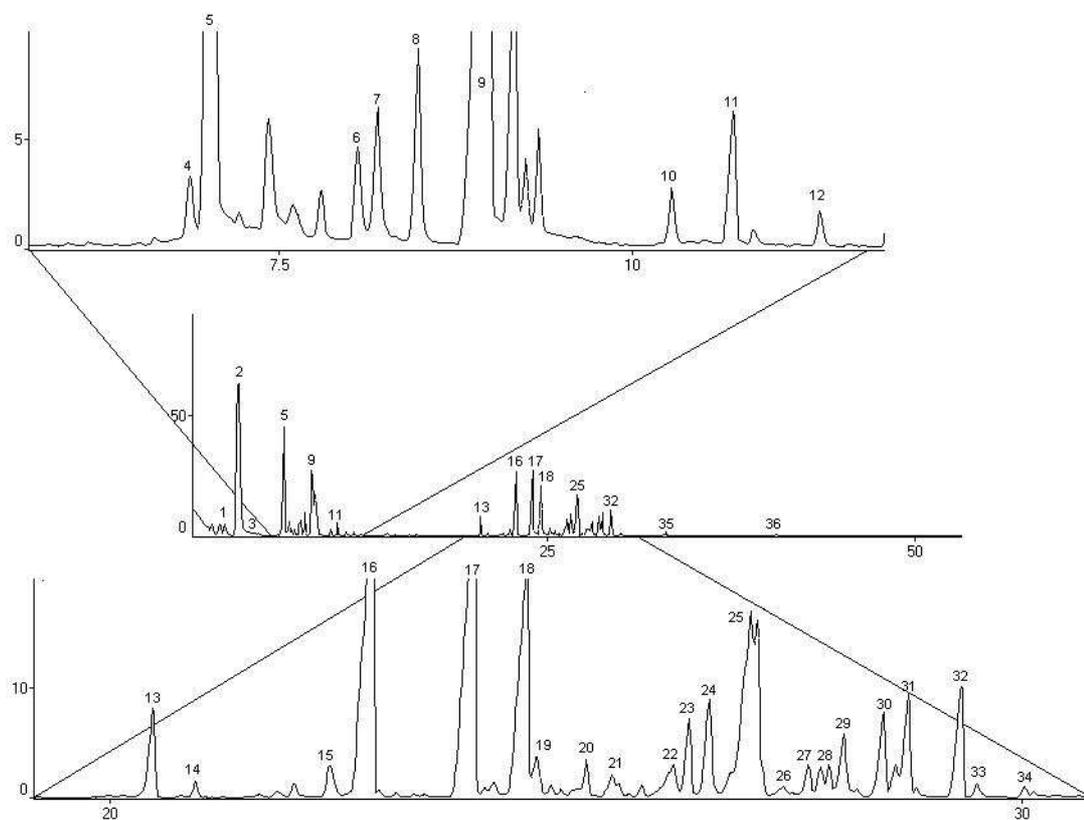


Figura 11: Cromatograma do extrato obtido por microextração em fase sólida das folhas de pitangueira

O óleo essencial obtido por hidrodestilação e o extrato obtido por microextração em fase sólida apresentam, na totalidade dos seus compostos, 17 compostos em comum. Apesar destes compostos se apresentarem em composições diferentes, este fato indica semelhança na composição química dos mesmos.

5.9 Composição química dos extratos supercríticos das folhas de *E. uniflora*

A análise qualitativa dos extratos obtidos por extração supercrítica das folhas de *E. uniflora* foi realizada com extratos obtidos em três condições operacionais diferentes: 50 °C e 15 MPa; 50 °C e 30 MPa e 60 °C e 10 MPa com a finalidade de observar se diferentes densidades de CO₂ poderiam conferir diferença no perfil cromatográfico dos extratos. Não foi observada diferença de número nem de intensidade dos picos que constituíam os espectros de massa dos extratos, sendo assim uma média foi calculada para as áreas percentuais dos picos tanto para os extratos supercríticos como para cada extrato volátil correspondente de cada extrato supercrítico. As condições analíticas estão descritas na seção 4.3.2.1. A Tabela 15 apresenta os compostos identificados e a média das áreas dos três extratos analisados.

Foram identificados 10 compostos no extrato supercrítico, o que corresponde a 97,69 % da totalidade da composição do extrato. Já no extrato volátil, foram identificados 39 compostos, o que representa 74,57 % de sua totalidade. A Tabela 15 apresenta a média da composição química dos extratos supercríticos e seus correspondentes extratos voláteis de folhas de pitangueira. A Figura 12 apresenta os compostos majoritários encontrados no extrato supercrítico e a Figura 13 apresenta o cromatograma do extrato obtido por extração supercrítica de folhas de pitangueira. A Figura 14 mostra os compostos majoritários encontrados no extrato volátil obtido por extração supercrítica e a Figura 15 mostra o cromatograma do extrato volátil obtido por extração supercrítica das folhas de pitangueira.

Tabela 15: Composição química do extrato supercrítico (EXT) e do extrato volátil (VOL) de folhas de pitangueira.

Pico	Composto	Tempo de retenção (min)	KI calc	KI tab	Área (%) EXT	Área (%) VOL
1	3-hexen-1-ol	3,95				8,74
2	β-mirceno	7,06	995	991		1,69
3	Δ-careno	7,24	999	1001		1,06
4	3-careno	7,68	1014	1011		1,21
5	para-cimeno	8,04	1026	1026		0,96
6	cis-ocimeno	8,55	1042	1040		1,12
7	trans-ocimeno	8,86	1051	1050		0,91
8	NI	8,99	1055			0,91
9	terpinoleno	10,35	1091	1088		1,04
10	linalol	10,75	1101	1098		1,31
11	NI	11,35	1119			1,04
12	NI	14,28	1191			1,19
13	acetato de linalol	16,61	1249	1257		1,17
14	NI	16,96	1257			1,05
15	geranial	17,45	1269	1270		1,65
16	terpinen-7-al	18,11	1283	1282		1,35
17	Δ-elemeno	20,48	1341	1339		1,76
18	NI	22,43	1387			0,85
19	β-elemeno	22,76	1394	1391	3,40	5,18
20	β-cariofileno	23,84	1422	1418	0,85	4,18
21	γ-elemeno	24,42	1436	1433	2,04	2,72
22	allo-aromadendreno	25,47	1463	1461		0,68
23	germacreno D	26,32	1483	1480	0,99	3,30
24	β-selineno	26,51	1488	1485		1,03
25	curzereno	26,97	1498	1496	21,78	6,20
26	germacreno A	27,35	1508	1503		1,43
27	NI	28,06	1528			1,28
28	α-cadieno	28,67	1544	1538		1,09
29	germacreno B	29,29	1560	1554	6,03	5,26
30	espatulenol	29,88	1575	1576	0,63	1,00
31	NI	30,05	1579			0,90
32	NI	30,16	1582			0,51
33	NI	30,25	1584			0,72
34	NI	34,27	1693		0,79	1,08
35	germacrona	34,44	1697	1693		0,49
36	bioaletrina	35,75	1735			0,70
37	NI	36,01	1743			0,99
38	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	40,81	1883		53,89	4,88
39	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	44,30	1989		7,29	1,91
Total					97,69	74,57

^a KI: identificação de Adams (1995).

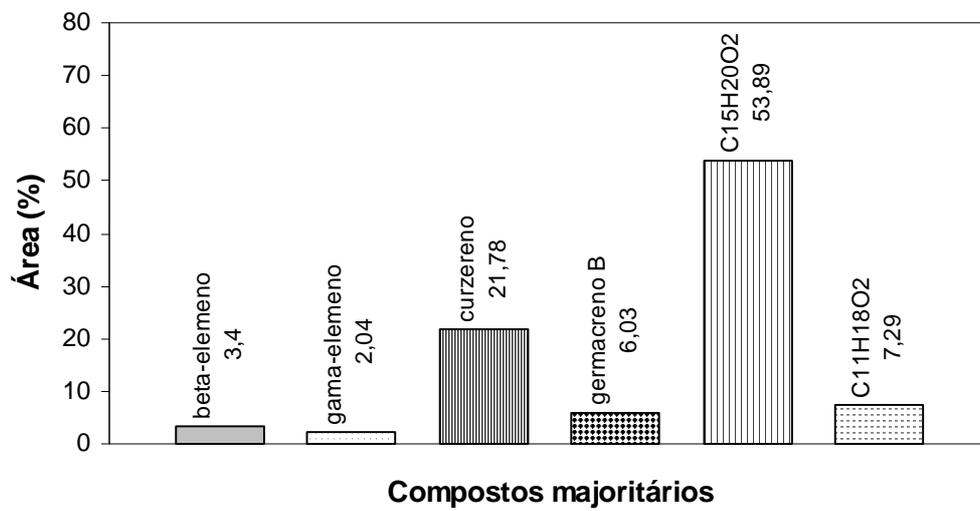


Figura 12: Compostos majoritários encontrados no extrato supercrítico de folhas de pitangueira.

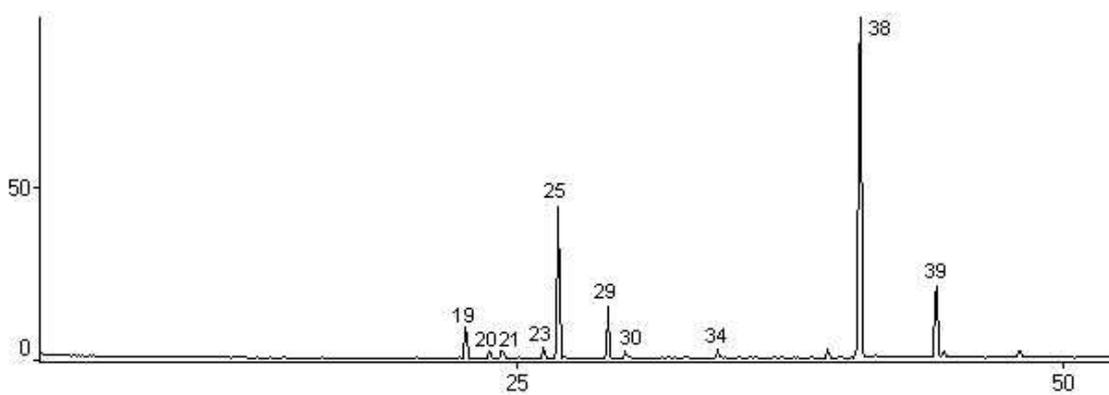


Figura 13: Cromatograma do extrato obtido por extração supercrítica de folhas de pitangueira.

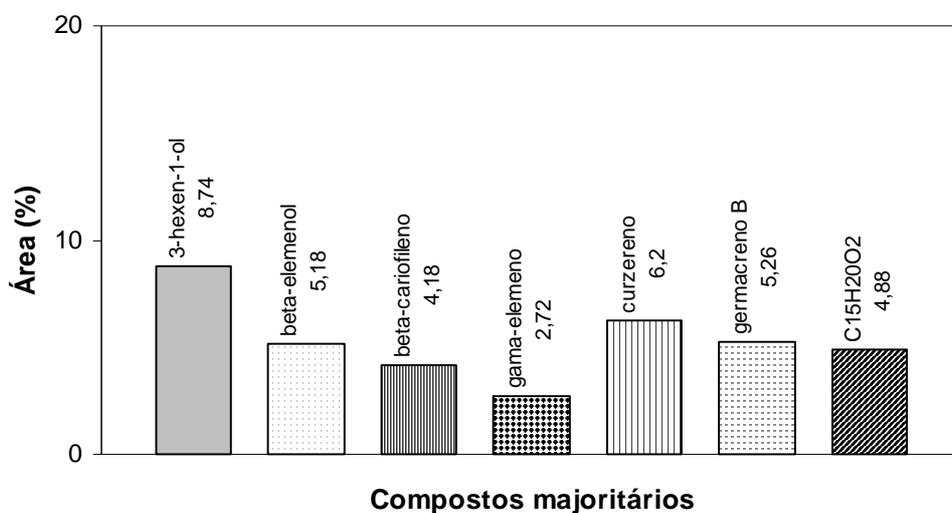
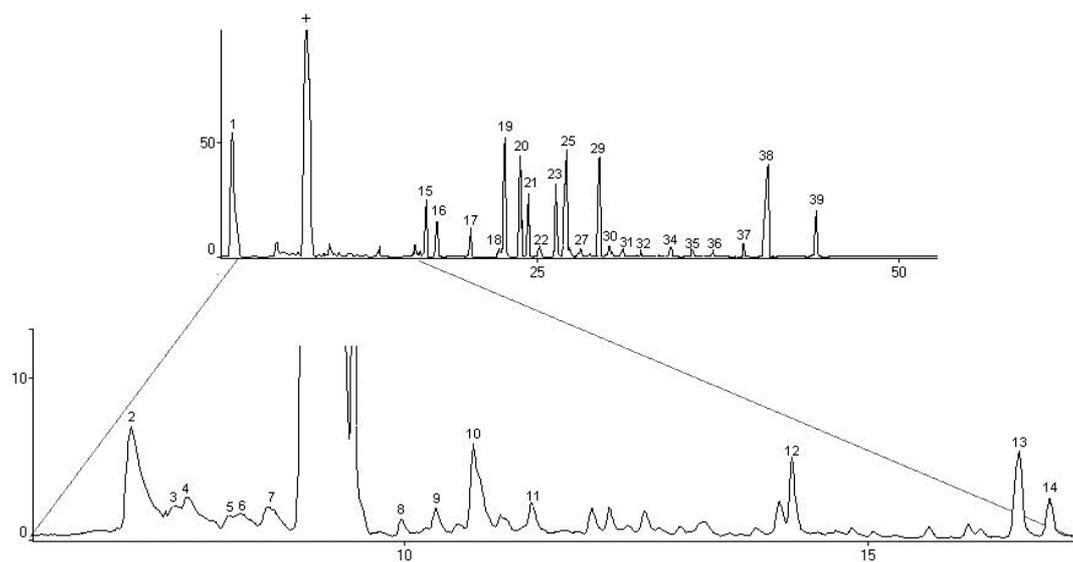


Figura 14: Compostos majoritários encontrados no extrato volátil obtido por extração supercrítica de folhas de pitangueira.



+ tri-etil benzeno = contaminante da amostra

Figura 15: Cromatograma do extrato volátil obtido por extração supercrítica das folhas de pitangueira.

A Tabela 16 apresenta a comparação das áreas obtidas para os compostos identificados (%) entre os três extratos analisados das folhas de *E. uniflora*: o óleo essencial, o extrato obtido por microextração em fase sólida (MEFS) e os extratos pesado (EXT) e leve (VOL), capturados em Porapak Q, obtidos via extração supercrítica.

Tabela 16: Comparação das composições químicas dos três extratos obtidos das folhas de *E. uniflora*.

Compostos	KI calc	Óleo essencial (%)	MEFS (%)	Extrato supercrítico	
				EXT (%)	VOL (%)
hexanal			1,14		
3-hexen-1-ol			18,37		8,74
2-hexen-1-ol			2,54		
1-hexen-1-ol			4,38		
β -mirceno	995	0,25	6,15		1,69
Δ -careno	999				1,06
3-careno	1014		0,85		1,21
para-cimeno	1026	0,05	0,98		0,96
cis-ocimeno	1042	0,08	1,45		1,12
trans-ocimeno	1051	0,19	4,15		0,91
NI	1055		2,26		0,91
terpinoleno	1091		0,78		1,04
linalol	1101	0,14	1,12		1,31
NI	1119				1,04
NI	1191				1,19
acetato de linalol	1249				1,17
NI	1257				1,05
geranial	1269				1,65
terpinen-7-al	1283				1,35
Δ -elemeno	1341	0,63	1,53		1,76
α -cubebeno	1352		0,68		
α -copaeno	1378		0,72		
NI	1387				0,85
β -elemeno	1394	6,34	6,24	3,40	5,18
β -cariofileno	1422	3,45	6,46	0,85	4,18
γ -elemeno	1436	3,89	4,60	2,04	2,72
β -farneseno	1443		1,07		
α -humuleno	1457		0,91		
allo-aromadendreno	1463	0,05	0,86		0,68
γ -selineno	1477	0,11			
γ -muuroleno	1480		1,26		
germacreno D	1483	2,22	1,43	0,99	3,30
β -selineno	1488	0,37	1,82		1,03
curzereno	1498	34,76	6,05	21,78	6,20
germacreno A	1508	0,13	0,74		1,43
γ -cadieno	1517		0,93		
Δ -cadineno	1526	0,18	0,81		
NI	1528		1,34		1,28
α -cadieno	1544	0,11	0,92		1,09
NI	1552		1,70		
germacreno B	1560	11,84	1,90	6,03	5,26

NI	1567		0,69		
espatulenol	1575	0,14		0,63	1,00
NI	1579	1,40	0,64		0,90
NI	1582				0,51
NI	1584	0,93			0,72
viridiflorol	1592	0,29			
C ₁₅ H ₂₂	1614	0,30	0,67		
NI	1626	0,15			
NI	1630	0,18			
NI	1693			0,79	1,08
germacrona	1697	0,73			0,49
bioaletrina	1735	0,84			0,70
NI	1743	0,50			0,99
vellerdiol	1752	0,20			
C ₁₇ H ₂₆ O ₂	1875	1,22			
C ₁₅ H ₂₀ O ₂	1883	9,56	0,63	53,89	4,88
C ₁₁ H ₁₈ O ₂	1989	4,40		7,29	1,91

O composto majoritário presente no extrato supercrítico foi o C₁₅H₂₀O₂ (53,89 %), seguidos de curzereno (21,78 %) e germacreno B (6,03 %). Estes três compostos somam 80,70 % da totalidade dos compostos presentes neste extrato. Eles estão identificados na Figura 13 como os picos 38, 25 e 29, respectivamente. Já o extrato volátil está constituído principalmente pelo álcool 3-hexen-1-ol (8,74 %), curzereno (6,20 %), β-elemeno (5,18 %) e germacreno B (5,26 %), representados na Figura 15 pelos picos 1, 25, 19 e 29.

Os compostos curzereno e germacreno B estão presentes no óleo essencial, no extrato por microextração por fase sólida e no extrato supercrítico e seu correspondente extrato volátil em composições consideráveis, o que evidencia mais uma vez a importância deles na composição das folhas de *E. uniflora*.

Os compostos terpinoleno, linalol, β-elemeno, β cariofileno, γ-elemeno, germacreno D e curzereno também foram identificados no extrato volátil da fruta da pitangueira por Oliveira et al. (2006). Nesta análise predominaram os compostos β-ocimeno (36,2 %), seguido por cis-ocimeno (13,4 %), β-ocimeno (15,4 %) e β-pineno (10,3 %). Já na análise dos compostos voláteis da fruta da pitangueira feita por Ogunwande et al. (2005) os componentes majoritários encontrados foram: germacreno (27,5 %), selina-1,3,7(11)-trie-8-ona (19,2 %) e curzereno (11,3 %), ainda neste mesmo estudo, os compostos majoritários do óleo essencial das folhas de pitangueira foram: curzereno (19,7 %), selina-1,3,7(11)-trie-8-ona (17,8 %) e antractilone (16,9 %).

Melo et al. (2007) identificaram os compostos curzereno (50,2 %), β -elemeno (5,9 %) e α -cadiol (4,7 %) como compostos majoritários do óleo essencial das folhas de pitangueira e por técnica de cromatografia olfativa (CG-O) associaram os compostos: curzereno, β -elemeno e germacreno como os responsáveis pelo aroma característico do óleo essencial. Estes compostos, com exceção do α -cadiol, também foram encontrados no extrato supercrítico e no seu correspondente extrato volátil das folhas de pitangueira. No extrato volátil, as composições destes dois compostos foram de 6,20 % e 5,18 %, respectivamente. No extrato supercrítico não consta presença do composto germacreno, todavia, a soma dos dois outros compostos (β -elemeno e curzereno) representa 25,18 % do total do extrato.

O óleo essencial obtido por hidrodestilação, o extrato obtido por microextração em fase sólida e o extrato volátil obtido na extração supercrítica apresentam, na totalidade dos seus compostos, 19 compostos em comum. Apesar destes compostos se apresentarem em composições diferentes, este fato indica semelhança na composição dos mesmos. Os principais compostos semelhantes aos três extratos são: β -elemeno; β -cariofileno; curzereno e $C_{15}H_{20}O_2$.

5.10 Identificação e composição dos extratos e extratos voláteis de E. uniflora obtidos por extração supercrítica e analisados por CG-DIC

Na Tabelas de 38 a 42 do Anexo estão apresentados a identificação, o tempo de retenção médio (min), a composição média (mg/g extrato), o índice de retenção calculado dos compostos, o desvio padrão e o erro analíticos (injeções feitas em triplicata) encontrados nos extratos obtidos por extração supercrítica na isoterma de 40 °C e pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar.

Na Tabela 17 está apresentado a composição média (mg/g extrato) de cada composto, na isoterma de 40 °C, para cada pressão e estudada.

Na análise quantitativa dos extratos obtidos a 40 °C e 100 bar pode-se observar que 32,06 % do extrato supercrítico foi identificado e corresponde aos compostos

curzereno (9,74 %), germacreno B (6,70 %), espatulenol (1,39 %) e $C_{15}H_{20}O_2$ (14,22 %). Estes mesmos compostos estão presentes no extrato volátil em composição de 4,37 %, 9,05 %, 6,15 % e 10,67 %, respectivamente, e somam neste extrato 30,24 % da totalidade dos compostos identificados. Tanto no extrato supercrítico, como no seu correspondente extrato volátil, o composto $C_{15}H_{20}O_2$ foi o que se apresentou em maior concentração; 14,22 % e 10,67 %. O composto β -elemeno, identificado por Melo et al. (2007), como um dos responsáveis pelo aroma característico do óleo essencial, está presente neste extrato na composição de 1,78 %.

Tabela 17: Comparação da composição dos extratos obtidos na isoterma de 40 °C para as pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar.

Compostos		C média (mg/g ext)				
		100 bar	150 bar	200 bar	250 bar	300 bar
Extrato supercrítico	γ -elemeno		20,16	22,36	10,30	18,75
	germacreno D					7,39
	curzereno	97,4		129,21	59,67	52,79
	germacreno B	67,00	107,59	114,99	59,99	98,02
	espatulenol	13,96	25,24	28,37	14,56	24,82
	$C_{15}H_{20}O_2$	142,26	245,45	239,09	127,87	198,28
	Total	320,64	398,43	534,02	272,37	400,05
Extrato volátil	3-careno	28,89	21,47	33,86	70,07	35,92
	para-cimeno	17,24	12,89	19,67	41,16	26,27
	terpinoleno	4,67	73,79	5,70	28,99	6,17
	linalol	6,18	12,25	7,35	18,52	
	acetato de linalol	11,80				19,54
	terpinen-7-al	6,67			19,67	1,01
	Δ -elemeno	6,34	24,61	41,39		9,69
	β -elemeno	17,75	15,81	25,21	1,63	14,67
	γ -elemeno	7,86	31,52	10,70		7,03
	germacreno D	72,36	38,40	45,44	7,55	65,08
	β -selineno	46,43	23,19	26,81	41,75	36,59
	curzereno	43,70	28,59	50,53	99,43	28,79
	α -cadieno	48,65	27,81	28,71	46,01	41,04
	germacreno B	90,50	23,60	39,41	53,65	61,92
	espatulenol	61,56	20,02	32,78	55,34	49,73
	$C_{15}H_{20}O_2$	106,71	31,04	18,11	76,13	21,57
	$C_{17}H_{22}O_2$	26,61	6,86	21,36	27,87	22,18
Total	603,93	391,85	407,03	587,77	425,00	

A 40 °C e 150 bar, também foram identificados 4 compostos no extrato supercrítico; 39,84 % deste extrato foi identificado e corresponde aos compostos: γ -

elemeno, germacreno B, espatulenol e $C_{15}H_{20}O_2$ nas concentrações de 2,02 %, 10,76 %, 2,52 % e 24,54 %, respectivamente. Estes compostos também foram encontrados no extrato volátil nas concentrações que seguem: 3,15 %, 2,36 %, 2,00 % e 3,10 %. Diferente do que aconteceu com o extrato anterior, o composto $C_{15}H_{20}O_2$ não representa a maior concentração neste extrato volátil. Neste caso, o composto de maior composição foi o terpinoleno, com 7,38 % da totalidade da amostra.

Na condição experimental de 40 °C e 200 bar foram identificados 53,40 % do extrato supercrítico e 40,70 % do extrato volátil. Os compostos identificados no extrato supercrítico foram: γ -elemeno (2,24 %), curzereno (12,92 %), germacreno B (11,50 %), espatulenol (2,84 %) e $C_{15}H_{20}O_2$ (23,91 %). No correspondente extrato volátil, ocorreram quatro compostos também presentes no extrato supercrítico, são eles: curzereno (5,53 %), germacreno B (3,94 %), espatulenol (3,28 %) e $C_{15}H_{20}O_2$ (1,81 %). Além destes, Δ -elemeno (4,14 %) é um composto importante na composição do extrato volátil.

Na condição operacional de 40 °C e 250 bar estão identificados 27,27 % do extrato supercrítico e 58,78 % do extrato volátil. A composição do extrato supercrítico baseia-se no composto $C_{15}H_{20}O_2$ (12,79%), seguido de germacreno B (6,00 %), curzereno (5,97 %) espatulenol (1,46 %) e γ -elemeno (1,03 %). Destes 5 compostos, somente o γ -elemeno não faz parte do extrato volátil, os outros quatro compostos representam 28,45 % da composição do extrato identificada. É importante salientar que nesta condição, o rendimento global de extração e foi menor que nas demais condições de pressão (Figura 4) e que as composições dos compostos principais também são menores a 40 °C e 250 bar (Tabela 17).

A 40 °C e 300 bar foram identificados 40,01 % do extrato supercrítico e 42,50 % de seu extrato volátil. O extrato supercrítico é constituído principalmente por $C_{15}H_{20}O_2$ (19,83 %), germacreno B (98,02 %), curzereno (5,28 %), espatulenol (2,48 %) e γ -elemeno (1,86 %). Já seu correspondente extrato volátil é constituído principalmente por germacreno D (6,51 %), germacreno B (6,19 %) e espatulenol (4,97 %).

Nas Tabelas de 48 a 52 do Anexo estão apresentados a identificação, a composição a concentração média (mg/g extrato), o índice de retenção calculado dos compostos, o desvio padrão e o erro analíticos (injeções feitas em triplicata) encontrados

nos extratos obtidos por extração supercrítica na isoterma de 50 °C e pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar.

Na Tabela 18 está apresentado somente a composição média (mg/g extrato) de cada composto, na isoterma de 50 °C, para cada pressão estudada.

Tabela 18: Comparação da composição dos extratos obtidos na isoterma de 50 °C para as pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar.

Compostos		C média (mg/g ext)				
		100 bar	150 bar	200 bar	250 bar	300 bar
Extrato supercrítico	γ -elemeno	11,33	10,33	14,60	20,06	15,35
	germacreno D			7,55	8,14	67,39
	curzereno	59,51	58,51	68,12	65,76	8,42
	germacreno B	41,07	39,08	55,34	103,72	80,46
	espatulenol	12,88	12,28	16,81	26,21	19,42
	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	95,37	99,37	110,30	208,06	174,23
	Total	220,16	219,57	272,71	431,95	365,27
Extrato volátil	3-careno	8,56	17,32	25,06	34,19	30,83
	para-cimeno	7,00	8,37	9,33	19,73	12,77
	terpinoleno	1,79				
	linalol				6,47	
	acetato de linalol	1,98	5,80		15,97	
	terpinen-7-al				8,78	
	Δ -elemeno	2,99	3,19	11,97	8,35	11,19
	β -elemeno	17,85	7,70	9,27	11,07	8,76
	γ -elemeno	6,41	3,59	3,92		
	germacreno D	46,25	34,76	37,11	46,40	37,86
	β -selineno	51,21	20,66	21,10	25,14	20,66
	curzereno	14,84	25,93	37,38	48,83	44,81
	α -cadieno	42,87				
	germacreno B	132,22	38,95	38,71	43,71	37,03
	espatulenol	66,82	26,47	27,95	33,17	27,87
	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	139,24	25,85	30,50	22,99	21,38
	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	35,74	3,43	6,71	20,95	18,60
Total	575,78	222,02	259,02	345,76	271,75	

A 50 °C e 100 bar foram identificados 22,02 % do extrato supercrítico e 57,59 % de seu extrato volátil. O composto majoritário presente no extrato supercrítico obtido a 50 °C e 100 bar foi o C₁₅H₂₀O₂ (9,54 %), seguido de curzereno (5,85 %), germacreno B (3,90 %), espatulenol (1,22 %) e γ -elemeno (1,03 %). No seu correlato extrato volátil, os principais compostos identificados em ordem de abundância foram: C₁₅H₂₀O₂ (13,92 %),

germacreno B (13,22 %), espatulenol (6,68 %) e β -selineno (5,12 %). Os cinco compostos presentes no extrato supercrítico, também foram identificados no extrato volátil.

A 50 °C e 150 bar, identificou-se 21,96 % do extrato supercrítico e 22,20 % do seu correspondente volátil. Os compostos identificados em ordem de maior concentração nos extratos foram: $C_{15}H_{20}O_2$ (9,34 %), curzereno (5,95 %), germacreno B (4,11 %), espatulenol (1,29 %) e γ -elemeno (1,13 %). Já no extrato volátil obtido nesta condição experimental, foram obtidos, em ordem de maior concentração, os compostos: germacreno B (3,90 %), germacreno D (3,48 %), espatulenol (2,65 %), curzereno (2,59 %) e $C_{15}H_{20}O_2$ (2,58 %).

Na condição experimental de 50 °C e 200 bar, foram identificados 27,27 % do extrato supercrítico e 25,90 % do extrato volátil correlato. No extrato supercrítico, foram identificados 6 compostos, que estão presentes também no extrato volátil. São eles em ordem de abundância: $C_{15}H_{20}O_2$ (11,03 %), curzereno (6,81 %), germacreno B (5,53 %), espatulenol (1,68 %), γ -elemeno (1,46 %) e germacreno D (0,75 %). No extrato volátil os compostos majoritários são: germacreno B (3,87 %), curzereno (3,38 %), germacreno D (3,71 %) e $C_{15}H_{20}O_2$ (3,05 %).

A 50 °C e 250 bar, identificou-se 43,19 % do extrato supercrítico e 34,58 % do seu extrato volátil. O composto $C_{15}H_{20}O_2$ representa 20,81 % do extrato supercrítico, germacreno B, 10,37 %, curzereno, 6,57 %, espatulenol, 2,61 %, γ -elemeno, 2,01 % e germacreno D, 0,81 %. No extrato volátil, prevaleceram os compostos curzereno (4,88 %), germacreno D (4,64 %) e germacreno B (4,37 %).

A 50 °C e 300 bar, seis compostos foram identificados, totalizando 36,53 % de composição conhecida no extrato supercrítico. Os compostos identificados foram: $C_{15}H_{20}O_2$ (17,42 %), germacreno B (8,05 %), curzereno (6,74 %), espatulenol (1,94 %), γ -elemeno (1,54 %) e α -cadieno (0,84 %). No correlato extrato volátil, foram identificados 27,18 % do extrato, os principais compostos identificados foram: curzereno (4,48 %), germacreno D (3,79 %) e germacreno B (3,70 %).

Nas Tabelas de 49 a 53 do Anexo estão apresentados a identificação, a concentração a concentração média (mg/g extrato), o índice de retenção calculado dos compostos, o desvio padrão e o erro analíticos (injeções feitas em triplicata) encontrados

nos extratos obtidos por extração supercrítica na isoterma de 60 °C e pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar.

Na Tabela 19 está apresentado a composição média (mg/g extrato) de cada composto, na isoterma de 60 °C, para cada pressão e estudada.

Tabela 19: Comparação da composição dos extratos obtidos na isoterma de 60 °C para as pressões de 100, 150, 200, 250 e 300 bar.

Compostos		C média (mg/g ext)				
		100 bar	150 bar	200 bar	250 bar	300 bar
Extrato supercrítico	γ-elemeno		19,84	16,87	13,39	15,88
	germacreno D				7,24	8,25
	curzereno	96,89	56,87	72,49	59,18	71,93
	germacreno B	169,85	138,37	98,86	68,20	85,18
	espatulenol		29,43	23,80	18,14	21,79
	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	271,74	272,42	162,68	124,23	157,49
	Total	538,48	516,94	374,70	290,37	360,51
Extrato volátil	3-careno	11,56	21,73	21,54	27,51	25,92
	para-cimeno	9,00	13,59	12,39	15,17	12,83
	terpinoleno	2,44	4,21	4,44	6,59	4,82
	linalol	3,39	4,72	4,09	5,41	4,81
	acetato de linalol	5,68	5,42			
	terpinen-7-al	3,74	3,85			
	Δ-elemeno	3,62	3,66	12,98	12,17	13,28
	β-elemeno	1,83	13,90	6,30	7,37	5,57
	γ-elemeno	6,94	5,78			
	germacreno D	52,67	49,30	31,87	42,26	28,92
	β-selineno	53,09	35,93	20,46	22,90	17,16
	curzereno	18,29	32,20	30,83	40,12	37,72
	germacreno B	121,19	73,94	32,54	36,58	30,23
	espatulenol	65,78	45,90	23,94	28,32	21,83
	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	93,10	50,00	16,02	11,38	17,99
	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	10,82	11,08	4,12	16,42	5,47
	Total	463,15	375,20	221,51	272,18	226,55

No extrato supercrítico da condição experimental 60 °C e 100 bar, foram identificados 53,84 % da totalidade do extrato. A amostra continha C₁₅H₂₀O₂ (27,17 %), germacreno B (16,99 %) e curzereno (9,69 %). Já no extrato volátil, foram identificados como principais compostos: germacreno B (12,12 %), C₁₅H₂₀O₂ (9,31 %), espatulenol (6,68 %), β-selineno (53,09 %) e germacreno D (5,27 %). No total, foram identificados 46,31 % do extrato volátil.

Foram identificados 52,30 % da totalidade do extrato supercrítico na condição de 60 °C e 150 bar, os compostos identificados foram: $C_{15}H_{20}O_2$ (27,24 %), germacreno B (13,83 %), curzereno (5,69 %), espatulenol (2,94 %), γ -elemeno (1,98 %) e β -elemeno (0,60 %). Do seu correlato extrato volátil, identificou-se 37,52 % e os principais compostos identificados foram: germacreno B (7,39 %), $C_{15}H_{20}O_2$ (5,00 %), germacreno D (4,93 %) e espatulenol (4,59 %).

A 60 °C e 200 bar, foram identificados 37,47 % do extrato supercrítico e 22,15 % do extrato volátil. Os cinco compostos identificados do extrato supercrítico foram: $C_{15}H_{20}O_2$ (16,27 %), germacreno B (9,86 %), curzereno (7,25 %), espatulenol (2,38 %) e γ -elemeno (1,69 %). No extrato supercrítico foram identificados 13 compostos, os majoritários são: $C_{15}H_{20}O_2$ (3,25 %), germacreno B (3,25 %), germacreno D (3,19 %) e curzereno (3,08 %).

Os compostos identificados no extrato supercrítico obtido a 60 °C e 250 bar foram os seguintes: $C_{15}H_{20}O_2$ (12,42 %), germacreno B (6,82 %), curzereno (5,92 %), espatulenol (1,81 %), γ -elemeno (1,34 %) e germacreno D (0,72 %). Estes compostos representam 16,61 % do extrato supercrítico. Já no correlato extrato volátil, foram identificados 27,22 % dos compostos. Os majoritários são: germacreno D (4,23 %), curzereno (4,01 %), germacreno B (3,66 %) e espatulenol (2,83 %).

A 60 °C e 300 bar foram identificados 36,05 % do extrato supercrítico e 22,65 % do seu correlato extrato supercrítico. Os compostos γ -elemeno (1,59 %), germacreno D (0,82 %), curzereno (7,19 %), germacreno B (8,52 %), espatulenol (2,18 %) e $C_{15}H_{20}O_2$ (15,75 %) foram os compostos identificados no extrato supercrítico. Os compostos majoritários que representam o extrato volátil são: germacreno B (2,89 %), curzereno (3,77 %), germacreno B (3,07 %) e $C_{15}H_{20}O_2$ (1,79 %).

A avaliação dos resultados de extração indicou que não ocorreu diferença na composição nos extratos obtidos nas diferentes condições operacionais de extração.

Na Tabela 20 está apresentado um comparativo entre os principais componentes das folhas e dos frutos da pitangueira. Como mostra a Tabela 20, há diferença entre a composição de folhas de um mesmo país, como comprova as análises realizadas nas plantas brasileiras, por exemplo.

Tabela 20: Comparação entre os principais componentes encontrados em folhas e frutas da pitangueira, colhidos em diferentes regiões.

Parte da planta	Origem	Tipo de extração	Principais componentes	Rendimento (%)	Referência
		Extração supercrítica	$C_{15}H_{20}O_2$, curezeno e germacreno B	1,0 a 3,0	
Folhas	Goiás	Voláteis capturados durante as extrações com $SC-CO_2$	3-hexen-1-ol, curzereno, germacreno B e $C_{15}H_{20}O_2$	0,1	Este trabalho
		Hidrodestilação	curzereno, germacreno B, $C_{15}H_{20}O_2$ e β -elemeno	0,5	
Folhas	Nigéria	Hidrodestilação	curzereno, selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, antracione e furanodieno	-	Ogunwande et al., 2005
Frutas		-	germacreno, selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona	-	
Folhas	Argentina	Hidrodestilação	limoneno, pulegone, carvona e nerodiol	-	Ubiero et al., 1987
Folhas	Nigéria	Hidrodestilação	furanodieno, furanoelemeno, selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1,0	Weyerstalh et al., 1988
Folhas	Rio Grande do Sul	Hidrodestilação	β -selineno, α -selineno, e nerodiol	-	Henriques et al., 1993
Folhas	Ceará	Hidrodestilação	selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona	0,74	Morais et al., 1996
Folhas	Pará	Hidrodestilação	germacreno, germacreno B e curzereno	1,8	Maia et al., 1999
Folhas	Paraíba	Arraste a vapor	furanodieno, γ -elemeno, trans-ocimeno, 2- β -pineno e γ -terpinoleno	-	Lima et al., 1993
Frutas	Pernambuco	Armadilha de Porapack-Q	trans-ocimeno, β -ocimeno, cis-ocimeno e β -pineno	-	Oliveira et al., 2006

5.11 Comportamento dos compostos majoritários presentes nos extratos supercríticos em função da pressão

As Figuras 15, 16, 17, 18 e 19 apresentam o comportamento dos compostos majoritários presentes nos extratos supercríticos em função da pressão. Foram analisados o comportamento dos seguintes compostos: γ -elemeno, curzereno, germacreno B, espatulenol e do éster $C_{15}H_{20}O_2$.

A Figura 15 apresenta o comportamento do composto γ -elemeno para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função das pressões estudadas. Como pode ser

observado na análise gráfica dos dados, a composição do composto não ultrapassa 50 mg/g extrato e se mantém praticamente constante para as isotermas estudadas em função da pressão.

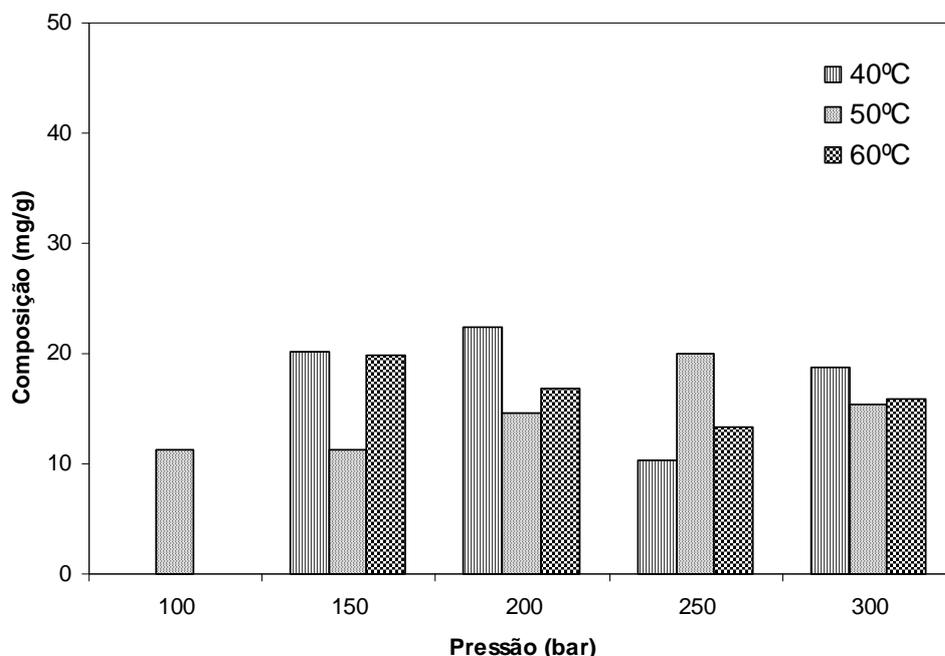


Figura 15: Comportamento do composto γ -elemento para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

A Figura 16 apresenta o comportamento do composto curzereno para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função das pressões 100, 150, 200, 250 e 300 bar. A análise gráfica dos dados para o composto indica que as composições do mesmo para as isotermas de 50 e 60 °C encontram-se entre 50 e 100 mg/g extrato e se mantêm praticamente constantes com os incrementos da pressão. Para a isoterma de 40 °C, o composto não foi encontrado nas pressões de 100 e 150 bar, porém foi na pressão de 200 bar que o curzereno foi encontrado na maior composição dentre as isotermas estudadas (129,21 mg/g extrato), todavia a composição do composto decresce com o aumento da pressão e chega à concentração de 52,79 mg/g extrato na pressão de 300 bar.

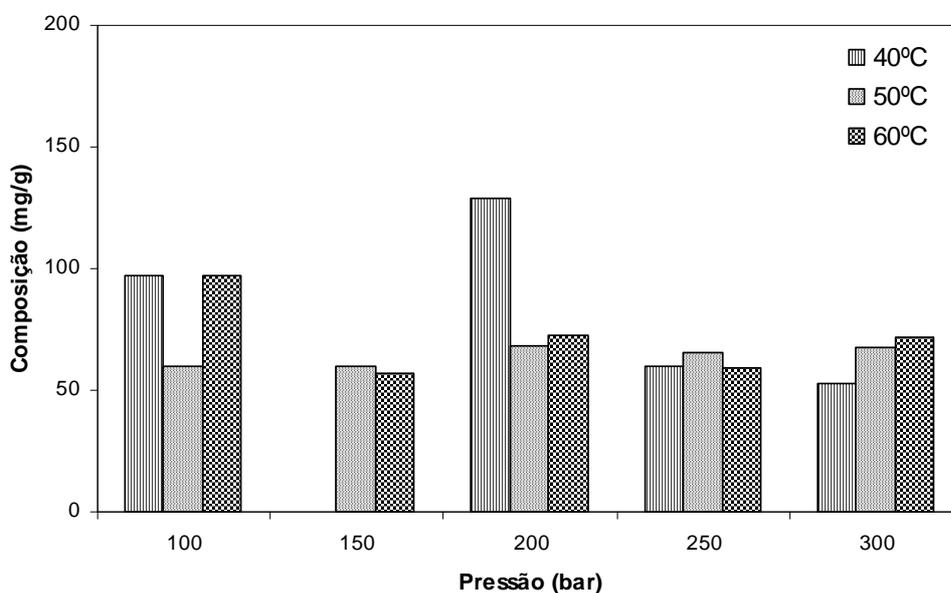


Figura 16: Comportamento do composto curzereno para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

A Figura 17 apresenta o comportamento do composto germacreno B para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função das pressões estudadas. Na análise gráfica dos dados, para a temperatura de 40 °C, ocorreu um incremento nas composições em função da pressão de 100 a 200 bar, houve um decréscimo da composição na pressão de 250 bar e um leve incremento da mesma para a pressão de 300 bar. Para a temperatura de 50 °C ocorreu um aumento gradativo na composição de 100 a 250 bar. Para a temperatura de 60 °C observa-se o valor máximo na composição deste composto na pressão de 100 bar dentre todas as isotermas estudadas (169,85 mg/g extrato), com o aumento da pressão nesta temperatura ocorreu um decréscimo gradativo nos valores da composição do composto.

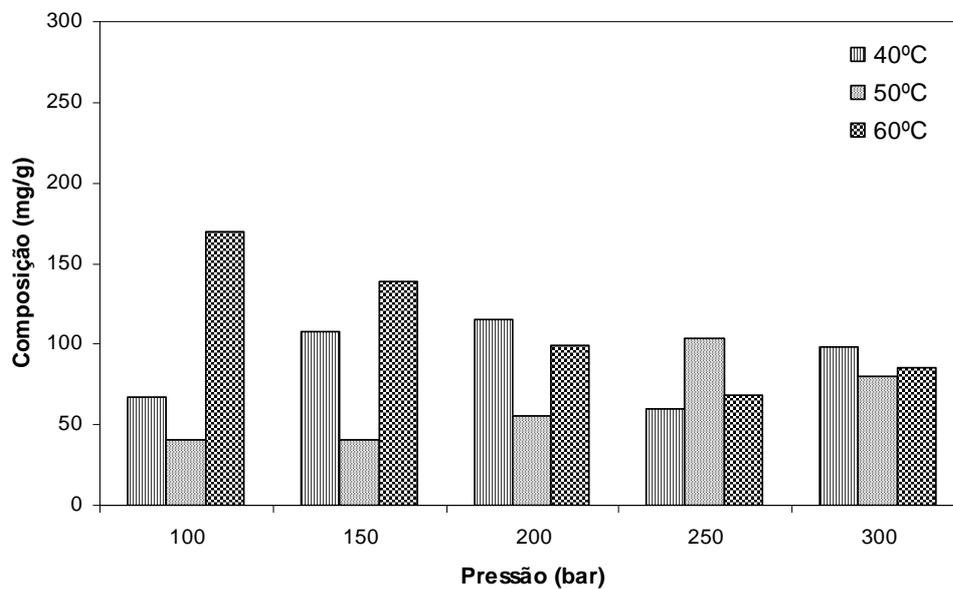


Figura 17: Comportamento do composto germacreno B para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

A Figura 18 apresenta o comportamento do composto espatulenol para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão. Como a análise gráfica indica, não houve incrementos expressivos na concentração do composto, tanto em função de aumentos da pressão quanto da temperatura. As concentrações do composto variaram entre 10 e 30 mg/ g extrato nas condições experimentais analisadas. A 60 °C e 100 bar o composto não foi encontrado no extrato.

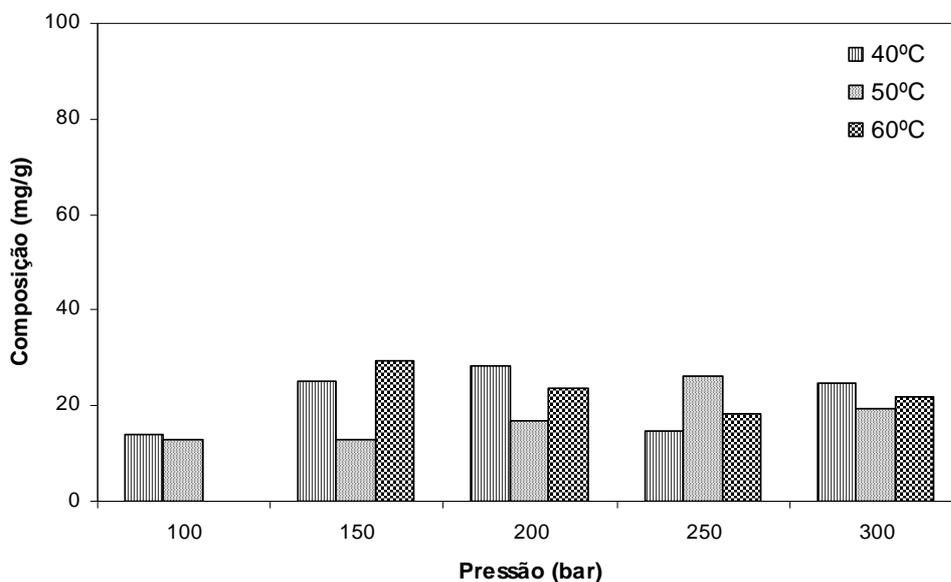


Figura 18: Comportamento do composto spatulenol para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

A análise do comportamento do composto $C_{15}H_{20}O_2$ em função das condições experimentais é muito importante, pois este é o composto majoritário de todos os extratos das folhas de *E. uniflora* obtidos via extração supercrítica. A figura 19 a seguir, ilustra este comportamento para as isotermas de 40, 50 e 60 °C e em função da pressão. A composição do composto nos extratos variou entre 124,23 a 272,42 mg/mg extrato.

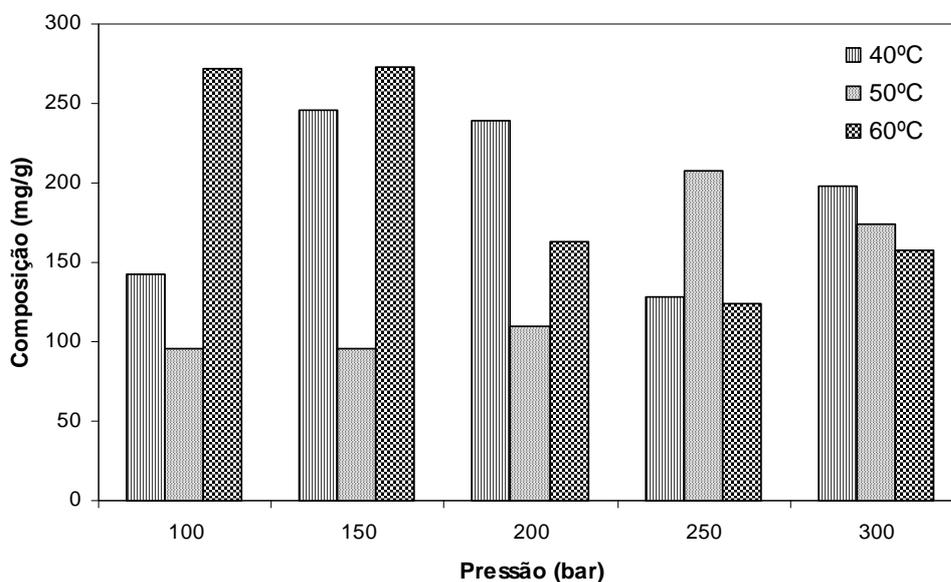


Figura 19: Comportamento do composto $C_{15}H_{20}O_2$ para as isotermas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

A 40 °C, com o aumento na pressão de 100 para 150 bar, ocorreu um incremento expressivo na composição do composto, que aumentou de 142,26 para 245,45 mg/g extrato. Na isoterma de 50 °C, ocorreu este aumento na composição do composto com o aumento da pressão de 200 para 250 bar, nesta ocasião a composição do composto foi de 110,30 para 208,06 mg/g extrato. Foi na temperatura de 60 °C que o composto apresentou seus valores máximos entre as outras duas temperaturas estudadas, alcançando os valores de composição de 271,74 mg/g extrato para a condição de 60 °C e 100 bar e de 272,43 mg/g extrato para a condição de 60 °C e 150 bar.

5.12 Rendimentos de extração dos componentes majoritários dos extratos obtidos por extração supercrítica das folhas de *E. uniflora*

A partir do rendimento global de cada extração supercrítica e da concentração dos principais componentes majoritários dos respectivos extratos, calculou-se o rendimento de extração desses componentes principais em termos de massa extraída (mg) por grama de folhas de pitangueira que foram usadas como matéria-prima no extrator.

5.12.1 Rendimento de γ -elemeno

A Tabela 21 e a Figura 20 apresentam o rendimento de extração do composto γ -elemeno em função das condições operacionais de temperatura e pressão. Os maiores rendimentos foram obtidos na isoterma de 40 °C e pressões de 200 e 300 bar, e a 60 °C e pressões de 200 e 300 bar, sendo que os melhores resultados foram obtidos a 40 °C.

Tabela 21: Rendimento de extração do γ -elemeno (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.

T (°C)	P (bar)	Rendimento global (g extrato / g folhas)	Concentração de γ -elemeno no extrato (mg/g extrato)	Rendimento de extração (mg γ -elemeno / g folhas)
40	100	0,020		
	150	0,029	20,16	0,59
	200	0,031	22,36	0,69
	250	0,026	10,30	0,26
	300	0,037	18,75	0,69
50	100	0,017	11,33	0,19
	150	0,024	11,33	0,27
	200	0,025	14,61	0,36
	250	0,028	20,06	0,55
	300	0,032	15,35	0,49
60	100	0,015		
	150	0,021	19,85	0,42
	200	0,036	16,87	0,60
	250	0,035	13,39	0,47
	300	0,040	15,88	0,63

Observa-se também na Figura 20 que o rendimento de extração deste componente a 40 °C e 250 bar foi um dos menores valores obtidos entre todas as condições. Este comportamento se deve ao baixo rendimento global e a menor composição do extrato nesta condição experimental.

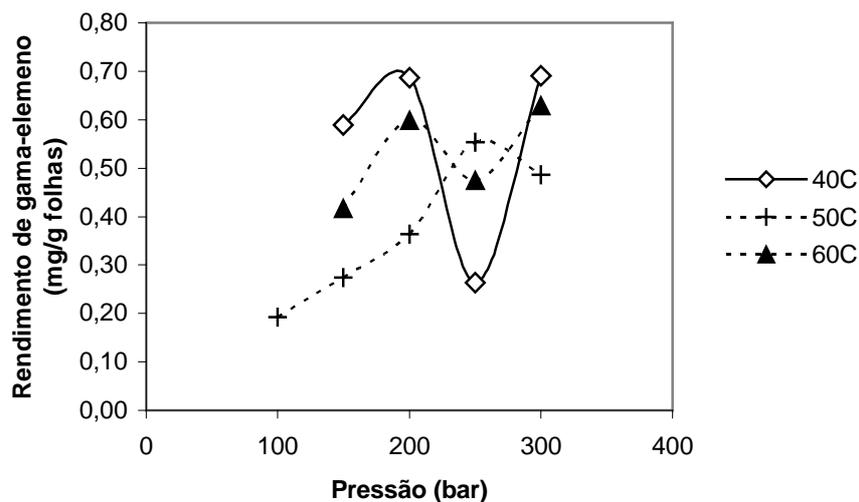


Figura 20: Rendimento do γ -elemento (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.

5.12.2 Rendimento de germacreno D

A Tabela 22 e a Figura 21 apresentam o rendimento de extração do composto germacreno D em função das condições operacionais de temperatura e pressão. Os maiores rendimentos foram obtidos nas isoterms de 40 °C e 60 °C e pressão de 200 bar.

Tabela 22: Rendimento de extração do germacreno D (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.

T (°C)	P (bar)	Rendimento global (g extrato / g folhas)	Concentração de Germacreno D no extrato (mg/g extrato)	Rendimento de extração (mg germacreno D / g folhas)
40	100	0,020	10,93	0,22
	150	0,029	21,52	0,63
	200	0,031	23,85	0,73
	250	0,026	11,20	0,29
	300	0,037	7,39	0,27
50	100	0,017		
	150	0,024	11,60	0,28
	200	0,025	7,55	0,19
	250	0,028	8,14	0,22
	300	0,032	17,09	0,54
60	100	0,015		
	150	0,021	24,28	0,51
	200	0,036	29,59	0,73
	250	0,035		
	300	0,040	8,25	0,33

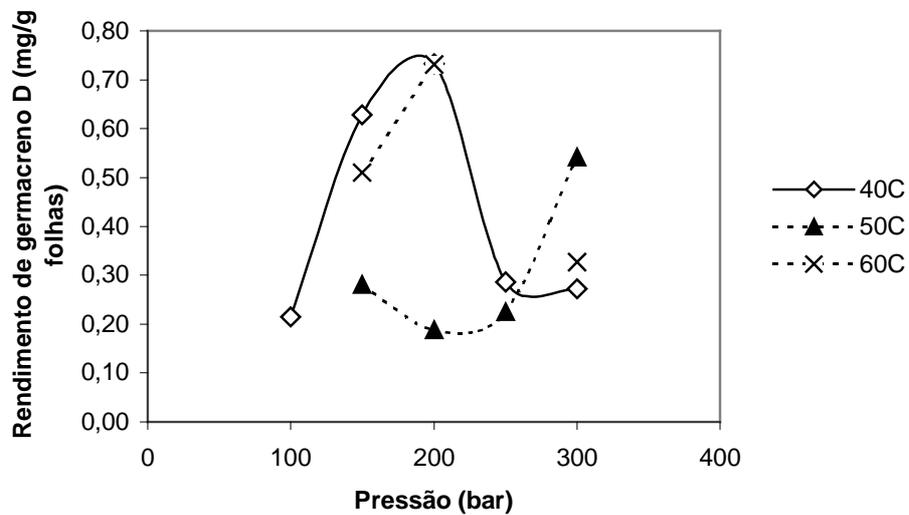


Figura 21: Rendimento do germacreno D (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.

A Tabela 23 e a Figura 22 a seguir apresentam o rendimento de extração do composto curzereno em função das condições operacionais de temperatura e pressão. O maior rendimento foi obtido a 40°C e 200 bar.

Tabela 23: Rendimento de extração do curzereno (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.

T (°C)	P (bar)	Rendimento global (g extrato / g folhas)	Concentração de curzereno no extrato (mg/g extrato)	Rendimento de extração (mg curzereno / g folhas)
40	100	0,020	97,42	1,92
	150	0,029		
	200	0,031	129,21	3,97
	250	0,026	59,67	1,53
	300	0,037	52,79	1,94
50	100	0,017	139,98	2,38
	150	0,024	59,51	1,44
	200	0,025	68,12	1,70
	250	0,028	65,76	1,81
	300	0,032	67,39	2,14
60	100	0,015	96,89	1,40
	150	0,021	56,87	1,19
	200	0,036	56,87	2,02
	250	0,035	15,46	0,55
	300	0,040	71,93	2,85

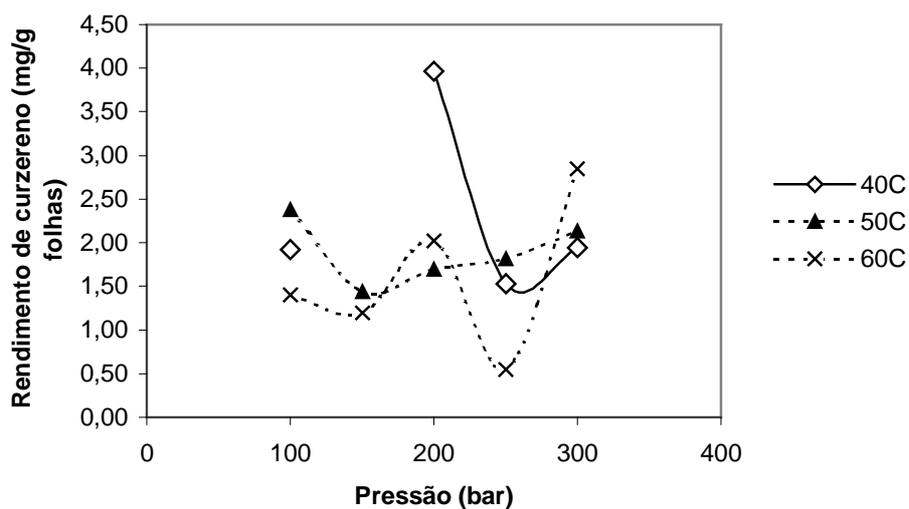


Figura 22: Rendimento do curzereno (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.

A Tabela 24 e a Figura 23 apresentam o rendimento de extração do composto germacreno B em função das condições operacionais de temperatura e pressão. Os maiores rendimentos foram obtidos nas isotermas de 40 °C e 60 °C e pressões de 200 bar e 300 bar.

Tabela 24: Rendimento de extração do germacreno B (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.

T (°C)	P (bar)	Rendimento global (g extrato / g folhas)	Concentração de germacreno B no extrato (mg/g extrato)	Rendimento de extração (mg germacreno B / g folhas)
40	100	0,020	67,00	1,32
	150	0,029	107,59	3,14
	200	0,031	114,99	3,53
	250	0,026	59,99	1,54
	300	0,037	98,02	3,61
50	100	0,017	84,38	1,43
	150	0,024	41,07	0,99
	200	0,025	55,34	1,38
	250	0,028	103,72	2,86
	300	0,032	80,46	2,55
60	100	0,015	169,85	2,46
	150	0,021	138,37	2,91
	200	0,036	98,86	3,51
	250	0,035	68,20	2,41
	300	0,040	85,18	3,37

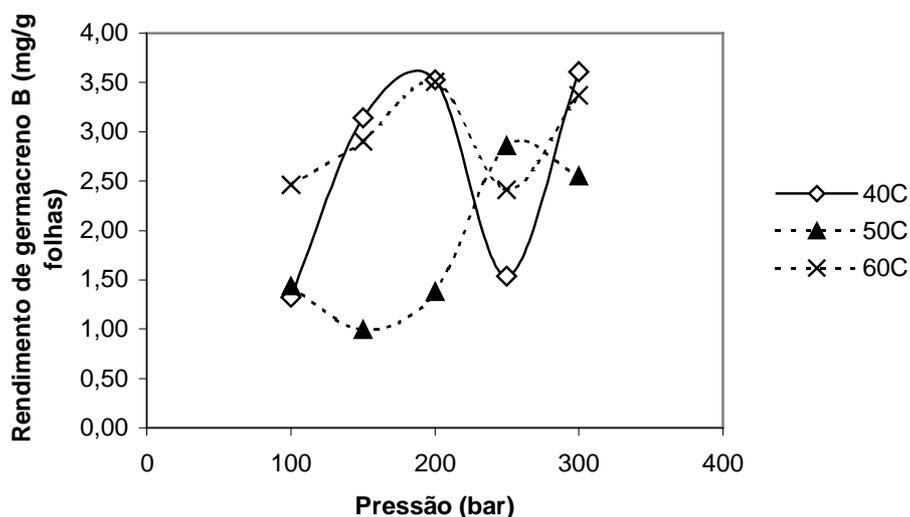


Figura 23: Rendimento do germacreno B (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.

A Tabela 25 e a Figura 24 apresentam o rendimento de extração do espatulenol em função das condições operacionais de temperatura e pressão. Os maiores rendimentos foram obtidos na isoterma de 40 °C e pressões de 200 e 300 bar.

Tabela 25: Rendimento de extração do espatulenol (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.

T (°C)	P (bar)	Rendimento global (g extrato / g folhas)	Concentração de espatulenol no extrato (mg/g extrato)	Rendimento de extração (mg espatulenol / g folhas)
40	100	0,020	13,96	0,28
	150	0,029	25,24	0,74
	200	0,031	28,37	0,87
	250	0,026	14,56	0,37
	300	0,037	24,82	0,91
50	100	0,017		
	150	0,024	12,88	0,31
	200	0,025	16,81	0,42
	250	0,028	26,21	0,72
	300	0,032	19,42	0,62
60	100	0,015		
	150	0,021	29,43	0,62
	200	0,036	23,80	0,84
	250	0,035	18,14	0,64
	300	0,040	21,79	0,86

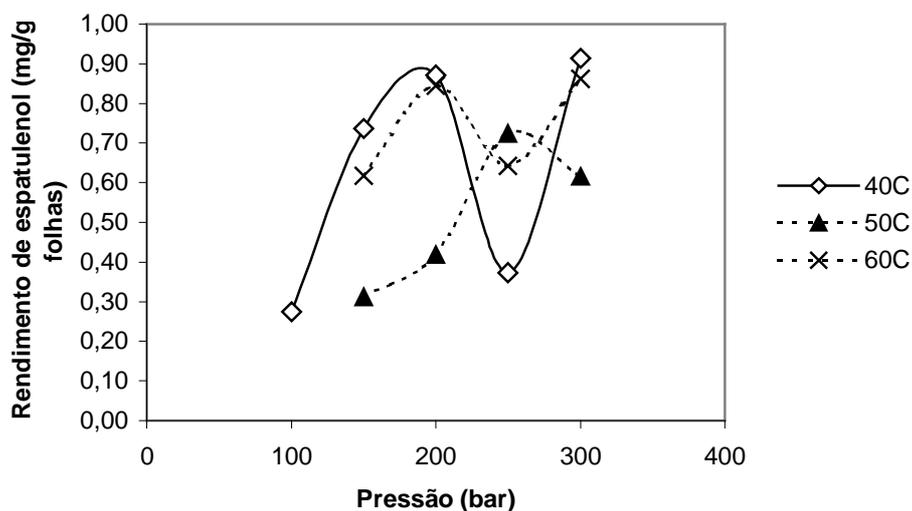


Figura 24: Rendimento do espatulenol (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.

A Tabela 26 e a Figura 25 apresentam o rendimento de extração em função das condições operacionais de temperatura e pressão do componente mais concentrado, o composto $C_{15}H_{20}O_2$ que representa entre 10 e 30 % do extrato. Os maiores rendimentos foram obtidos na isoterma de 40 °C e pressões de 150, 200 e 300 bar. A 250 bar, além do rendimento global baixo, a concentração do componente também foi baixa.

Tabela 26: Rendimento de extração do $C_{15}H_{20}O_2$ (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão de processo.

T (°C)	P (bar)	Rendimento global (g extrato / g folhas)	Concentração de $C_{15}H_{20}O_2$ no extrato (mg/g extrato)	Rendimento de extração (mg $C_{15}H_{20}O_2$ /g folhas)
40	100	0,020	142,26	2,80
	150	0,029	245,45	7,17
	200	0,031	239,09	7,34
	250	0,026	127,87	3,27
	300	0,037	198,28	7,30
50	100	0,017	311,60	5,30
	150	0,024	95,37	2,31
	200	0,025	110,30	2,75
	250	0,028	208,06	5,74
	300	0,032	174,23	5,52
60	100	0,015	271,74	3,94
	150	0,021	272,42	5,72
	200	0,036	162,68	5,78
	250	0,035	124,23	4,40
	300	0,040	157,49	6,24

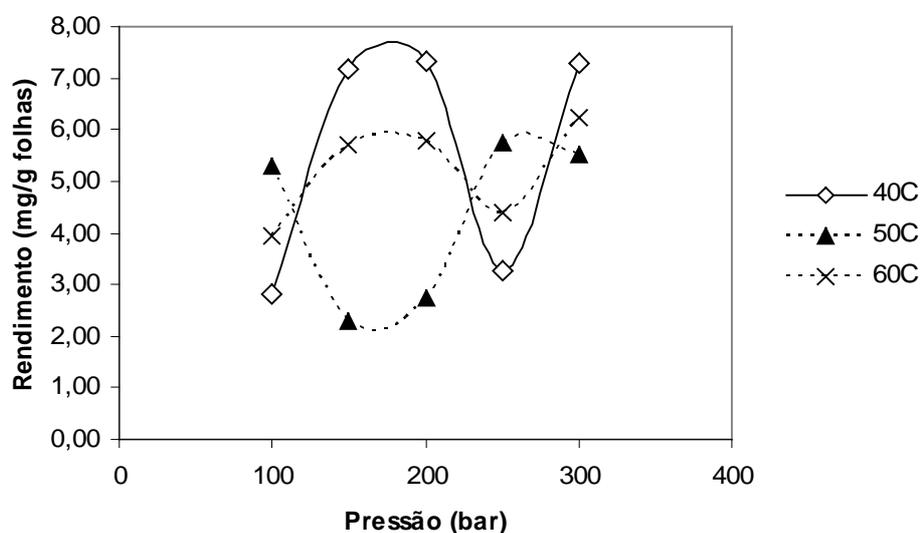


Figura 25: Rendimento do $C_{15}H_{20}O_2$ (mg/g folhas) em função da temperatura e pressão.

Como conclusão da análise do rendimento individual dos compostos majoritários presentes nos extratos obtidos via extração supercrítica das folhas de *E. uniflora* tem-se que para todos os compostos, a condição 40 °C e 200 bar foi no geral, a que produziu os maiores rendimentos de extração, seguida da condição 40 °C e 300 bar e da condição 60 °C e 300 bar.

Na condição 40 °C e 250 bar, além de ser obtido baixo rendimento global de extração, as concentrações nos extratos também foram menores que nas outras condições de pressão. É uma condição atípica, como pode ser vista na Figura 4, que representa o rendimento global de extração.

Uma possível explicação para essa condição atípica, de diminuição do rendimento global com aumento de pressão e menores composições dos componentes alvos, é a possibilidade de formação de mais de duas fases no equilíbrio e a obtenção de um extrato com composição diferenciada. Nesta condição, cujas extrações foram feitas em triplicata, o desvio padrão foi de 0,12 % e o erro experimental de 4,50 %. Além disso, para confirmar estes valores, duas novas extrações foram feitas e estes valores continuaram na mesma faixa de rendimento.

5.13 Determinação do teor de fenóis totais dos extratos obtidos das folhas de *E. uniflora*

5.13.1 Determinação de fenóis e polifenóis

Os extratos obtidos por hidrodestilação, por extração supercrítica, com álcool e hexano foram dissolvidos em metanol (Ecibra, lote16.755, Santo Amaro, SP), a fim de se obter uma concentração de 0,5 mg sólidos/mL, e analisados utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A quantidade total de fenóis dos extratos foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico como ilustra Figura 26.

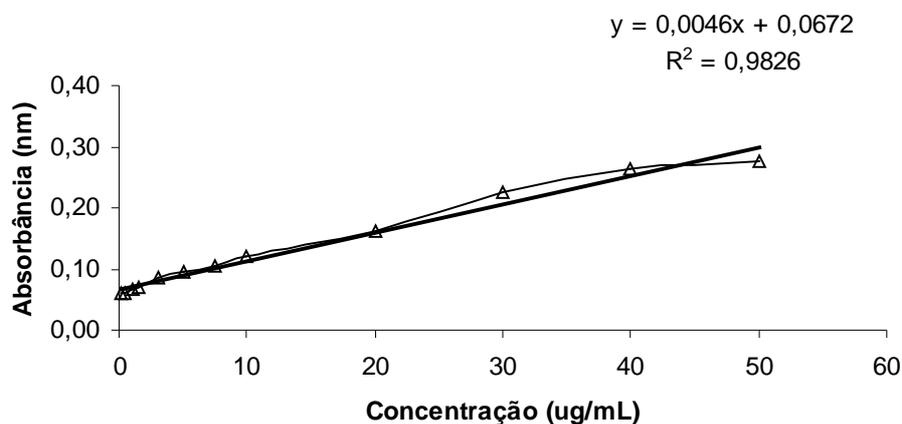


Figura 26: Curva padrão de ácido gálico.

A Tabela 27 mostra os valores médios de atividade antioxidante expressa em g ácido gálico/Kg de extrato para os extratos obtidos via extração supercrítica, por hidrodestilação, com álcool hidratado e hexano.

Tabela 27: Atividade antioxidante expressa em g ácido gálico/Kg de extrato para os extratos obtidos via extração supercrítica, por hidrodestilação, com álcool hidratado e hexano.

T (°C)	P (bar)	Média das concentrações (g ácido gálico/Kg extrato)	Desvio Padrão
40	100	5,207	0,374
	150	3,032	0,166
	200	3,843	0,229
	250	4,718	0,236
	300	3,729	0,186
50	100	2,663	0,133
	150	15,174	0,079
	200	3,778	0,189
	250	3,636	0,182
	300	3,494	0,162
60	100	2,100	0,121
	150	4,115	0,266
	200	5,222	0,261
	250	8,959	0,263
	300	2,914	0,146
Hidrodestilação		73,681	8,080
Extrato etanólico		349,67	15,239
Extrato hexânico		6,721	0,917

Os valores de concentrações médias das substâncias redutoras presentes nos extratos indicam que o extrato obtido com etanol é o que apresenta maior atividade antioxidante dentre todos os extratos obtidos das folhas de *E. uniflora*. O extrato obtido por hidrodestilação foi o que apresentou o segundo valor mais alto. Dos extratos obtidos por extração supercrítica, o da condição 50 °C e 150 bar foi o que mostrou maior potencial antioxidante. A isoterma de 50 °C mostrou maior potencial antioxidante dentre as isotermas estudadas. Não foi realizada a análise de DPPH dos extratos obtidos por extração supercrítica, pois a análise de fenóis totais indicou que tais extratos não apresentariam altos valores de atividade antioxidante.

5.13.2 Avaliação *in vitro* de atividade antioxidante

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH, de coloração púrpura

que absorve a 515 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R^{*}), o DPPH^{*} é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (Brand-Williams et al.,1995; Sánchez-Moreno et al.,1998).

Por ser uma análise de potencial antioxidante da fração hidrofílica da matriz vegetal, foi feita a análise de DPPH do extrato obtido com álcool hidratado.

A Tabela 28 mostra os valores de redução média para dez concentrações de extrato, e os respectivos valores de redução média, que forneceram a equação da curva de redução e conseqüentemente o valor do CI₅₀.

Tabela 28: Redução média do extrato etanólico das folhas de *E. uniflora*.

Concentração de extrato (µg/mL)	Redução média (%)
21,58	93,35
22,58	94,35
23,58	95,35
24,58	96,35
25,58	97,35
26,58	98,35
27,58	99,35
28,58	100,35
29,58	101,35
30,58	102,35

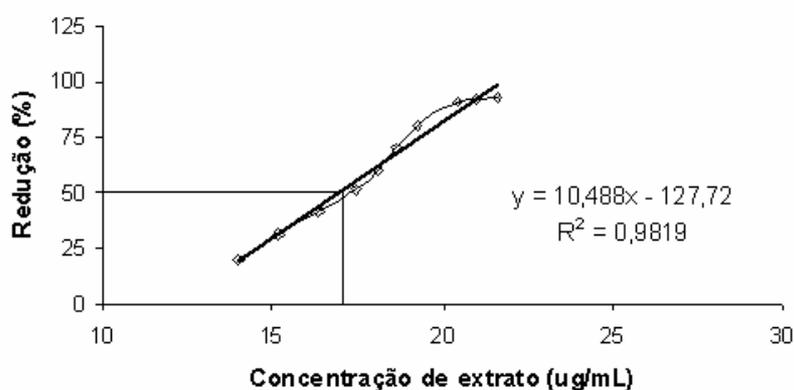


Figura 27: Curva de redução do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*.

Pela equação da curva de redução do extrato analisado, obtem-se o valor de CI_{50} para o extrato etanólico das folhas de pitangueira de 16,95 $\mu\text{g/mL}$.

A Tabela 29 mostra os valores de CI_{50} para amostras de frutos do gênero *Eugenia* (Reynertson et al., 2005) e chás de folhas (Atoui et. al., 2005). Os valores de inibição do extrato etanólico de folhas de pitangueira mostra que a inibição de 16,95 $\mu\text{g/mL}$ expressa uma redução significativa comparado com os resultados obtidos tanto para as os frutos do gênero *Eugenia* como para os chás de eucalipto, menta e camomila, por exemplo. Segundo Reynertson et al. (2005), um extrato cujo valor de CI_{50} é menor que 50 $\mu\text{g/mL}$ é considerado muito ativo, e isso pode ser observado tanto para o extrato etanólico analisado tanto para os frutos de *Eugenia uniflora*.

Tabela 29: Valores de CI_{50} para amostras de frutos do gênero *Eugenia* e de chás.

Espécie	Nome popular	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Eugenia aggregata</i>	Cereja do Rio Grande	74,1
<i>Eugenia foetida</i>		15,9
<i>Eugenia stipitata</i>	Araçá-boi	79,0
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	19,6
<i>Eugenia uniflora</i>	Folhas de pitanga	≈ 17,0
Chás		
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Chinês	15,0
<i>Camellia sinensis</i>	Preto	17,0
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	24,0
<i>Mentha piperita</i>	Menta	46,0
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila	59,0

Para a determinação a atividade antioxidante pelo método de ORAC, foram feitas leituras de duas frações do extrato das folhas; da fração hidrofílica e da fração lipofílica. Para a determinação da atividade antioxidante da fração hidrofílica foi usado etanol como solvente e para a a determinação da atividade antioxidante da fração lipofílica foi usado hexano como solvente. A atividade antioxidante total (TAC) do extrato foi obtida somando o resultado das frações hidrofílica e lipofílica.

As leituras das diferentes concentrações do padrão de Trolox usadas no cálculo do Trolox Equivalente da amostra estão apresentadas nas Figuras 28 e 29.

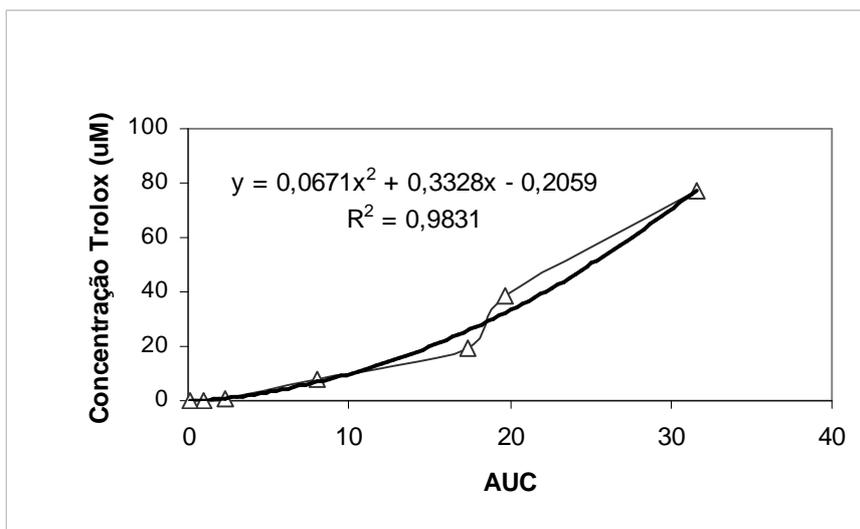


Figura 28: Trolox hidrofílico.

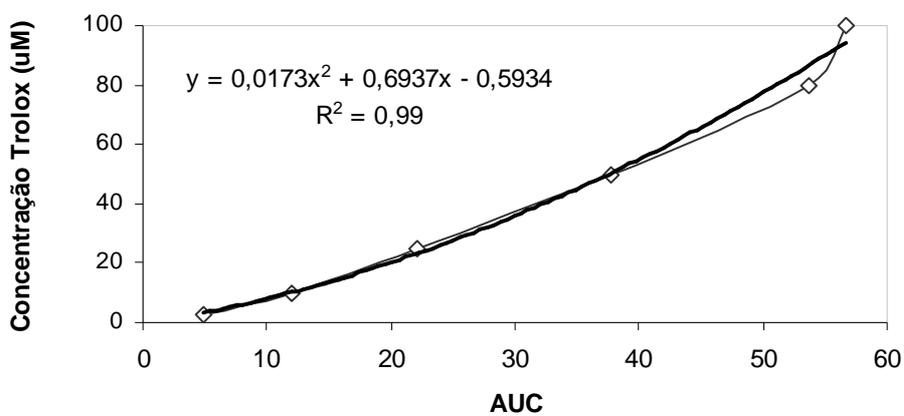


Figura 29: Trolox lipofílico.

Folhas de pitangueira extração com etanol = 519,46 µM Trolox Equivalente / g extrato

Folhas de pitangueira extração com hexano = 6,47 µM Trolox Equivalente / g extrato

TAC (Atividade Antioxidante Total) = 525,94 µM Trolox Equivalente / g extrato

A Tabela 30 mostra os valores de μM Trolox Equivalente / g extrato para amostras de chás de folhas (Atoui et. al., 2005), os valores de inibição do extrato de folhas de pitangueira pela metodologia ORAC mostra que a inibição de 525,94 μM Trolox Equivalente / g extrato expressa uma redução significativa, comparável aos chás chinês e preto e superior ao chá de eucalipto, menta e camomila.

Tabela 30: Valores de Trolox Equivalente para amostras de chás comparado aos de extrato de folhas de pitangueira.

Espécie	Chás	μM TE/g extrato
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Chinês	570
<i>Camellia sinensis</i>	Preto	540
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	380
<i>Mentha piperita</i>	Menta	210
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila	170
	Extrato	
<i>Eugenia uniflora</i>	Folhas de Pitanga	≈ 526

5.14 Modelagem termodinâmica clássica

Por se tratar de um extrato natural, constituído de uma mistura complexa de compostos, não foi possível a partir das informações disponíveis, calcular a composição das fases e equilíbrio empregando modelagem termodinâmica. Nesse sentido, optou-se por estimar valores de solubilidade dos principais compostos da mistura para verificar se esta pode fornecer algum indicativo do comportamento da composição dos extratos obtidos.

A modelagem termodinâmica clássica que emprega a equação de estado de Peng-Robinson combinada à regra de mistura clássica de van der Waals foi usada. Foram escolhidos para a análise os seguintes compostos: γ -elemeno, curzereno, germacreno B, espatulenol e veleral.

O composto veleral foi o composto indicado pela biblioteca Nist como sendo o mais provável para identificação do éster $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$, composto majoritário presente nos extratos obtidos por extração supercrítica, porém ele é exclusivamente sintetizado pelo fungo *Lactarius vellereus* (Danielwski et al., 1988). Sendo assim, na tentativa de tentar

representar o éster C₁₅H₂₀O₂, optou-se pela estrutura do veleral na tentativa de estimar a solubilidade deste composto.

A Tabela 31 apresenta as propriedades críticas e o fator acêntrico que foram estimados por métodos de contribuição de grupos. Para o CO₂ os valores são experimentais (Angus et al., 1976). Os parâmetros de interação entre os compostos e o CO₂ foram adotados K_{a12}=0,11 (Akgün et al., 1999) e nulos entre os compostos do extrato.

Tabela 31: Dados de propriedades críticas e fator acêntrico para os compostos escolhidos para a modelagem termodinâmica.

Componente	Massa Molar	Tb (K)	Tc (K)	Pc (bar)	ω
γ -elemeno	204,35	596,84	803,36	19,28	0,5852
curzereno	216,32	630,76	851,48	19,99	0,5862
espatulenol	220,35	646,44	846,06	20,43	0,8105
veleral	232,35	658,88	833,54	21,28	1,1377
germacreno D	204,35	584,29	799,66	20,68	0,5229
germacreno B	204,35	602,41	831,32	23,95	0,5492
CO ₂	44,01	194,70	304,10	73,75	0,2250

As estruturas dos componentes em questão estão apresentadas nas Figuras 30 a 35.

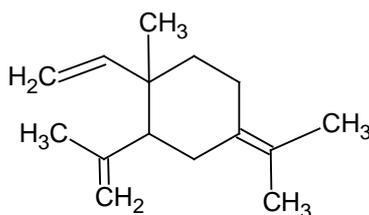


Figura 30: Fórmula estrutural do componente γ -elemeno.

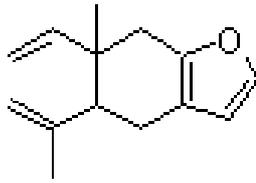


Figura 31: Fórmula estrutural do componente curzereno.

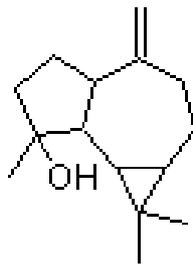


Figura 32: Fórmula estrutural do componente spatulenol.

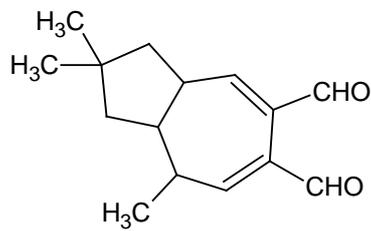


Figura 33: Fórmula estrutural do componente veleral.

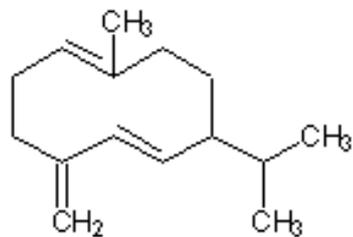


Figura 34: Fórmula estrutural do componente germacreno D.

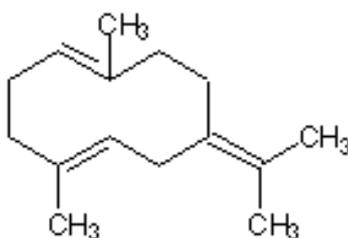


Figura 35: Fórmula estrutural do componente germacreno B.

A Tabela 32 apresenta os valores de fração mássica de γ -elemeno para as temperaturas estudadas em função da pressão, estimados pela modelagem termodinâmica.

Tabela 32: Estimativa da solubilidade em fração molar e mássica de γ -elemeno para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

T (°C)	P(bar)	Mol γ -elemeno/Mol total	Fração mássica (g γ -elemeno/Kg CO ₂)
40	100	2,53E-03	11,74
	150	6,67E-03	30,97
	200	8,33E-03	38,66
	250	8,98E-03	41,72
	300	8,98E-03	41,70
50	100	4,51E-04	2,09
	150	5,63E-03	26,14
	200	8,82E-03	40,96
	250	1,05E-02	48,79
	300	1,13E-02	52,55
60	100	2,13E-04	0,99
	150	3,89E-03	18,05
	200	8,43E-03	39,16
	250	1,14E-02	52,96
	300	1,32E-02	61,37

A Figura 36 permite melhor visualização do comportamento da solubilidade do composto γ -elemeno estimado pela modelagem termodinâmica clássica, para as isotermas de 40, 50 e 60 °C.

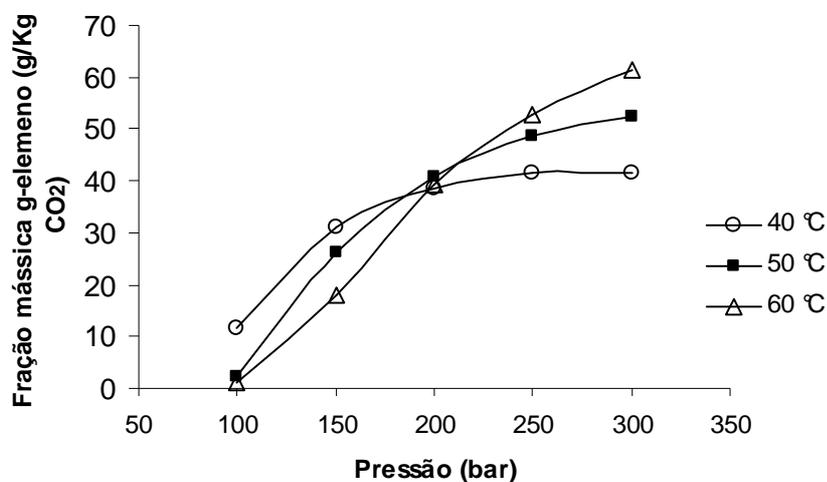


Figura 36: Estimativa da solubilidade em fração mássica do γ -elemento para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

A análise gráfica da Figura 36 permite concluir que ocorre aumento no valor da solubilidade em função da pressão para as três temperaturas estudadas, e que na pressão de 200 bar os valores de solubilidade se coincidem. Neste ponto também pode ser observada a inversão do comportamento da solubilidade do composto, ou seja, há comportamento retrógrado abaixo de 200 bar. Este efeito é justificado pois os valores de solubilidade eram maiores para a temperatura de 40 °C com os sucessivos incrementos de pressão, e depois de 200 bar, os maiores valores de solubilidade para aumentos graduais de pressão são observados para a temperatura de 60 °C. O maior valor de solubilidade encontrada para este composto foi a 60 °C e 300 bar e corresponde a 61,37 g/Kg CO₂.

A Tabela 33 apresenta os valores de solubilidade em fração mássica do curzereno para as temperaturas estudadas em função da pressão.

Tabela 33: Estimativa da solubilidade em fração molar e mássica do curzereno para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

T (°C)	P(bar)	Mol curzereno/Mol total	Fração mássica (g curzereno/Kg CO ₂)
40	100	1,11E-03	5,44
	150	3,59E-03	17,66
	200	4,81E-03	23,65
	250	5,44E-03	26,73
	300	5,73E-03	28,18
50	100	1,73E-04	0,85
	150	2,82E-03	13,84
	200	4,83E-03	23,76
	250	4,83E-03	29,98
	300	6,79E-03	33,35
60	100	7,72E-05	0,38
	150	1,82E-03	8,93
	200	4,40E-03	21,62
	250	6,29E-03	30,94
	300	7,58E-03	37,25

A Figura 37 permite análise do comportamento da solubilidade do composto curzereno para as isothermas estudadas de acordo com incrementos graduais de pressão. Pode ser observado que nas três temperaturas, os valores de solubilidade se coincidem na pressão de 200 bar, e que depois desse ponto ocorre uma inversão do comportamento das isothermas, os valores de solubilidade que eram maiores para a temperatura de 40 °C, se tornaram menores e os valores de solubilidade da isoterma de 60 °C que eram menores, tornaram-se maiores. A condição operacional de 60 °C e 300 bar foi a que apresentou o maior valor de solubilidade, de 37,25 g/Kg de CO₂.

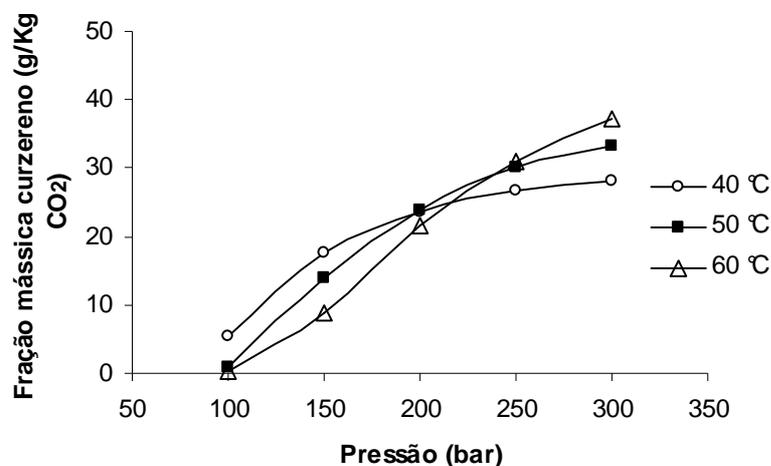


Figura 37: Estimativa da solubilidade em fração mássica do curzereno para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

Os valores de solubilidade em fração mássica do espatulenol para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão estão apresentados na Tabela 34.

No estudo do espatulenol, para as três temperaturas ocorreu aumento dos valores de solubilidade com incrementos de pressão até a pressão de 250 bar. A partir daí, na pressão de 300 bar, ocorreu uma inversão deste comportamento e os valores de solubilidade que eram maiores para a temperatura de 40 °C, se tornaram menores; e a condição operacional de 60 °C e 300 bar foi a que apresentou o maior valor de solubilidade, de 15,713 g/Kg de CO₂. O comportamento do espatulenol nas três temperaturas estudadas em função pode ser observado graficamente na Figura 38.

Tabela 34: Estimativa da solubilidade em fração mássica de espatulenol para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

T (°C)	P(bar)	Mol espatulenol/Mol total	Fração mássica (g espatulenol/Kg CO ₂)
40	100	2,56E-04	1,28
	150	1,19E-03	5,96
	200	1,85E-03	9,26
	250	2,31E-03	11,57
	300	2,64E-03	13,20
50	100	3,29E-05	0,16
	150	8,47E-04	4,24
	200	1,74E-03	8,69
	250	2,43E-03	12,14
	300	2,94E-03	14,74
60	100	1,42E-05	0,07
	150	5,08E-04	2,54
	200	1,49E-03	7,48
	250	2,40E-03	12,01
	300	3,14E-03	15,71

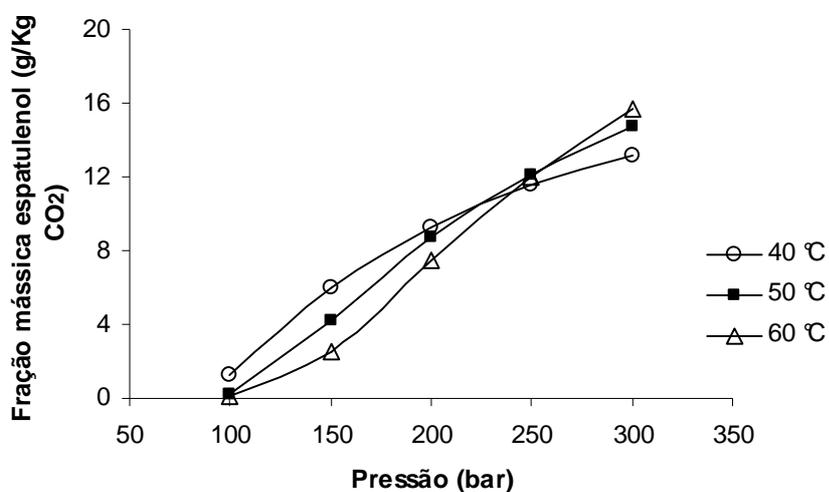


Figura 38: Estimativa da solubilidade em fração mássica do espatulenol para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

A Tabela 35 apresenta os valores de solubilidade em fração mássica do veleral para as temperaturas estudadas em função da pressão.

O comportamento da solubilidade do composto veleral se assemelha com o comportamento do curzereno em três pontos. Primeiramente pelo aumento gradual das solubilidades em cada temperatura para incrementos de pressão, depois pelo fato de os maiores valores de solubilidade até a pressão de 250 bar foram encontrados para a temperatura de 40 °C e por fim, porque a inversão deste comportamento ocorreu também na pressão de 250 bar. Os valores mais altos de solubilidade foram encontrados para a pressão de 300 bar e alcançaram respectivamente, para as três temperaturas analisadas, 4,08; 4,42 e 4,62 g/Kg de CO₂.

Tabela 35: Fração mássica de veleral para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

T (°C)	P(bar)	Mol veleral/Mol total	Fração mássica (g veleral/Kg CO ₂)
40	100	3,58E-05	0,18
	150	2,50E-04	1,25
	200	4,63E-04	2,32
	250	6,51E-04	3,26
	300	8,14E-04	4,08
50	100	3,64E-06	0,02
	150	1,64E-04	0,82
	200	4,15E-04	2,08
	250	6,60E-04	3,31
	300	8,84E-04	4,42
60	100	1,56E-06	0,01
	150	9,26E-05	0,46
	200	3,45E-04	1,73
	250	6,38E-04	3,19
	300	9,23E-04	4,62

O comportamento da solubilidade do veleral nas três temperaturas estudadas em função pode ser observado graficamente na Figura 39.

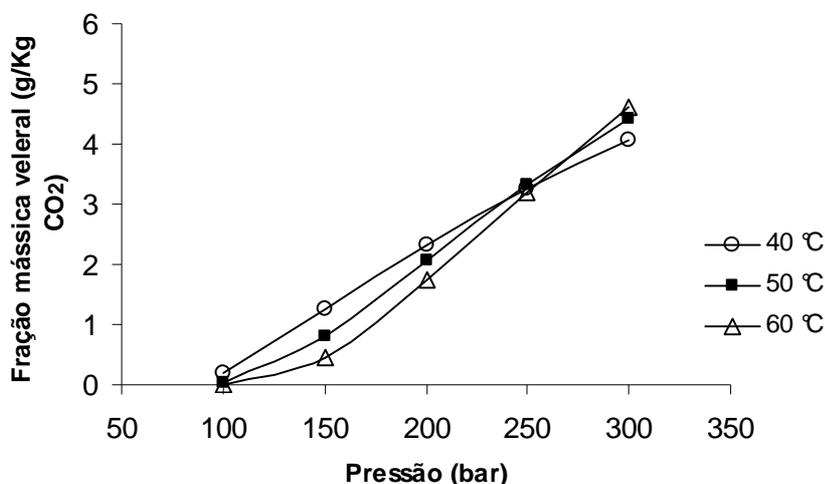


Figura 39: Estimativa da solubilidade em fração mássica do veleral para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

A Tabela 36 apresenta os valores de solubilidade em fração mássica do germacreno D para as temperaturas estudadas em função da pressão. Também para este composto ocorreu incrementos sucessivos nos valores de solubilidade em função de incrementos de pressão para cada temperatura e os valores de solubilidade na isoterma de 40 °C foram mais altos do que para as isotermas de 50 e 60 °C até a pressão de 200 bar. No caso do germacreno B, o ponto de inversão ocorreu na pressão de 200 bar, onde o comportamento do valor da solubilidade da isoterma de 60 °C passa a ser maior do que para a isoterma de 40 °C. O maior valor de solubilidade encontrado foi de 81,16 g/Kg de CO₂. O comportamento do germacreno D nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão pode ser observado graficamente na Figura 40.

Tabela 36: Estimativa da solubilidade em fração mássica de germacreno D para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

T (°C)	P(bar)	Mol germacreno D/Mol total	Fração mássica (g germacreno D/Kg CO ₂)
40	100	3,45E-03	16,00
	150	8,79E-03	40,82
	200	1,11E-02	51,40
	250	1,21E-02	56,21
	300	1,24E-02	57,80
50	100	6,43E-04	2,98
	150	7,37E-03	34,23
	200	1,16E-02	53,66
	250	1,39E-02	64,63
	300	1,52E-02	70,52
60	100	3,14E-04	1,46
	150	5,10E-03	23,67
	200	1,09E-02	50,74
	250	1,49E-02	69,15
	300	1,75E-02	81,16

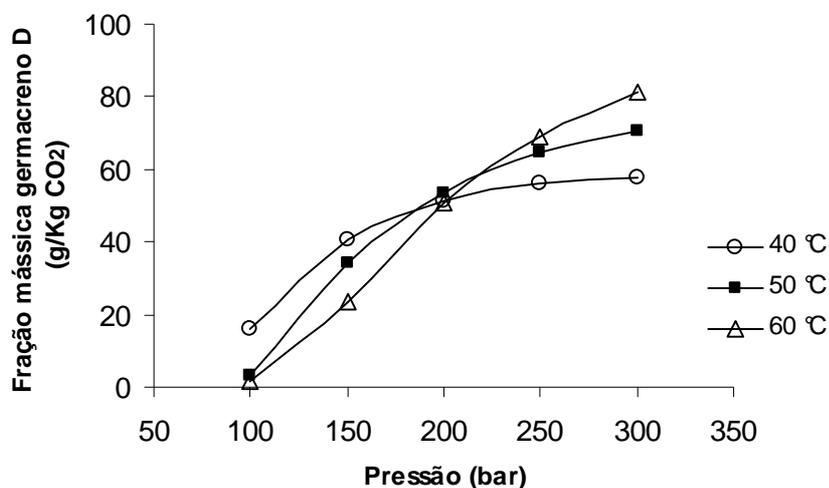


Figura 40: Estimativa da solubilidade em fração mássica do germacreno D para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

Os valores de solubilidade em fração mássica do germacreno B, para temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão estão apresentados na Tabela 37.

Tabela 37: Estimativa da solubilidade em fração mássica de germacreno B para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

T (°C)	P(bar)	Mol germacreno B/Mol total	Fração mássica (g germacreno B/Kg CO ₂)
40	100	1,30E-03	6,04
	150	4,41E-03	20,46
	200	6,27E-03	29,13
	250	7,51E-03	34,88
	300	8,35E-03	38,78
50	100	2,29E-04	1,06
	150	3,32E-03	15,39
	200	5,96E-03	27,66
	250	7,86E-03	36,50
	300	9,24E-03	42,92
60	100	1,14E-04	0,53
	150	2,13E-03	9,89
	200	5,22E-03	24,26
	250	7,78E-03	36,11
	300	9,78E-03	45,40

O comportamento da solubilidade do germacreno B é semelhante ao comportamento das solubilidades do espatulenol e do curzereno nos mesmos pontos pelo aumento gradual das solubilidades em cada temperatura para incrementos de pressão, pelo fato de os maiores valores de solubilidade até a pressão de 250 bar serem encontrados para a temperatura de 40 °C e por fim, porque a inversão deste comportamento ocorreu também na pressão de 250 bar. O valor mais alto de solubilidade foi encontrado para a pressão de 60 °C e 300 bar e alcançou 45,402 g/Kg de CO₂.

O comportamento da solubilidade do germacreno B nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão pode ser observado graficamente na Figura 41.

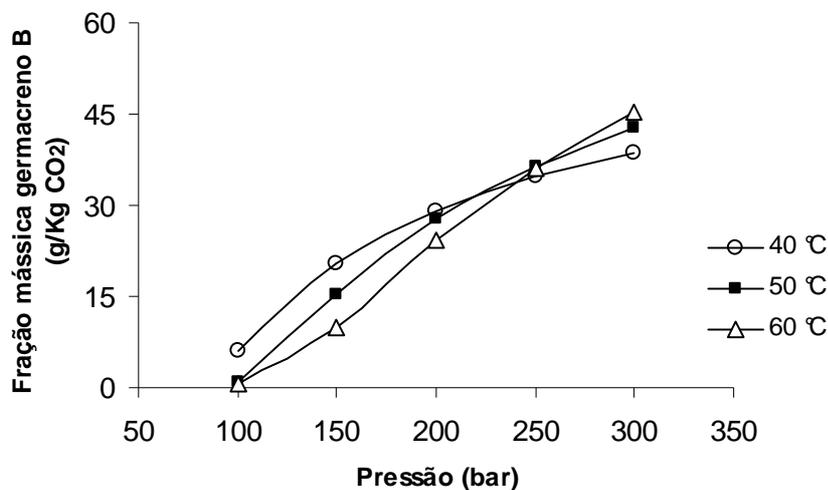


Figura 41: Estimativa da solubilidade em fração mássica do germacreno B para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C em função da pressão.

As Figuras 42, 43 e 44 apresentam graficamente os valores de fração mássica para os compostos γ -elemeno, curzereno, espatulenol, veleral, germacreno D e germacreno B para aumentos sucessivos na pressão em cada temperatura estudada.

Como pode ser observado na Figura 42, os maiores valores de solubilidade encontrados na isoterma de 40 °C foram para o composto germacreno D, seguido do γ -elemeno e do germacreno B. Pode ser observado também o aumento dos valores de solubilidade em função de incrementos de pressão para todos os compostos.

A Figura 43 apresenta a comparação do comportamento dos compostos para a isoterma de 50 °C. O composto germacreno D, seguido do γ -elemeno e do germacreno B foram, como na isoterma de 40 °C, os que apresentaram maiores valores de solubilidade. A particularidade desta isoterma está no fato de que na pressão de 100 bar os valores de solubilidade dos compostos analisados foram muito baixos, e ocorreu aumentos significativos nestes valores principalmente para os três compostos que apresentaram os maiores valores de solubilidade.

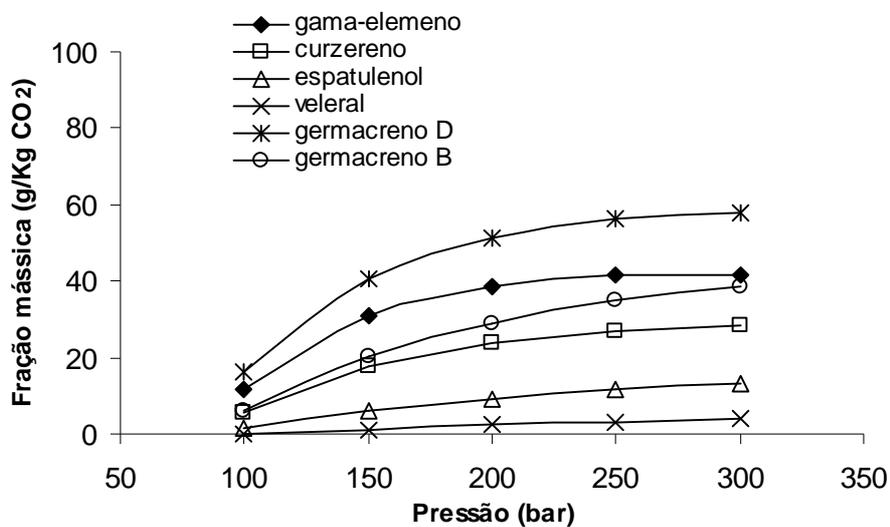


Figura 42: Comparativo da solubilidade fração mássica dos compostos: γ -elemeno, curzereno, espatulenol, veleral, germacreno D e germacreno B em função da pressão, para a isoterma de 40 °C.

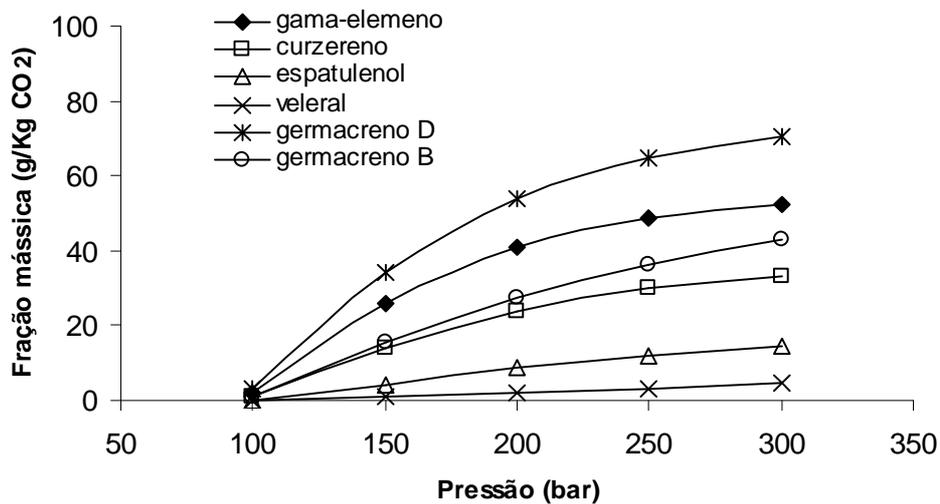


Figura 43: Comparativo da solubilidade em fração mássica dos compostos: γ -elemeno, curzereno, espatulenol, veleral, germacreno D e germacreno B em função da pressão, para a isoterma de 50 °C.

A Figura 44 apresenta o comparativo do comportamento da solubilidade dos compostos analisados para a isoterma de 60 °C. Os compostos germacreno D, γ -elemeno e germacreno B, como nas outras duas isotermas, continuaram sendo os compostos de maior valor da solubilidade. Na pressão de 100 bar, os valores de fração mássica também foram muito pouco expressivos, porém houve maior influência dos incrementos de pressão nos valores de fração mássica do que para a isoterma de 50 °C.

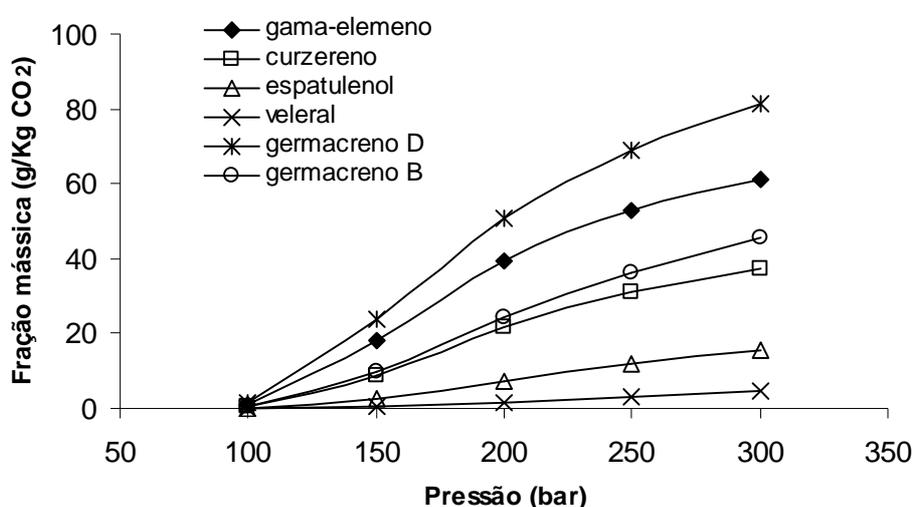


Figura 44: Comparativo da solubilidade da fração mássica dos compostos: γ -elemeno, curzereno, espatulenol, veleral, germacreno D e germacreno B em função da pressão, para a isoterma de 60 °C.

Os pontos de cruzamento obtidos em todas as estimativas de solubilidade situaram-se entre 200 e 250 bar, este comportamento deve influenciar no rendimento de extração, se forem considerados todos os compostos do extrato. No caso dos compostos analisados, que representam aproximadamente 40 % do extrato, os pontos de cruzamento das curvas de solubilidade foram superiores ao ponto de cruzamento de pressão para as curvas de rendimento global.

Outro fato que pode ser observado é que a solubilidade do $C_{15}H_{20}O_2$ (adotado como veleral) foi a menor entre os compostos analisados, no entanto foi o de maior concentração nos extratos.

6. Conclusões

As condições de extração supercrítica que apresentaram maior rendimento foram 40 °C e 300 bar e 60 °C nas pressões de 250 e 300 bar, que correspondem à 3,68, 3,54 e 3,96 %, respectivamente, com os respectivos erros de 12,82; 6,15 e 5,74 %.

Os compostos majoritários encontrados no extrato obtido por hidrodestilação foram curzereno (34,76 %), germacreno B (11,84 %) e $C_{15}H_{20}O_2$ (9,56 %). Os compostos: β -elemeno, β -cariofileno e γ -elemeno estão presentes tanto no óleo essencial das folhas como também no extrato obtido por microextração em fase sólida em concentrações apreciáveis.

Os compostos majoritários encontrados no extrato obtido por microextração em fase sólida foram 2-hexen-1-ol (18,37 %), β -mirceno (6,15 %), β -elemeno (6,24 %), β -cariofileno (6,46 %) e curzereno (6,05 %). O óleo essencial obtido por hidrodestilação e o extrato obtido por microextração em fase sólida apresentam compostos em comum. Apesar destes compostos se apresentarem em concentrações diferentes, este fato indica semelhança na composição dos mesmos.

A variedade de *E. uniflora* estudada neste trabalho não apresentou o composto selina-1-3-7(11)-trien-8-ona. Este composto é comumente encontrado na maioria das espécies de folhas de pitangueira.

O composto majoritário presente no extrato supercrítico foi o $C_{15}H_{20}O_2$ seguidos de curzereno e germacreno B.

Por se tratar de um extrato natural, constituído de uma mistura complexa de compostos, não foi possível a partir das informações disponíveis, calcular a composição das fases em equilíbrio empregando modelagem termodinâmica. Nesse sentido, optou-se a estimar a solubilidade dos principais compostos da mistura para verificar se esta poderia fornecer algum indicativo do comportamento da composição dos extratos obtidos, fato que não ocorreu.

Os valores de concentrações médias das substâncias redutoras presentes nos extratos indicam que o extrato obtido com álcool hidratado é o que apresenta maior atividade antioxidante, visto o maior conteúdo de fenóis totais, dentre todos os extratos obtidos das folhas de *E. uniflora*. O extrato obtido por hidrodestilação foi o que apresentou o segundo valor mais alto. Dos extratos obtidos por extração supercrítica, o da condição 50 °C e 150 bar foi o que mostrou maior potencial antioxidante; foi a temperatura de 50 °C que também mostrou maior potencial antioxidante dentre as isotermas estudadas, porém os extratos supercríticos apresentam baixa atividade antioxidante.

O valor do IC₅₀ para o extrato etanólico das folhas de pitangueira é 16,95 µg/mL, o que indica que este extrato é muito ativo quanto à sua atividade antioxidante.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Realizar testes de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) nos extratos obtidos via extração supercrítica com o objetivo de identificar os compostos $C_{15}H_{20}O_2$ e $C_{11}H_{18}O_2$.
- Realizar extração etanólica dos resíduos das folhas dos experimentos de extração supercrítica, para a realização de testes de análise antioxidante, visto que os extratos obtidos via supercrítica apresentaram baixa atividade antioxidante e o extrato etanólico apresentou alta atividade antioxidante.
- Realizar extrações convencionais e via supercrítica e análises de identificação de compostos e de potencial antioxidante de folhas de pitangueira de diferentes procedências.

7. Bibliografia

- A.O.A.C. Official methods of analysis. Maryland: Ed. Patricia Cunnif, 1997.
- A.O.A.C. Official Methods of Agricultural Chemistes. 16th Ed. Washington, 1995.
- Adams, R. P. **Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy**, 1995, 300p.
- Adebajo,A.C., Oloke,K.J., Aladesanmi,A.J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**, v.5, p.451-455, 1989b.
- Adebajo,A.C., Oloke,K.J., Aladesanmi,A.J. Antimicrobial activity of the leaf extract of *Eugenia uniflora*. **Phytotherapy Research**, v.3, n.6, p.258-259, 1989a.
- Akgün,M., Akgün, N.A., Dincer,S. Phase behavior of essential oil components in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v.15, p.117-125, 1999.
- Almeida,E.C., Karnikowski,M.G.O., Foletto,R., Baldisserotto,B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista Saúde Pública**, v.29, p.428-433, 1995.
- Angely,J. **Flora analítica do Paraná**. São Paulo: USP, p.487-491, 1965.
- Angus,S., Armstrong,B., Reuck,K.M. **International Thermodynamic Table of the Fluid State: Carbon Dioxide**. 1^o.ed. London: Pergamon Press, 1976, v.3, 385p.
- Arai,I., Amagaya,S., Komatsu,Y., Okada,M., Hayashi,T., Kasai,M., Arisawa,M., Monose,Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglycemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, p.307-314, 1999.
- ASAE Standards. **Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving**. ASAE, S319.3, 547, 1997.
- Atoui,A.K., Mansouri,A., Boskou,G.,Kefalas,P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v.89, p.27-36, 2005.
- Batistela,C.B., Wolf-Maciel,M.R. Modeling, simulation and analysis of molecular distillators: centrifugal and falling film. **Computers and Chemical Engineering**, v.20, n.5, p.19-24, 1996.
- Bangalore,D.V., McGlynn,W., Scott,D.D. Effect of -cyclodextrin in improving the correlation between lycopene concentration and ORAC values. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p.1878-1883, 2005.

Barreiros,A.L.B.S., David,J. M., David,J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

Bonoli,M., Verardo,V., Marconi,E., Caboni,M.F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p. 5195 -5200, 2004.

Bott,T.R. Fundamentals of carbon dioxide in solvent extraction. **Chemistry and Industry**, v.12, p.394-396, 1982.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

Brunner,G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process**. New York: Springer, 1994, 387p.

Cao G., Alessio H. M., Cutler R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v.14, p.303-311,1993.

Christen,Y. Oxidative stress and Alzheimer's disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.621S-629S, 2000.

Chun,S.-S., Vatem, D.A., Lin,Y.-T. Shetty,K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* **Process Biochemistry**, v.40, p.809-816, 2005.

Collins,C.H.; Braga,G.L., Bonato,P.S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: Editora da Unicamp,1997.

Consolini,A.E., Bandini,O.A.N., Amat,A.G. Pharmacological basis for empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.33-39, 1999.

Danielwski,W.M., Kroszczyński,W., Skibicki,P., Bernardi,M., Fonza,G., Vidari,G., Vita-Finzi,P. Normarasmic sesquiterpenes from *Lactarius vellereus*. *Phytochemistry*, v.27, p.187-191, 1988.

Davalos A., Gomez-Cordoves C., Bartolome B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.48-54, 2004.

Fadeyi,M.O., Akpan,U.E. Antibacterial activities of the leaf extracts of *Eugenia uniflora* Linn. (Synonym *Stenocalyx michelli* Linn.) Myrtaceae. **Phytotherapy Research**, v.3, p.154-155, 1989.

Ferro,E., Schinini,A., Maldonado,M., Rosner,J., Hirschmann,G.S. *Eugenia uniflora* leaf extract and lipid metabolism in *Cebus apella* monkeys. **Journal of Ethnopharmacology**, v.24, p.324-325, 1988.

- Ficarra,R., Tommasinib,S., Ranerib,D., Calabroa,M.L., Di Bellab,M.R., Rustichellic,C., Gamberinic,M.C., Ficarra,P. Study of flavonoids/ β -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p.1005-1014, 2002.
- Gbolade,A.A., Ilesanmi,O.R., Aladesanmi,A.J. Thecontractile effects of the extracts of *Eugenia uniflora* on isolated rat duodenum. **Phytotherapy Research**, v.10, p.613-615, 1996.
- Giddings,J.C., Myers,M.N., McLaren,L., Keller,R.A., **Science**, v.162, p.67-73, 1968.
- Gomes,R.P. **Fruticultura Brasileira**. 2.ed. São Paulo: Nobel, 1975. 446p.
- Haslam,E., Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215, 1996.
- Henriques,A.T., Sobral,M.E., Cauduro,A.D. Aromatic plants from Brazil II: the chemical composition of some *Eugenia* essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v.5, p.501–505, 1993.
- Hou,W.-C., Lin,R.-D., Cheng,K.-T., Hung,Y.-T., Cho,C.-H., Chen,C.-H., Hwang,S.-Y., Lee,M. H. Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. **Phytomedicine**, v.10, p.170-175, 2003.
- Huang,D., Ou,B., Prior,R.L . The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.
- Huang,F.H., Li,M.H., Lee,L.L., Starling,K.E., Chung,F.T.H. An accurate equation of state for carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v.18, n.6, p.490-496, 1985.
- Ikawa,M.; Schaper,T.D.; Dollard,C.A.; Sasner,J.J.; Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.1811-1815, 2003.
- Immirzi,A., Pertini,B. Prediction of density in organic crystals. **Acta Crystallographica**, v.A33, p.216-218, 1977.
- Jayaprakasha,F.K., Jaganmohan Rao,L. Phenolic constituents from lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. **Zeitschrift für Naturforschung Naturforsch**, v.55C, p.1018-1022, 2000.
- Jacobs,M. **The chemical analysis of foods and foods products**. 3.ed. Robert Krieger Publishing Co. Inc., p.21-28, 1973.
- Kanazawa,A., Patin,A., Greene,A. Efficiency, highly enantioselective synthesis of selina-1,3,7(11)-trien-8-one, a major component of the essential oil of *Eugenia uniflora*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1292-1294, 2000.

- Krinsky,N.I. Antioxidant functions of carotenoids - A Review. **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p.617-35, 1989.
- Lang,A.E., Lozano,A.M. Parkinson's disease. First of two parts. **New England Journal of Medicine**, v.339, p.111-114, 1998.
- Laws,D.R.J., Bath,N.A. Ennis,C.S., Wheldon,A.G. Hop extration with carbon dioxide. US Pat, n.4. n.218,491, 1980.
- Lee,M-H., Chiou,J-F, Yen,K-Y, Yang,L-L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, v.154, p.131-136, 2000.
- Lee,M-I., Nishimoto,S., Yang,L-L., Yen,K-Y., Hatano,T., Yoshida,T., Okuda,Y. Two macrocyclic hydrolysabletannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v.44, p.1343-1349, 1997.
- Lewis, G. N.; Randall, M.; **Thermodynamics**, McGraw-Hill, New York, 1961, p.184.
- Lima,E.O., Gompertz,O.F., Giersbrecht,A.M., Paulo,M.Q. In vitro antifungal activity of essencial oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, p.333-336, 1993.
- Maia,J.G.S., Zoghbi,M.G.B., Luz,A.I.R. Essential oil of *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. **Journal of Essential Oil Reserch**, v.9, p.337-338, 1997.
- Maia,J.G.S, Andrade,E.H.A., da Silva,M.H.L, Zoghbi,M.G.B. A new chemotipe of *Eugenia uniflora* L. from North Brazil. **Journal of Essential Oil Reserch**, v.11, p.727-729, 1999.
- Matsumura,T., Kasai,M., Hayashi,T., Arisawa,M., Monose,Y., Arai,I., Amagaya,S., Komatsu,Y. A-glucosidade inhibitors from paraguayan natural medicine, Ñangapity, the leaves of *Eugenia uniflora*. **Pharmaceutical Biology**, v.38, n.4, p.302-307, 2000.
- Mélo,E.A., Lima,V.L.A.G., Nascimento,P.P. Temperatura no armazenamento da pitanga. **Sciencia Agricola**, v.57, p.629-634, 2000.
- Melo,R.M., Corrêa, A.C.L.A., Miranda,A.L.P., Rezende,C.M. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v 18, p.179-183, 2007.
- Momose,Y. Pentahydoryndolizidine and α -glucosidaseinhibitors containing products of *Eugenia uniflora*. **Japan Kokai Tokkyo Koho**, v.72, p.770, 2000.
- Morais,S.M., Craveiro,A.A., Machado,M.I.L., Alencar,J.W., Matos,J.A. Volatiles constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, p.449-451, 1996.
- Naczki,M., Shahidi,F. Extractions and analysis of phenolics in food **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.95-111, 2004.

Ogunwande,I.A., Olawore, N.O., Ekundayo,O., Walker,T.M., Schmidt,J.M., Setzer,W.N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v.15, p.147-152, 2005.

Oliveira,A.L, Lopes,R.B. Cabral,F.A.C, Erbelin,M.N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Journal of Food Chemistry**, v.99, p.1-5, 2006.

Oliveira,A.M. Avaliação química dos alcalóides da espécie *Eugenia uniflora*. In: Encontro Regional de Química, Ribeirão Preto, Livro de resumos. Ribeirão Preto:Sociedade Brasileira de Química, 1999. p.65.

Omoni,A.O., Aluko,R.E.. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.344-350, 2005.

Ou,B., Huang,D., Hampsch-Woodill,M., Flanagan,J.A., Deemer,E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.3122-3128, 2002.

Ou,B., Hampsch-Woodill,M., Prior,R.L. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p.4619-4626, 2001.

Peng,D.Y., Robinson,D.B. A new two-constant Equation of state. **Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals**, v.15, p.59-64, 1976.

Pesek,C.A. Wilson,L.A. Hammond,E.G. Spice quality: effect of cryogenic and ambient granging on volatile, **Journal of Food Science**, v.50, p.599-601, 1985.

Redlich,O., Kwong,J.N.S. On the Thermodynamics of Solutions. **Chemical. Reviews**, v.44, p. 233 - 244, 1949.

Reynertson,K.A, Basile,M.J.B., Kennelly,E.J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v.3, p.025-035, 2005.

Roesler,R. Estudo de Frutas do Cerrado Brasileiro para Avaliação de Propriedade Funcional como Foco na Atividade Antioxidante. **Campinas, 2007. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – FEA, UNICAMP.**

Roesler,R., Malta,L.G., Carrasco,L.C., Holanda,R.B., Sousa,C.A.S., Pastore,G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.53-60, 2006.

Roginsky,V.; Lissi,E.A.; Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92, p.235-254,2005.

Rücker,G., Brasil,A., Silva,G., Bauer,L., Schikarski,M. Neue inhaltsstoffe aus *Stenocalyx Michellii*. **Planta Medica**, v.31, p.305-340, 1977.

Sánchez-Moreno,C., Larrauri,J.A., Saura-Calixto,F., A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276, 1998.

Schapoal,E.E.S., Silveira,S.M., Alice,C.B., Henriques,A.T. Evaluation of some pharmacological activities of Eugenia uniflora L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, p.137-142, 1994.

Schmeda-Hirschmann,G. Flavonoids from Calycorectes,Campomanesia, Eugenia and Hexachlamys species. **Fitoterapia**, v.16, p.373-374, 1995.

Schmeda-Hirschmann,G., Theoduloz,C., Franco,L., Ferro.E., Rojas De Arias, Preliminary pharmacological studies on Eugenia uniflora leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology** ,v.21, p.183-186, 1987.

Shahidi,F. Natural Antioxidants: An Overview "in" Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications. AOCS Press: Champaign, Illinois, p. 1-11. 1996.

Smith,R.M. Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future. **Journal of Chromatography**, v.856, p.83-115, 1999.

Soares,S.E., Ácidos fenólicos como antioxidantes **Revista de Nutrição**, v.15, p.71-81, 2002.

Soave,G. Equilibrium Constants from a Modified Redlich-Kwong Equation the State. **Chemical Engineering Science**, v. 27, p. 1197 - 1203, 1972.

Somayajulu, G.R. Estimation procedures of critical constants. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.34, p.106-120, 1989.

Sousa,C.M.M., Silva,H.R.S., Vieira-Jr,G.M., Ayres,M.C.C., Costa,C.L.C., Araújo,D.S., Cavalcante,L.C.D, Araújo,P.M.A., Brandão,M.S., Chaves,M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica. Nova**, v.30, p.351-355, 2007.

Spatz,L. In: Natural antioxidants in human health and disease. Frei,B. ed. Academic Press, 1994, p.3-22.

Staub,C. Supercritical fluid extraction and hair analysis: the simulation in 1996. **Forensic Science International**, v. 84, p.295-304, 1997.

Stratil,P., Klejdus,B., Kubáň,V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v.71, p.1741-1751, 2007.

Stratil,P., Klejdus,B., Kubáň,V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, p.607-616, 2006.

Sun,J., Shi,J., Jiang,Y., Xue,S.J., Wei,X. Identification of two polyphenolic compounds with antioxidant activities in longan pericarp tissues. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, p.5864-5868, 2007.

Takahashi,O., Hiraga,K. Dose-response study of hemorrhagic death by dietary butylated hydroxy toluene (BHT) in male rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.43, p.399-406, 1978.

Theoduloz,C., Franco,L., Ferro,E., Schmeda-Hirschmann,G. Xanthine oxidase inhibitory activity of paraguayan Myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.24, p.179-183, 1988.

Tsibanogiannis,I., Kalospirus,N.S., Tassius,D.P. Prediction of normal boiling point temperature of medium/high molecular weight constants. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.34, p.997-1002, 1995.

Ubiero,G.; Taher,H.A.; Talenti, R.C, **Associação Química Argentina**, v.75, p.377, 1978.

Weisburger,J.H. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.943-948, 1999.

Wettasinghe,M., Bolling,B., Plhak,L., Parkin,K. Screening for Phase II Enzyme inducing and Antioxidant Activities of Common Vegetables. **Journal of Food Science**, v.67, p.2583-2588, 2002.

Weyerstahl,P., Marchall-Weyerstahl,H., Christiansen,C., Oguntien,B.O., Adeoye,A.O. Volatile constituents of Eugenia uniflora L. leaf oil. **Planta Medica**, v.6, p.546-549, 1988.

Witschi,H., Lock,S. Toxicity of butylated hydroxy toluene in mouse following oral administration. **Toxicology-Shannon**, v.9, p.137-46, 1978.

Wu,X., Gary,R., Holden,J., David,B., Susan,E., Gebhardt,S., Prior,R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of foods in the United States. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.4026-4037, 2004.

Xing,Y., White,P.J. Antioxidants from Cereals and Legumes in Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications "in" SHAHIDI, F. AOCS Press: Champaign, Illinois, p.25-55, 1996.

Yen,G.C., Duh,P.D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.42, p.629-632, 1994.

Zhou,K., Yu,L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.37, p.717-721, 2004.

Zozel,K. Process for recovering caffeine. US Pat, n.3. n.806, 619p, 1974.

8. Anexo

Chromatogram Plot

File: c:\saturnews\data\data_2005\trienamento\11_05\pad_selinar1.sms

Sample: pad_selinar1

Operator: JLPZJ

Scan Range: 1 - 4109 Time Range: 0.00 - 63.97 min.

Date: 23/11/05 14:31

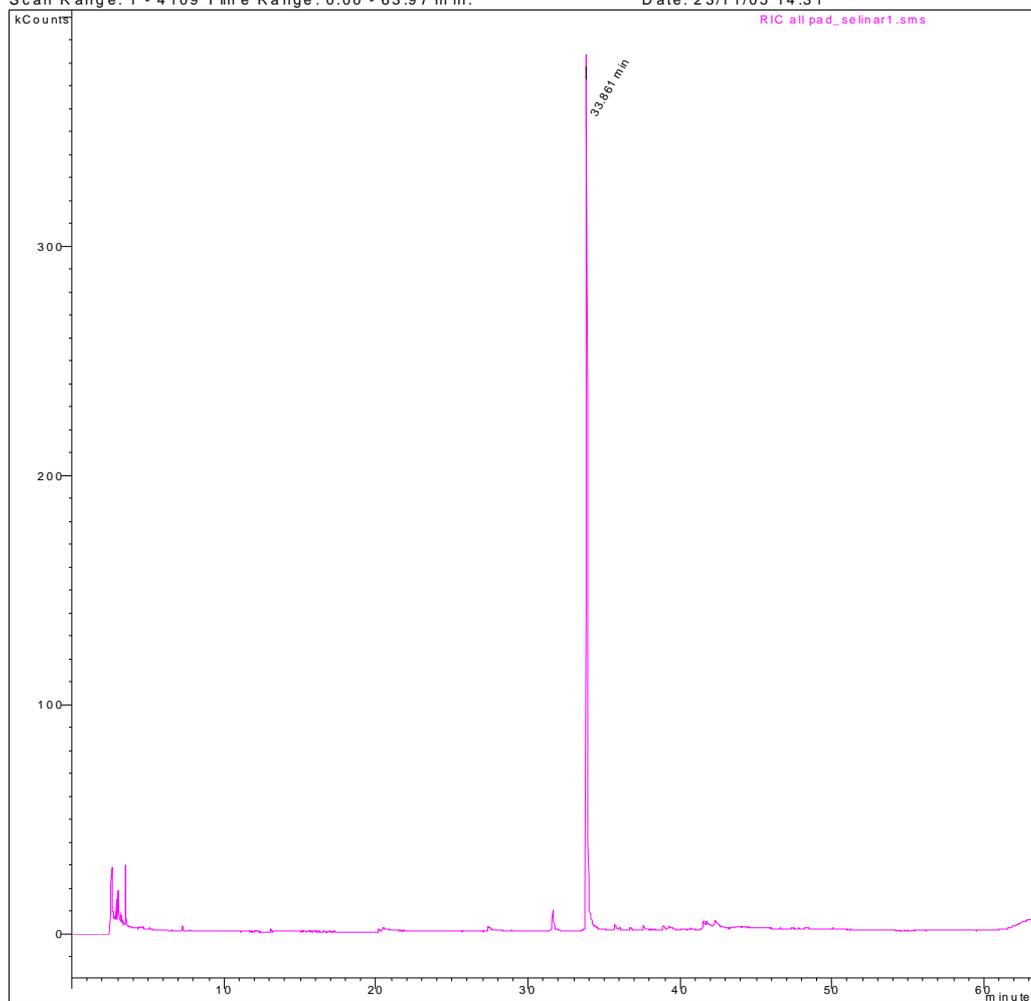


Figura 45: Cromatograma do composto selina-1,3,7(11) – trien-8-ona.

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\data\data_2005\treinamento\11_05\pad_selinar1.sms

Scan 2170 from c:\... \data\data_2005\treinamento\11_05\pad_selinar1.sms

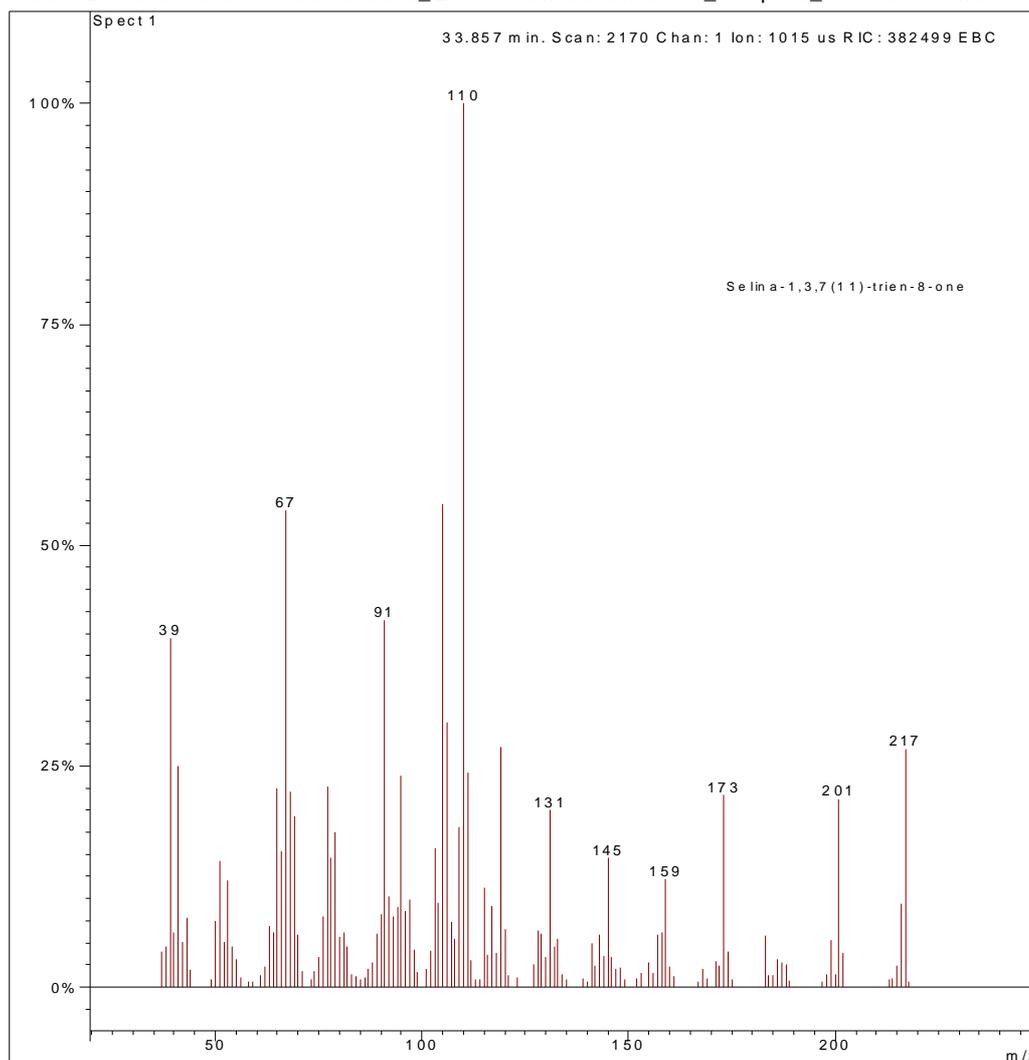


Figura 46: Espectro de massa do composto selina-1,3,7(11) – trien-8-ona.

Scan 2755 from c:\saturnws\data\data_2005\treinamento\07_05\voc_e7.sms

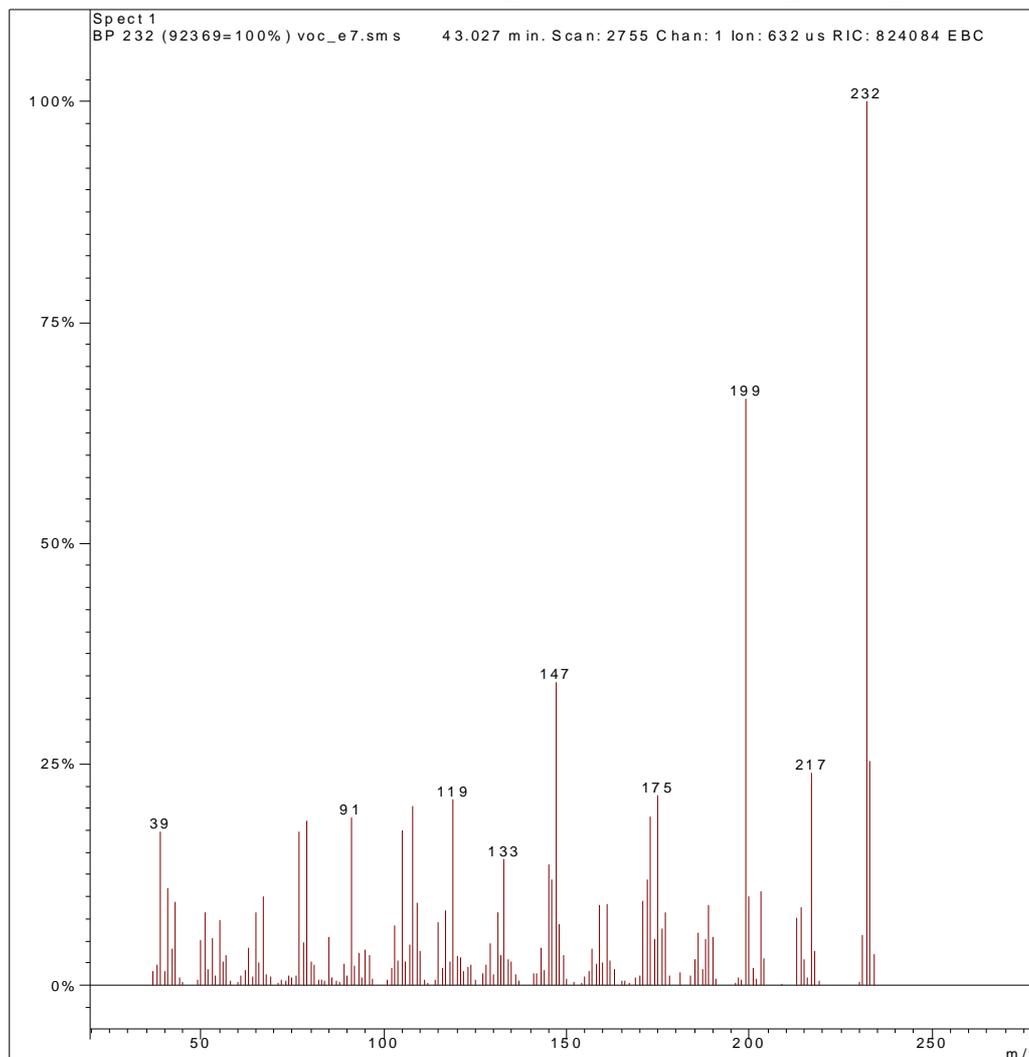


Figura 47: Espectro de massa do éster $C_{15}H_{20}O_2$.

Scan 2955 from c:\saturnws\data\data_2005\treinamento\07_05\voc_e7.s.ms

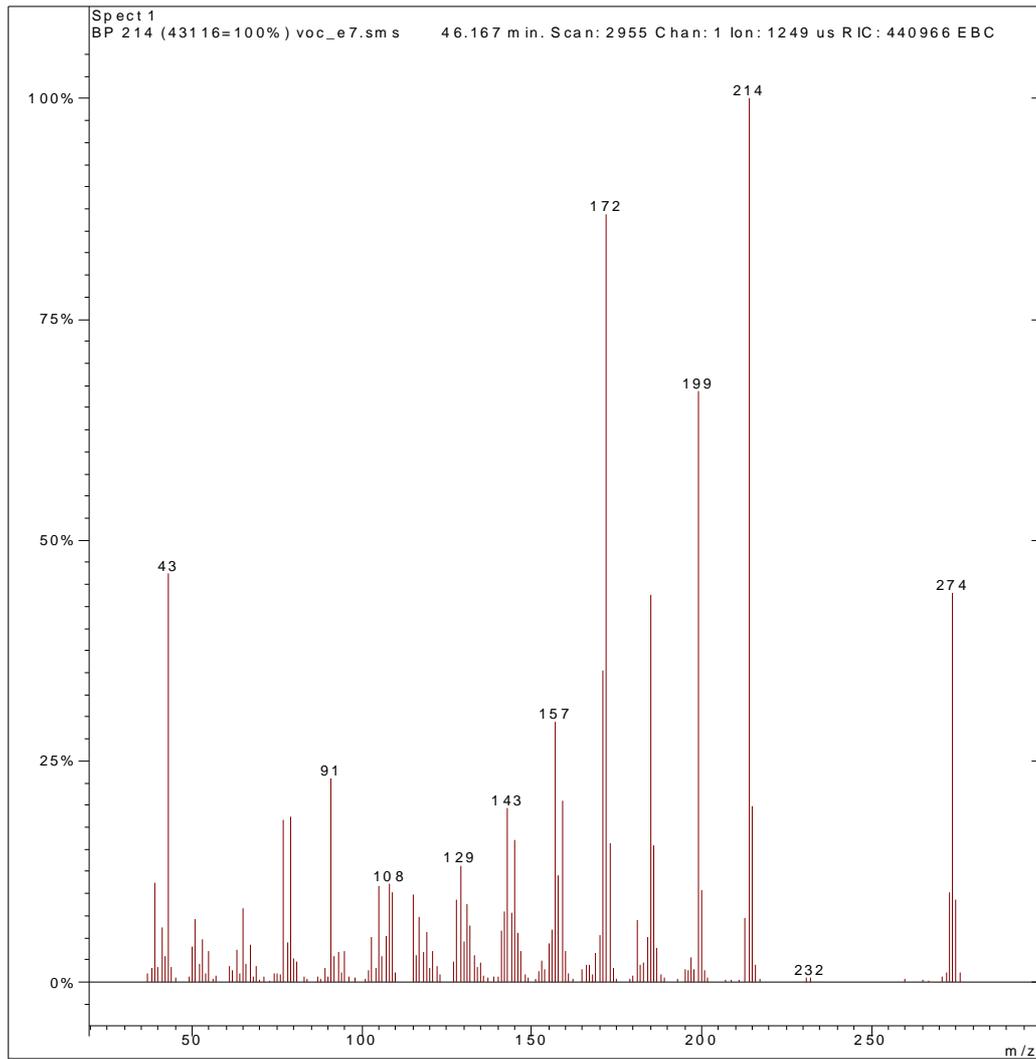


Figura 48: Espectro de massa do acetato $C_{17}H_{22}O_2$.

A seguir são apresentados somente um cromatograma por extrato analisado.

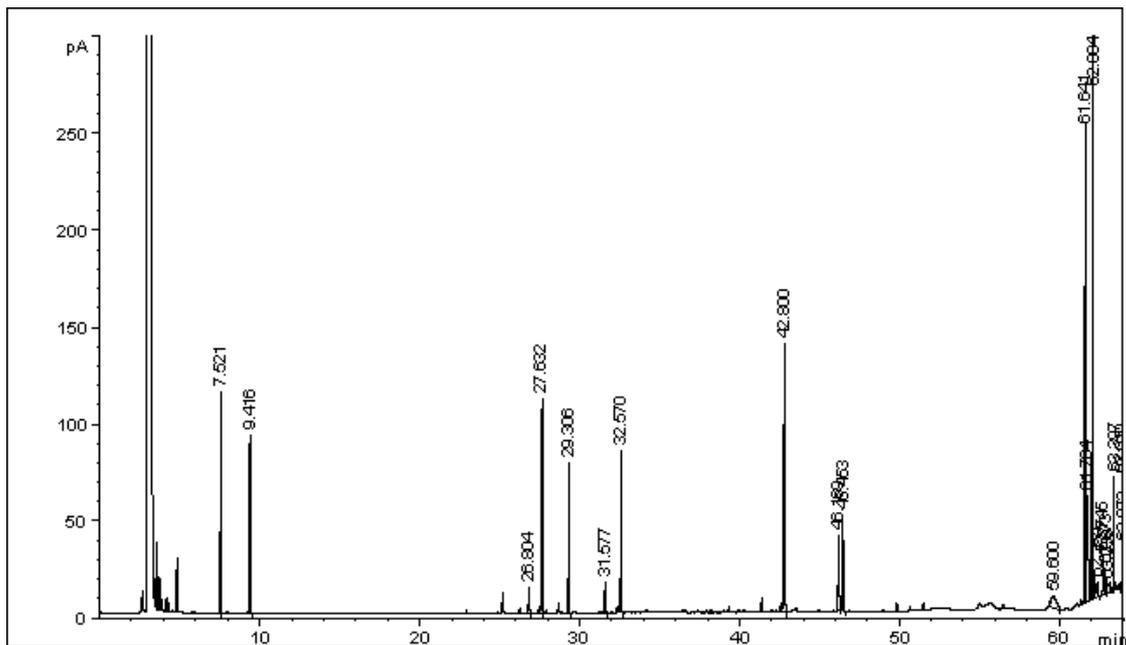


Figura 49: Cromatograma do extrato obtido na condição de 40 °C e 100 bar.

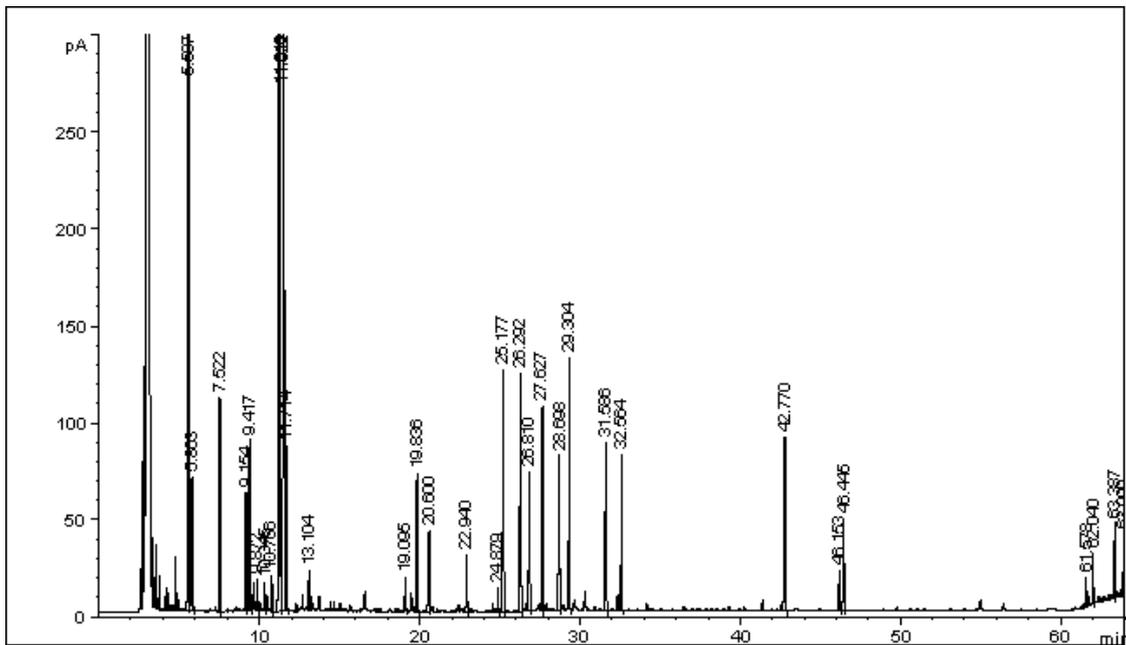


Figura 52: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 40 °C e 150 bar.

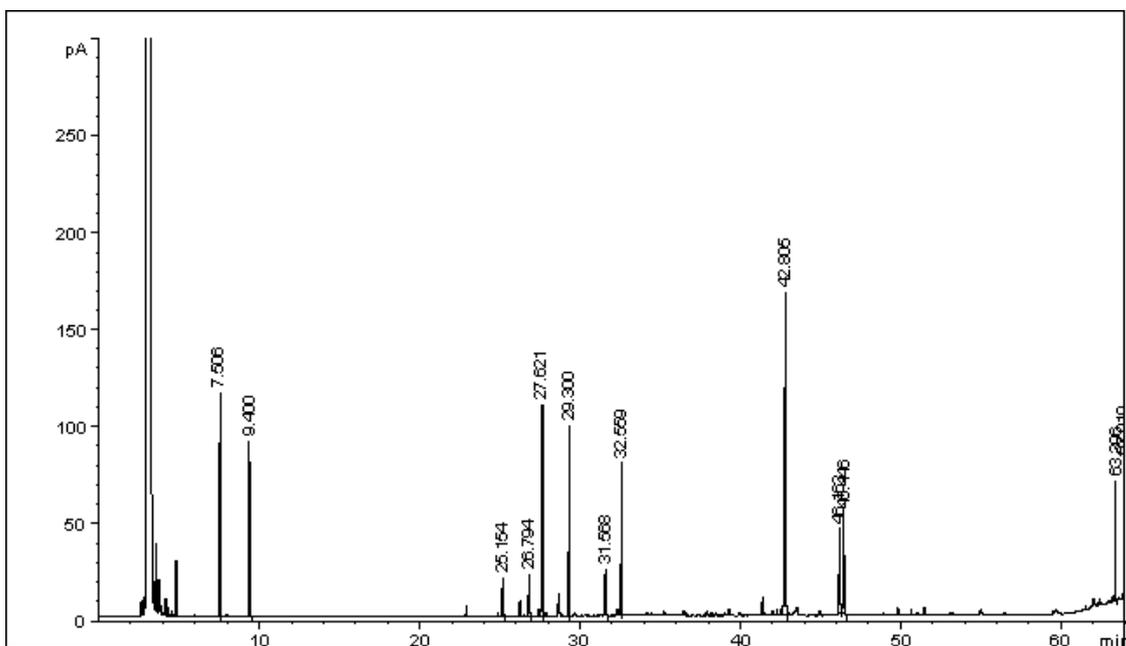


Figura 53: Cromatograma do extrato obtido na condição de 40 °C e 200 bar.

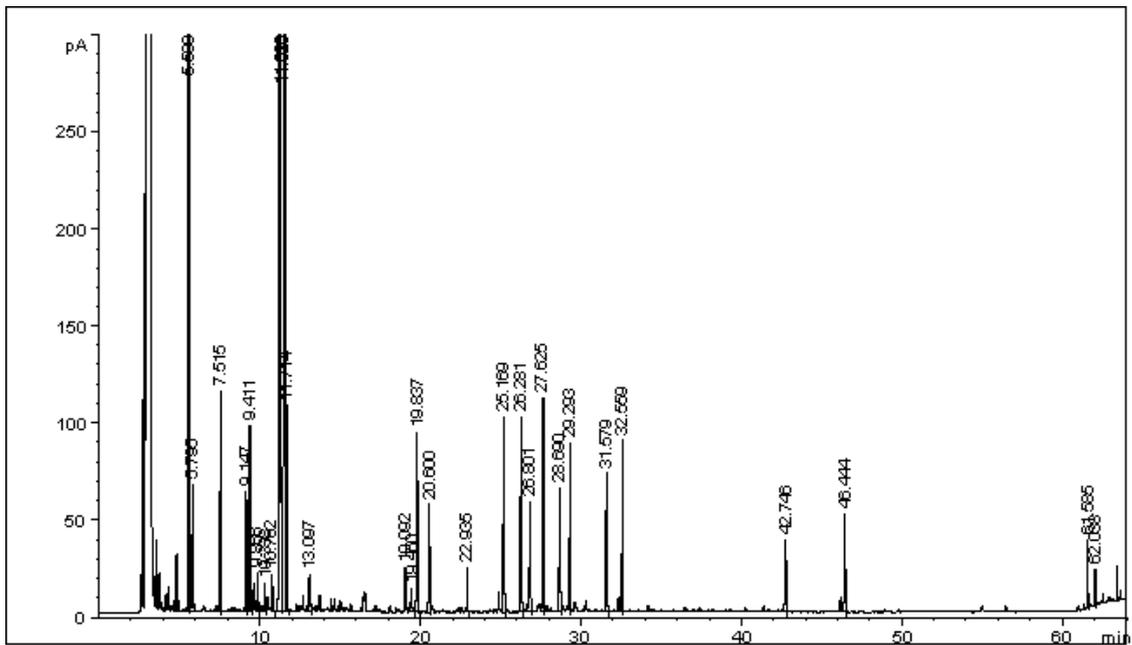


Figura 54: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 40 °C e 200 bar.

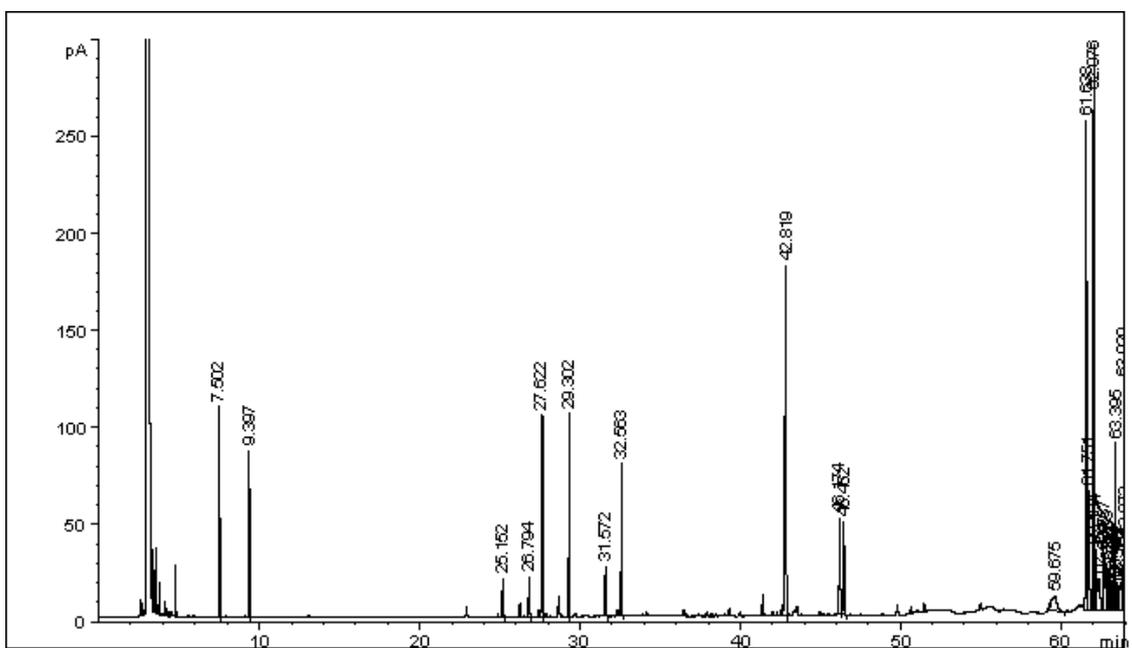


Figura 55: Cromatograma do extrato obtido na condição de 40 °C e 250 bar.

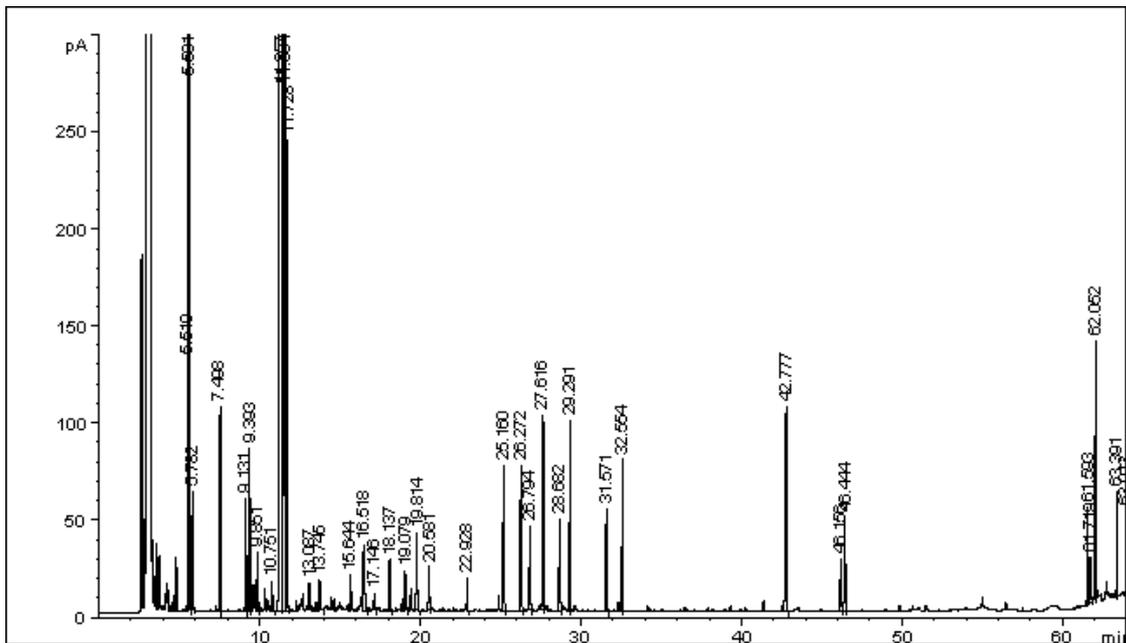


Figura 56: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 40 °C e 250 bar.

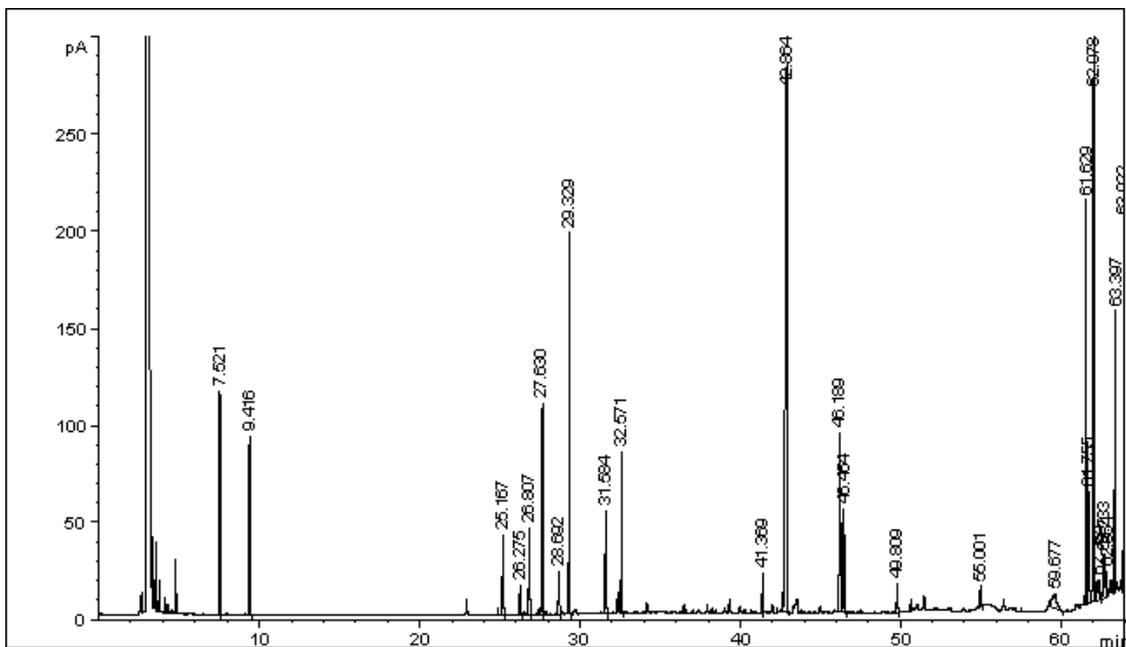


Figura 57: Cromatograma do extrato obtido na condição de 40 °C e 300 bar.

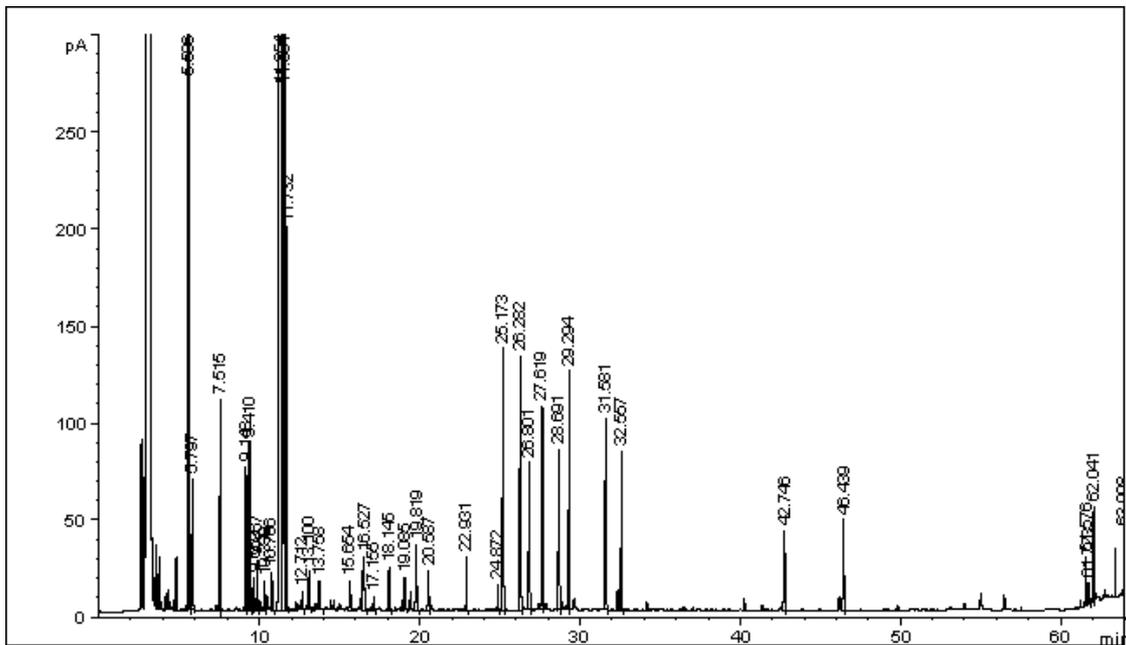


Figura 58: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 40 °C e 300 bar.

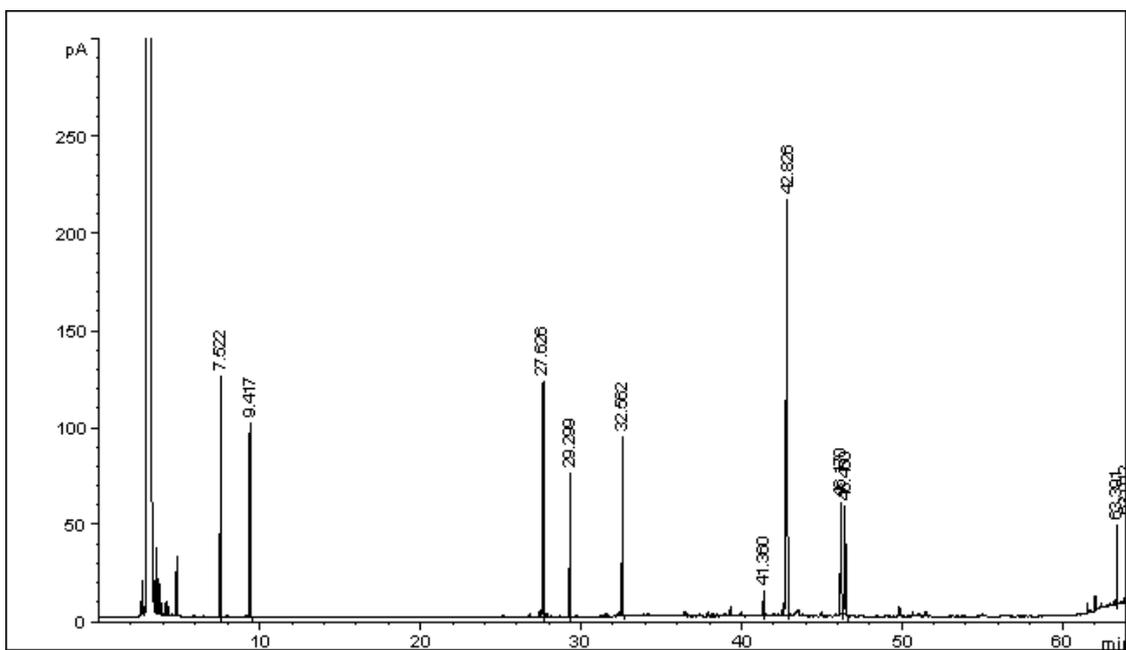


Figura 59: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 100 bar.

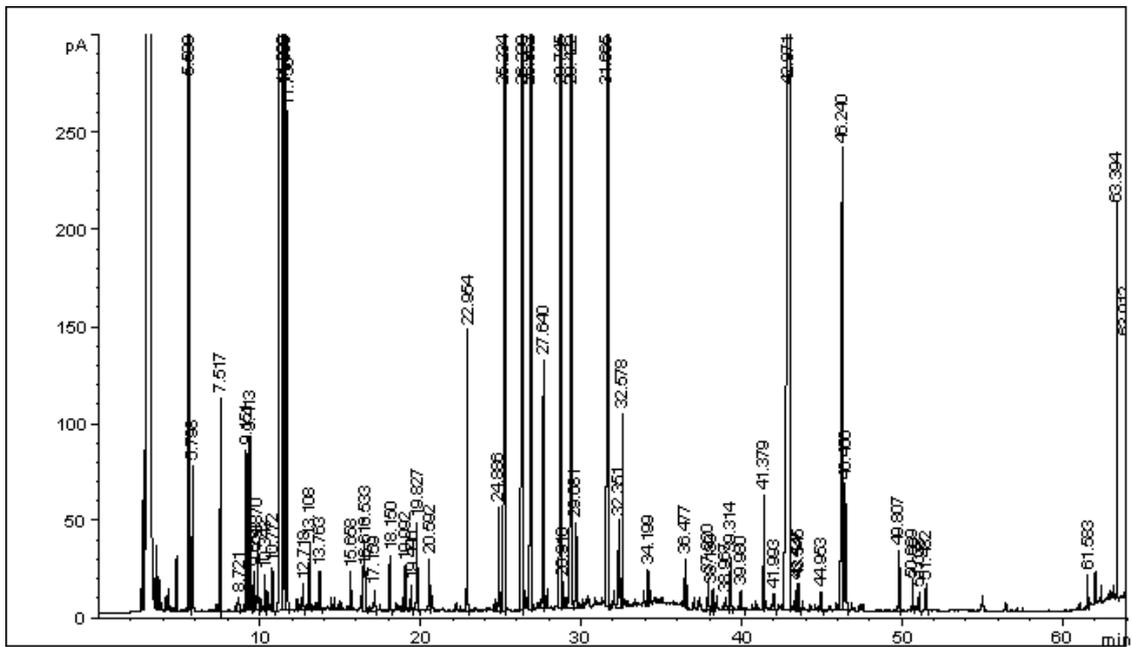


Figura 60: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 100 bar.

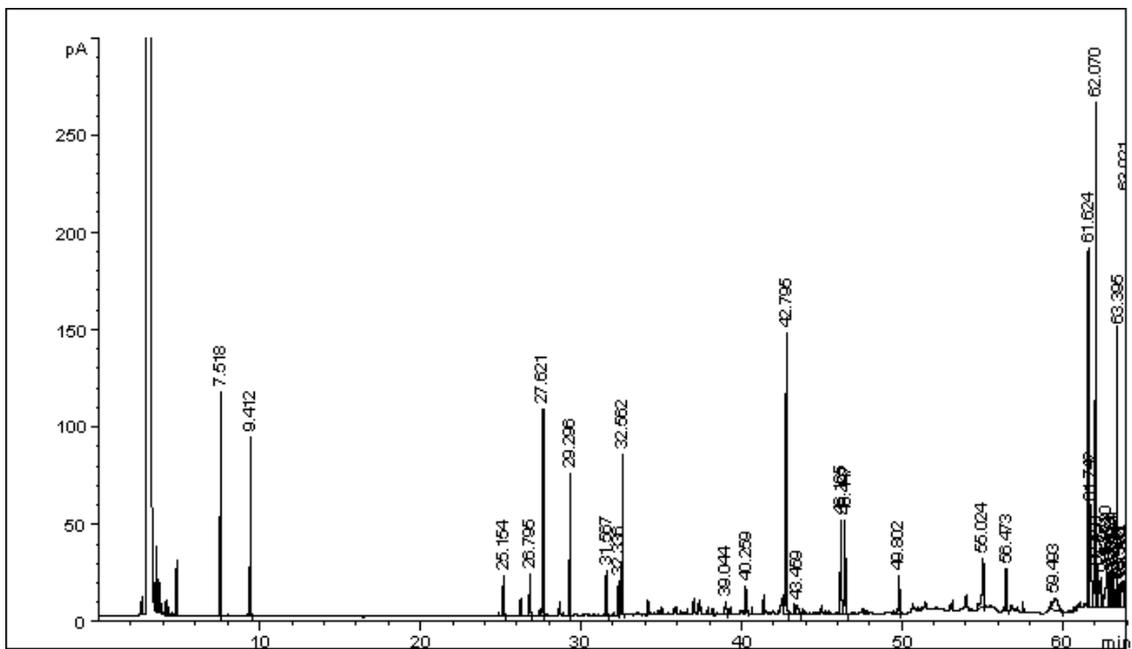


Figura 61: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 150 bar.

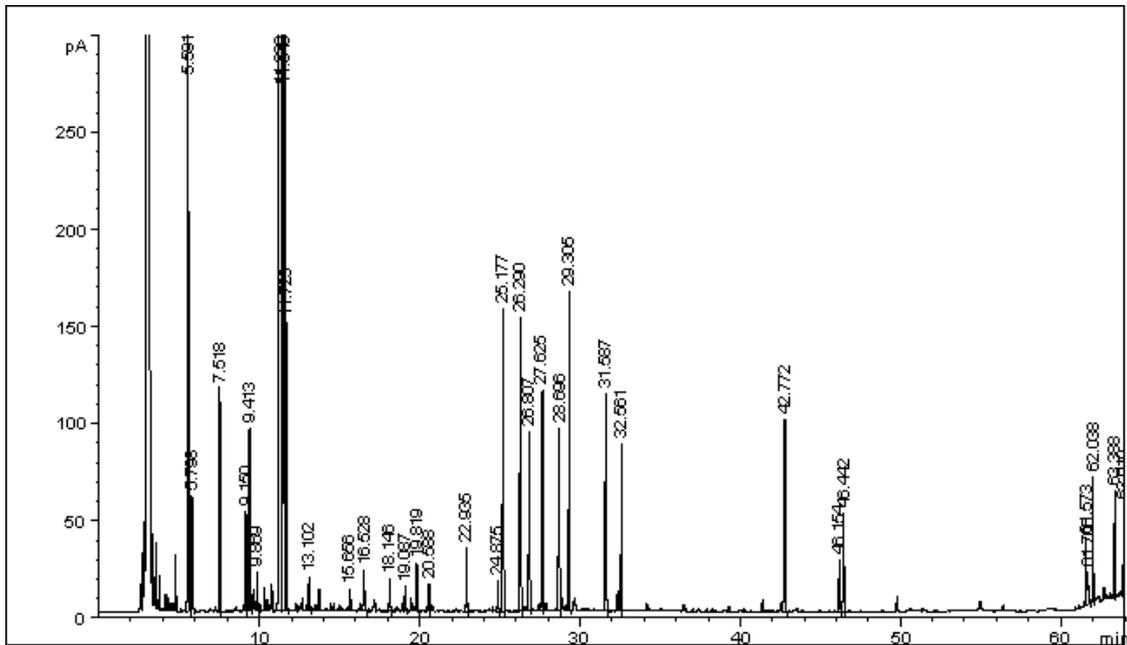


Figura 62: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 150 bar.

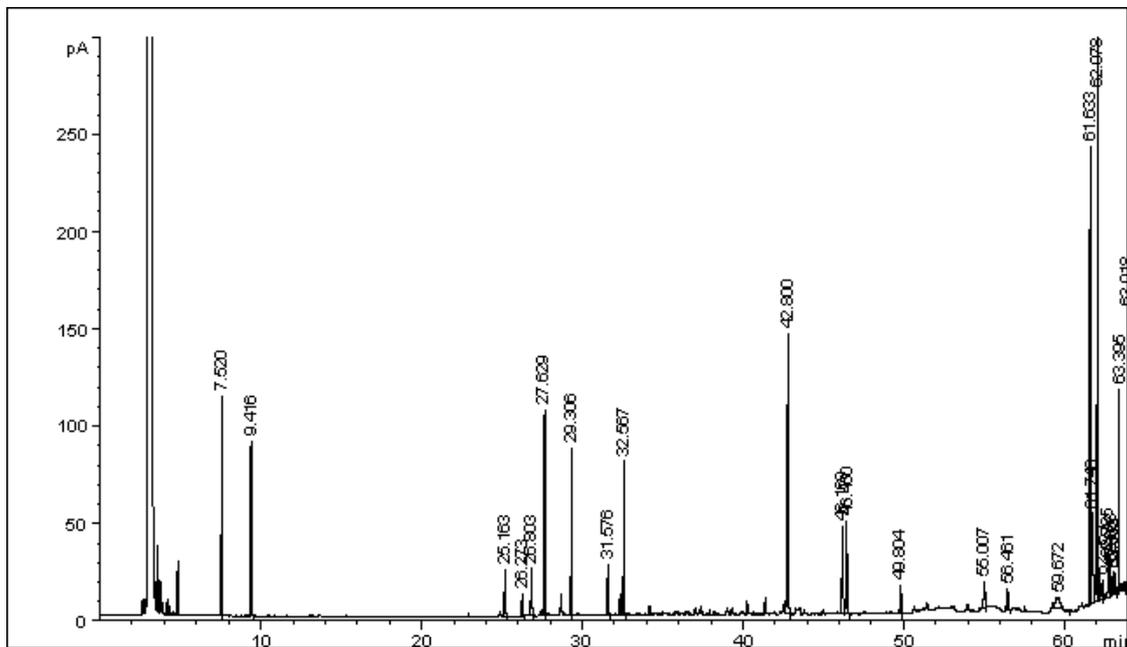


Figura 63: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 200 bar.

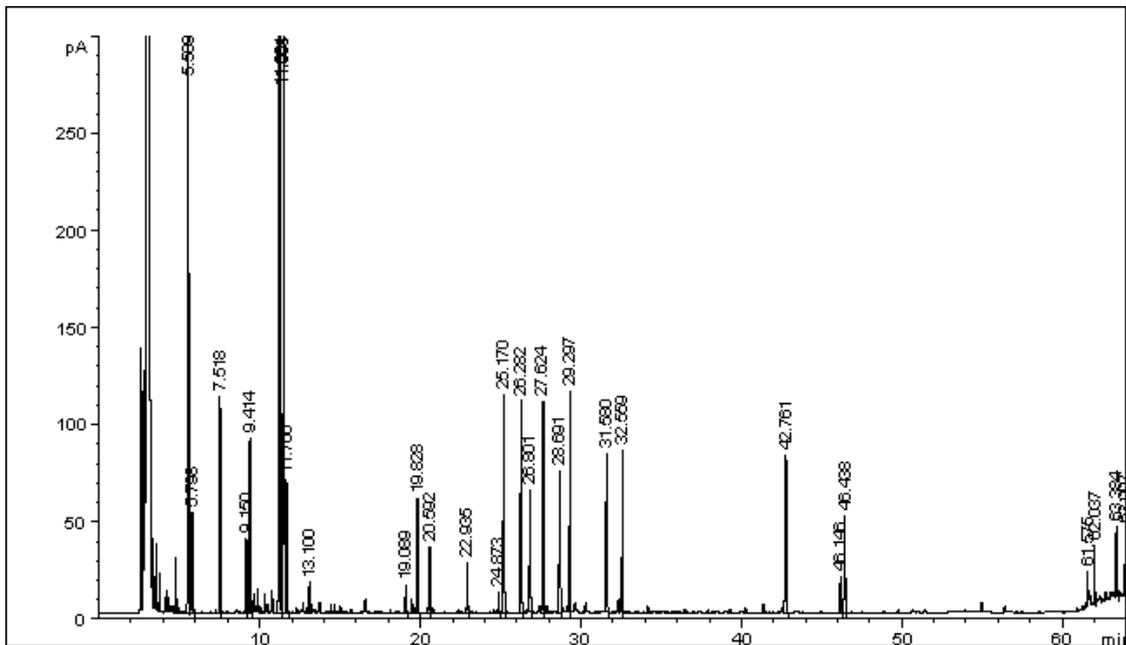


Figura 64: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 200 bar.

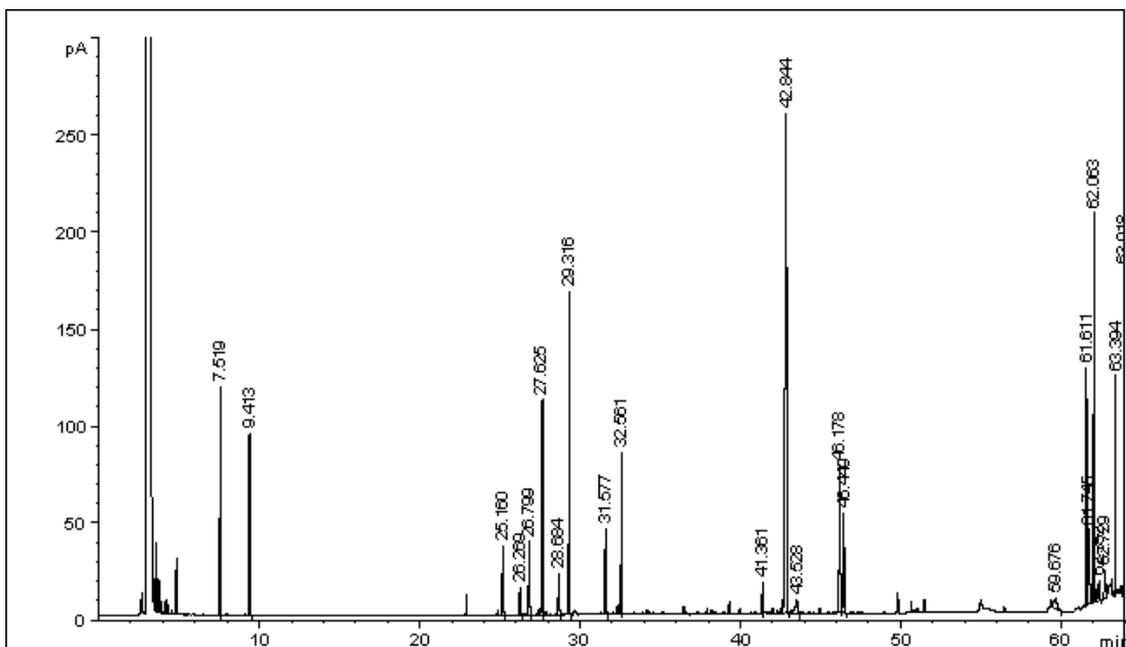


Figura 65: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 250 bar.

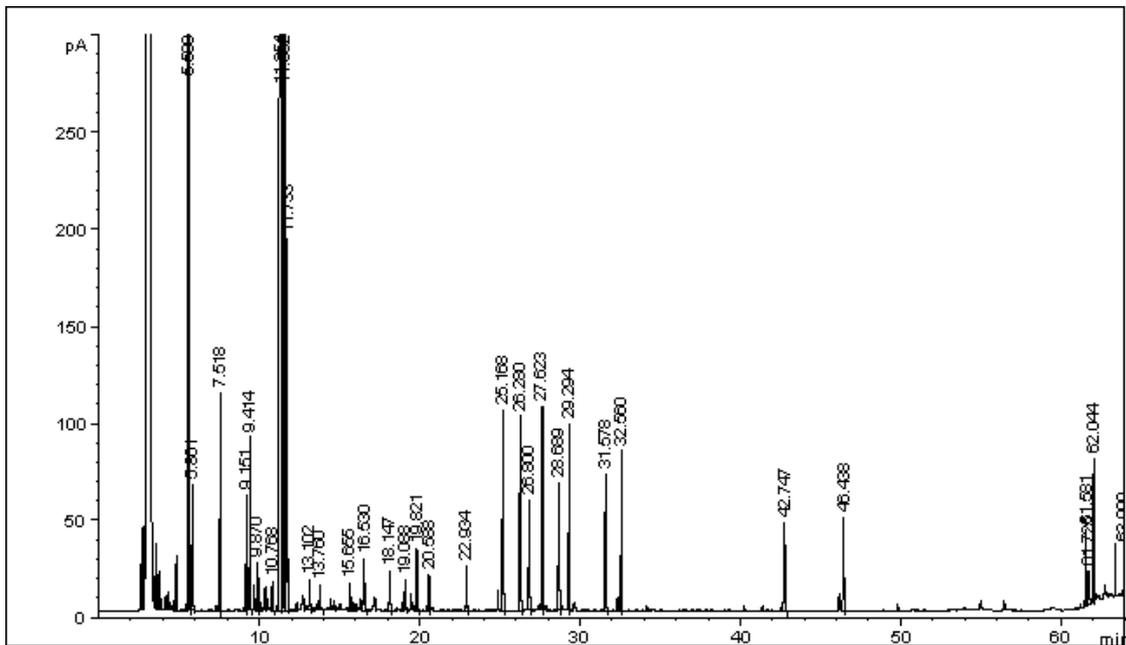


Figura 66: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 250 bar.

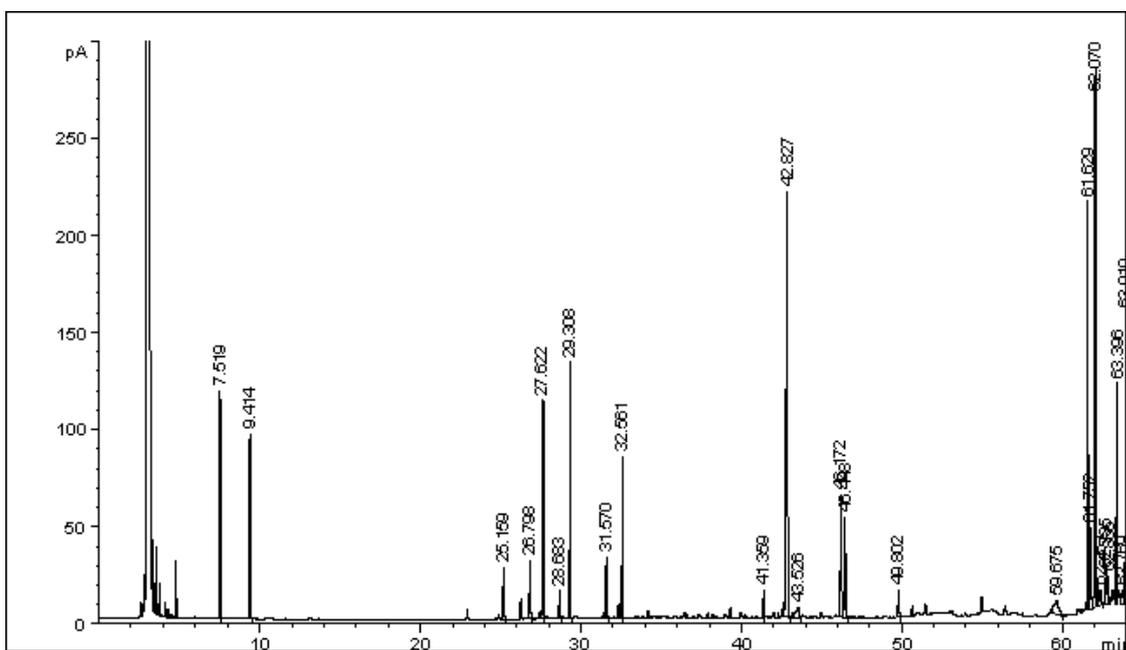


Figura 67: Cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C e 300 bar.

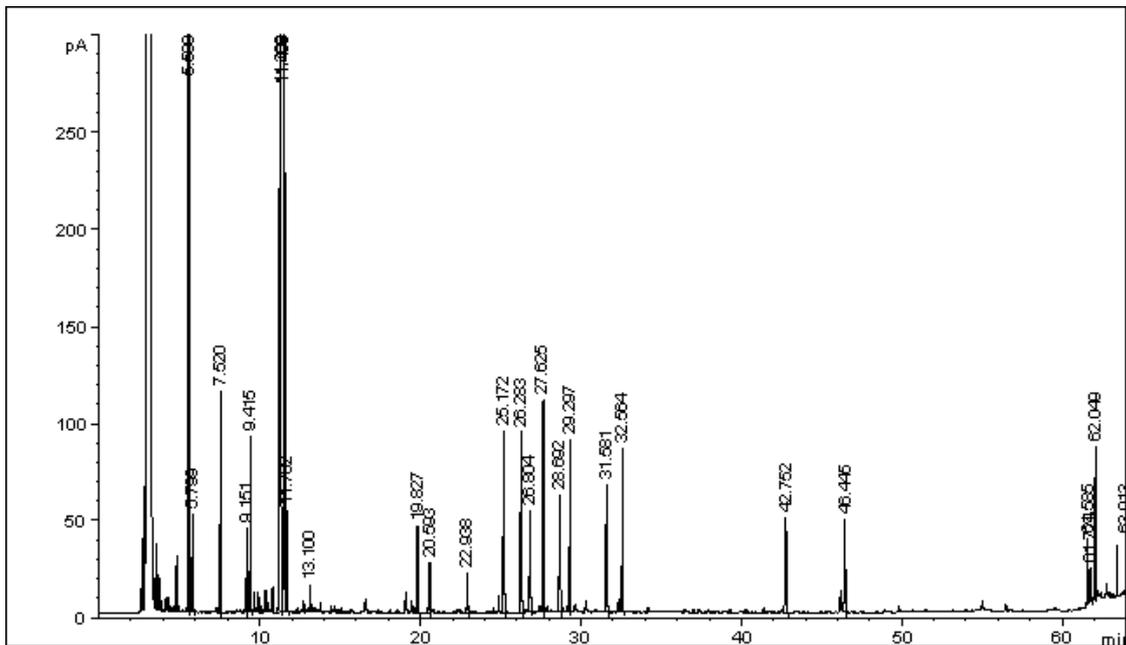


Figura 68: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 50 °C e 300 bar.

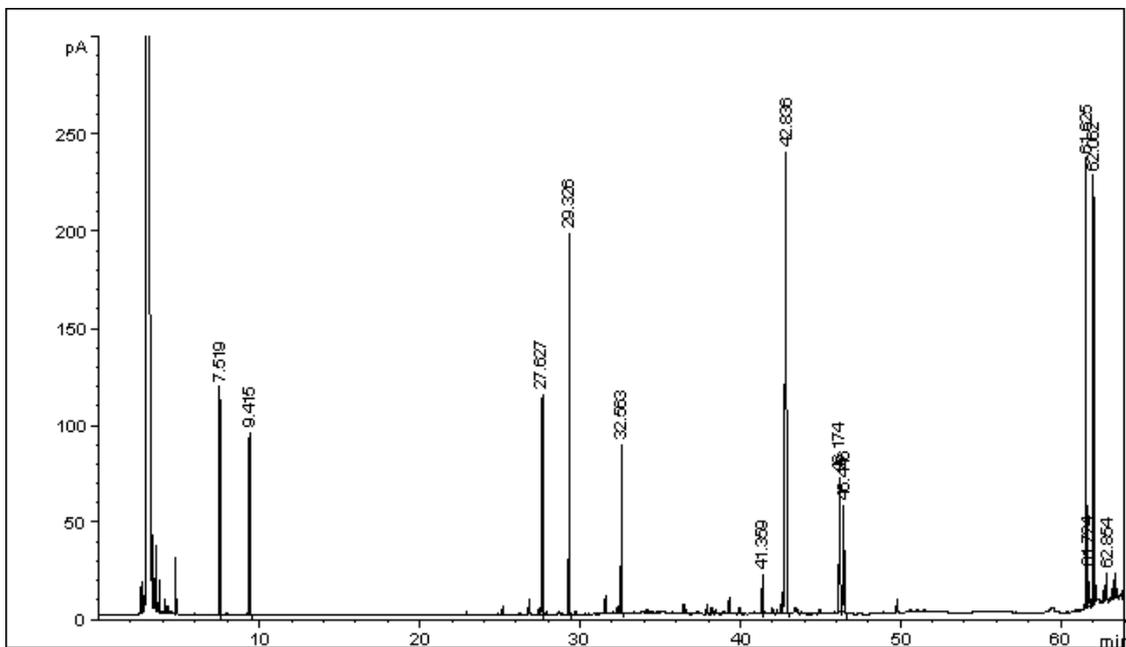


Figura 69: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 100 bar.

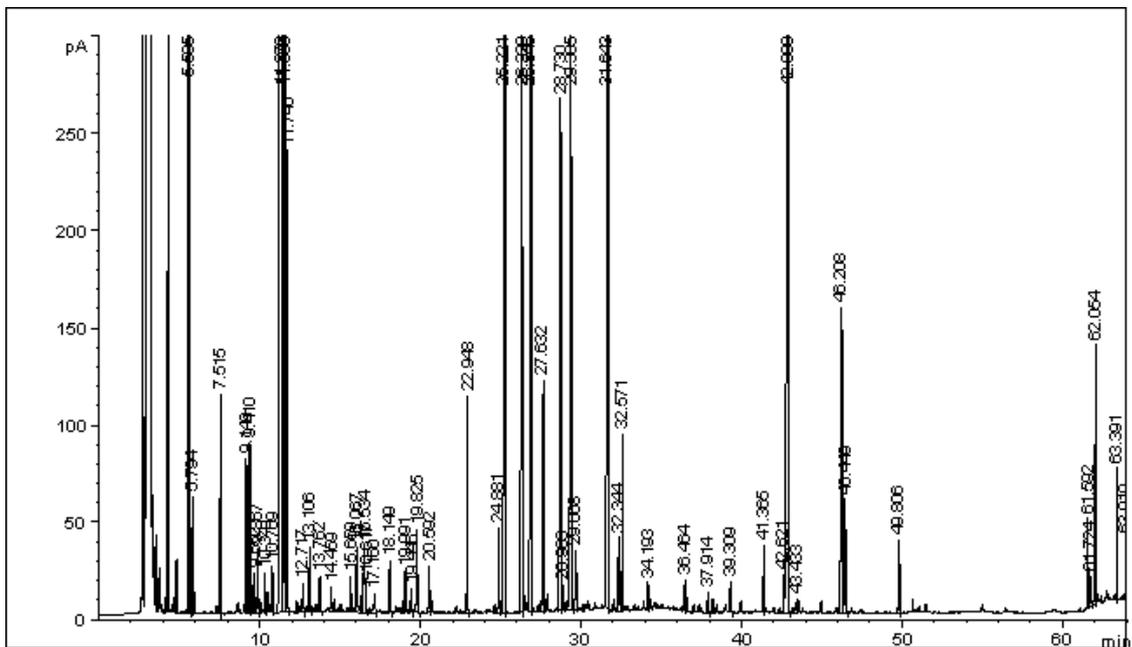


Figura 70: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 100 bar.

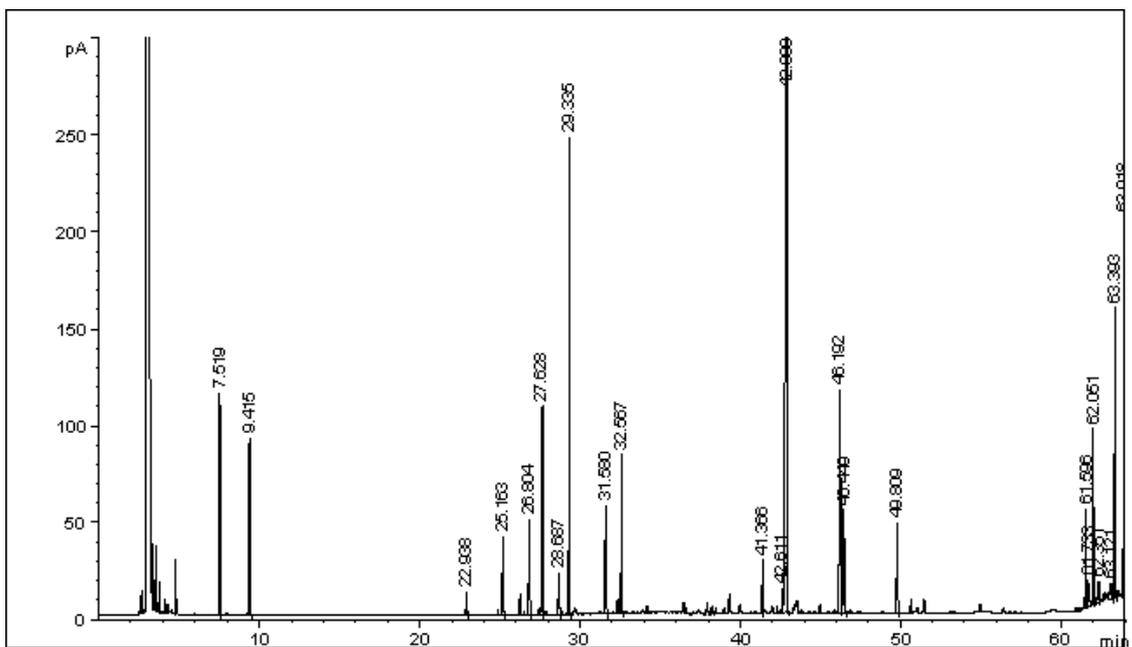


Figura 71: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 150 bar.

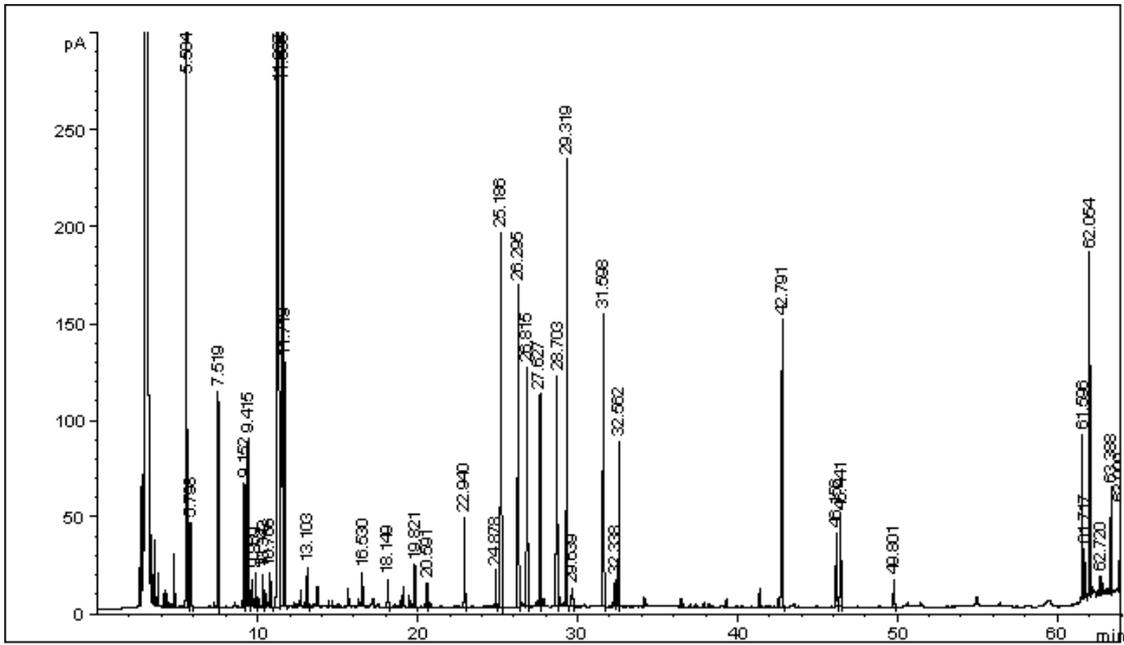


Figura 72: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 150 bar.

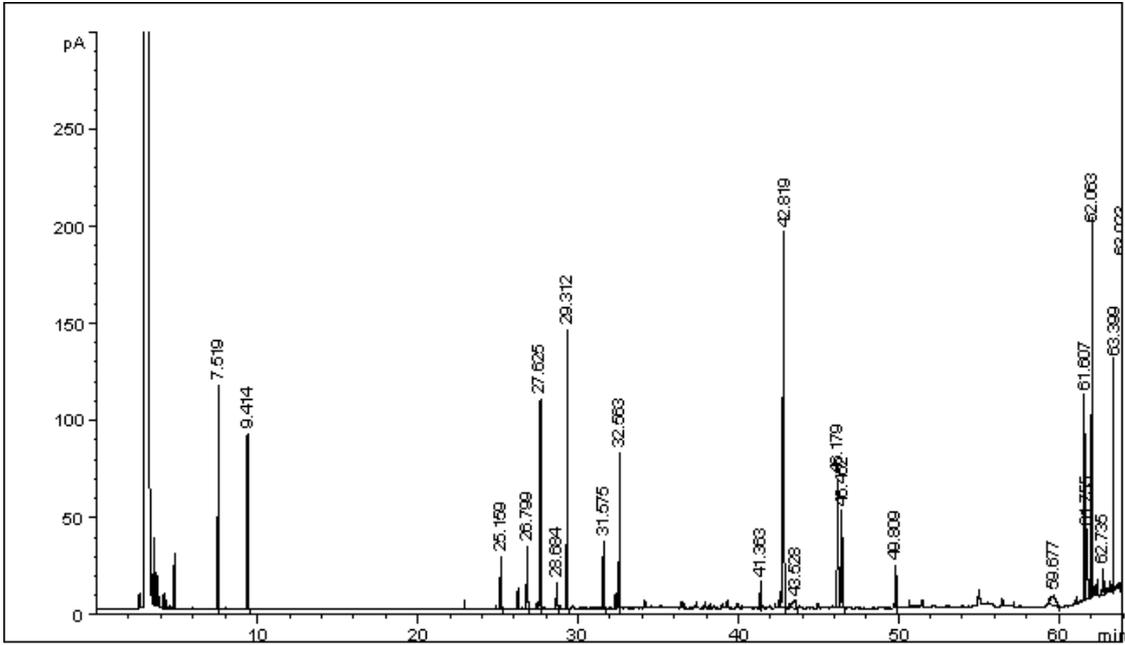


Figura 73: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 200 bar.

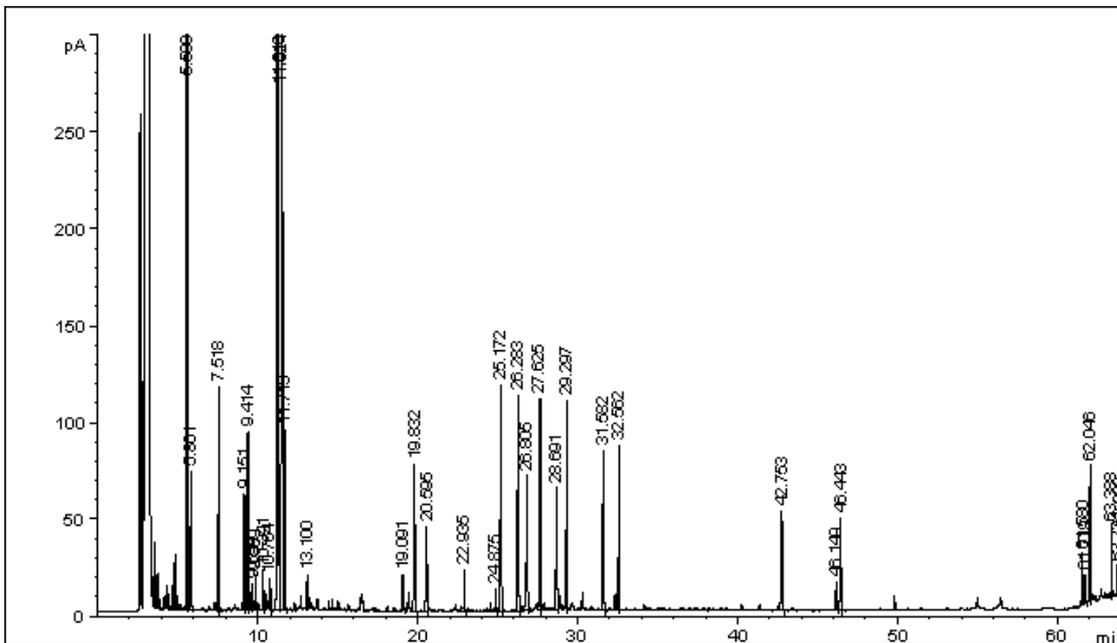


Figura 74: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 200 bar.

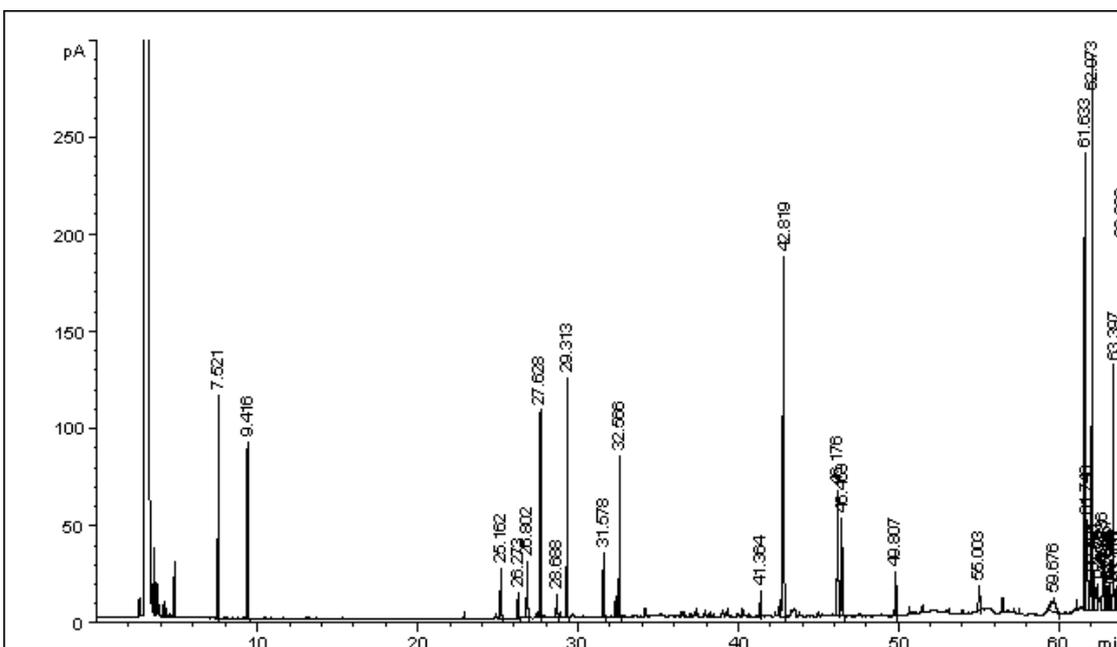


Figura 75: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 250 bar.

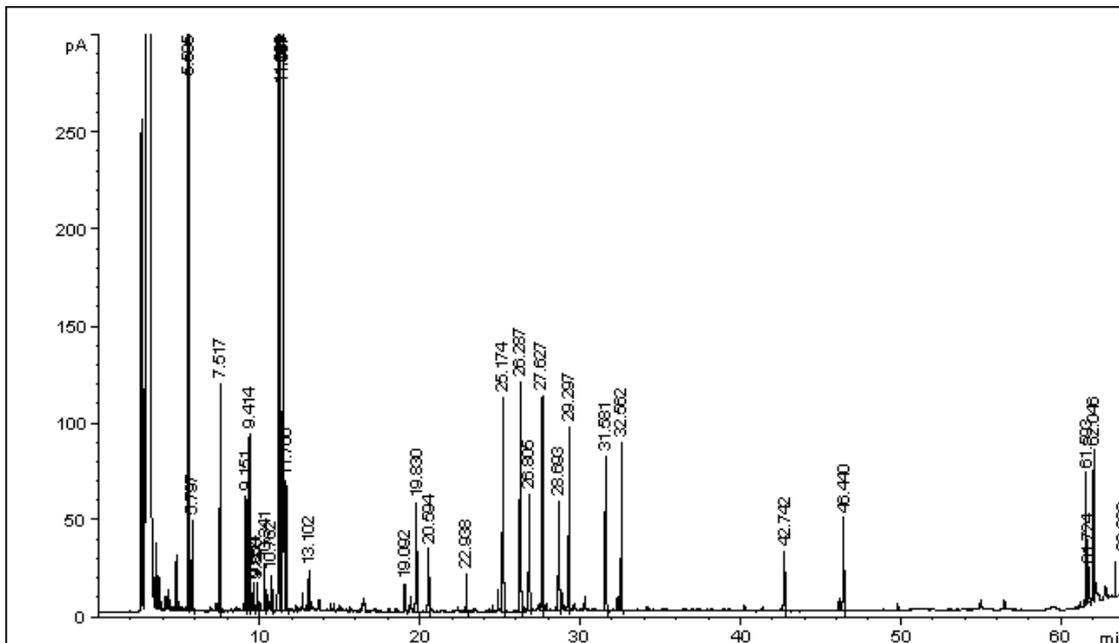


Figura 76: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 250 bar.

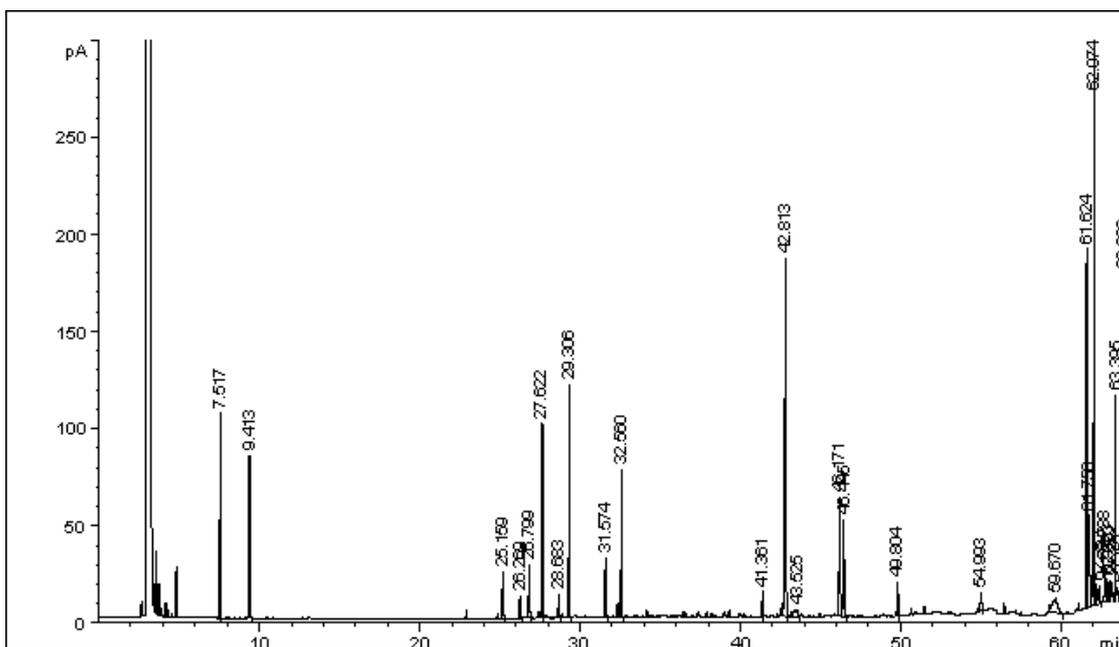


Figura 77: Cromatograma do extrato obtido na condição de 60 °C e 300 bar.

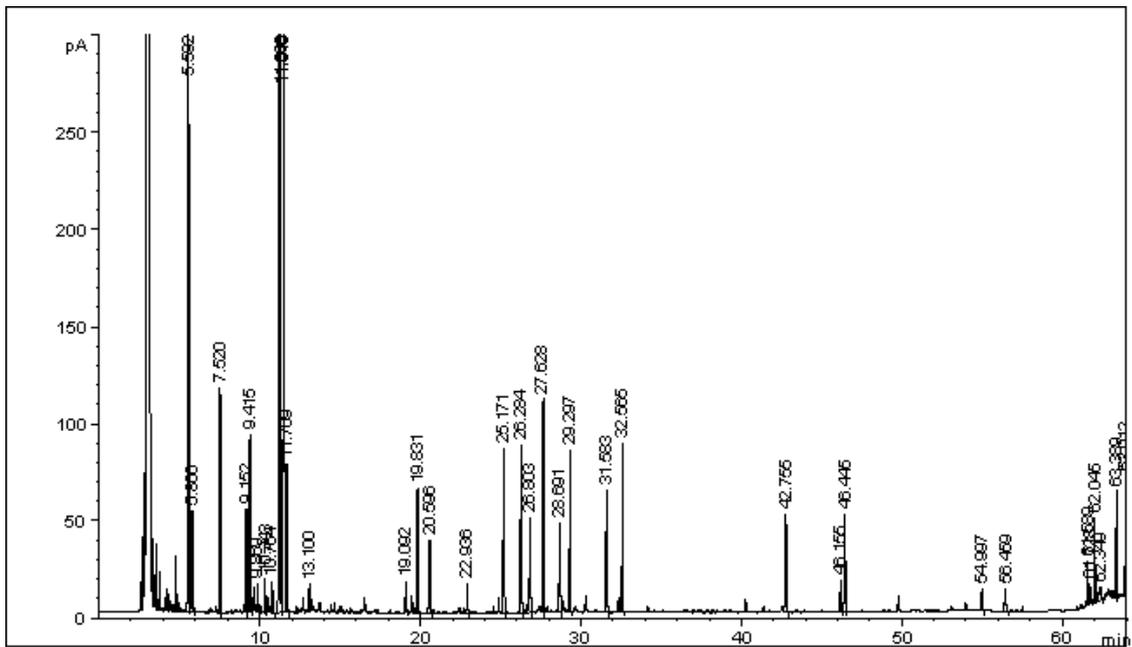


Figura 78: Cromatograma do extrato volátil obtido na condição de 60 °C e 300 bar.

Tabela 38: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 40°C e 100 bar, analisados por CG-DIC.

	N° picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	curzereno	27,631	1498	97,417	0,359	0,369
	2	germacreno B	29,306	1558	67,004	0,391	0,584
	3	espatulenol	31,576	1573	13,961	0,130	0,931
	4	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,800	1882	142,262	0,003	0,002
	Total					320,643	
Extrato Volátil	1	3-careno	7,517	1013	28,890	0,004	0,014
	2	para-cimeno	9,150	1024	17,241	0,046	0,266
	3	terpinoleno	10,341	1096	4,674	0,009	0,198
	4	linalol	10,766	1281	6,181	0,008	0,122
	5	acetato de linalol	16,528	1338	11,804	0,012	0,099
	6	terpinen-7-al	18,146	1281	6,670	0,009	0,136
	7	Δ-elemeno	20,588	1338	6,342	0,009	0,140
	8	β-elemeno	22,936	1393	17,751	0,022	0,121
	9	γ-elemeno	24,874	1434	7,855	0,003	0,035
	10	germacreno D	26,294	1481	72,362	0,057	0,079
	11	β-selineno	26,811	1486	46,429	0,450	0,969
	12	curzereno	27,624	1498	43,703	0,030	0,068
	13	α-cadieno	28,701	1542	48,652	0,044	0,090
	14	germacreno B	29,316	1558	90,495	0,224	0,248
	15	espatulenol	31,594	1573	61,561	0,391	0,635
	16	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,819	1882	106,714	0,254	0,238
	17	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,167	1986	26,608	1,099	4,131
Total					603,930		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 39: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 40°C e 150 bar, analisados por CG-DIC.

40°C/ 150bar	N° picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,156	1434	20,158	0,290	1,438
	2	germacreno B	29,304	1558	107,585	0,824	0,766
	3	espatulenol	31,570	1573	25,238	0,088	0,779
	4	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,821	1882	245,446	2,113	0,861
	Total					398,427	
Extrato Volátil	1	3-careno	7,515	1013	21,473	0,585	2,725
	2	para-cimeno	9,149	1024	12,886	0,336	2,610
	3	terpinoleno	10,345	1096	73,793	9,916	13,437
	4	linalol	10,766	1281	12,251	1,107	9,039
	5	Δ -elemeno	20,595	1338	24,614	1,607	6,529
	6	β -elemeno	22,936	1393	15,809	0,511	1,622
	7	γ -elemeno	24,870	1434	31,518	0,511	1,622
	8	germacreno D	26,284	1481	38,401	1,803	4,694
	9	β -selineno	26,804	1486	23,193	2,049	8,835
	10	curzereno	27,621	1498	28,592	4,743	16,588
	11	α -cadieno	28,693	1542	27,805	5,709	20,531
	12	germacreno B	29,298	1558	23,597	2,300	9,749
	13	espatulenol	31,580	1573	20,016	4,227	21,117
	14	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,764	1882	31,042	1,131	3,645
	15	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,150	1986	6,858	0,668	9,747
Total					391,849		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 40: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 40°C e 200 bar, analisados por CG-DIC.

40°C/ 200bar	N° picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,157	1434	22,358	0,008	0,035
	2	curzereno	27,623	1498	129,207	0,171	0,133
	3	germacreno B	29,301	1558	114,993	1,374	1,195
	4	espatulenol	31,570	1573	28,372	0,401	1,412
	5	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,806	1882	239,091	3,026	1,265
	Total					534,022	
Extrato volátil	1	3-careno	7,517	1013	33,863	0,564	1,665
	2	para-cimeno	9,149	1024	19,667	0,376	1,910
	3	terpinoleno	10,340	1096	5,696	0,157	2,763
	4	linalol	10,764	1281	7,351	0,151	2,060
	5	Δ -elemeno	19,837	1338	41,394	0,670	1,618
	6	β -elemeno	20,598	1393	25,213	0,414	1,643
	7	γ -elemeno	22,935	1434	10,695	0,170	1,588
	8	germacreno D	26,280	1481	45,444	0,698	1,535
	9	β -selineno	26,800	1486	26,805	0,227	0,846
	10	curzereno	27,624	1498	50,532	0,786	1,556
	11	α -cadieno	28,690	1542	28,713	0,546	1,902
	12	germacreno B	29,292	1558	39,405	0,561	1,423
	13	espatulenol	31,579	1573	32,775	0,657	2,005
	14	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,746	1882	18,112	0,155	0,857
	15	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,444	1986	21,364	0,241	1,130
Total					407,030		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 41: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 40°C e 250 bar, analisados por CG-DIC.

40°C/ 250bar	N° picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,157	1434	10,297	0,125	1,216
	2	curzereno	27,625	1498	59,665	0,167	0,279
	3	germacreno B	29,306	1558	59,985	0,287	0,478
	4	espatulenol	31,573	1573	14,560	0,200	1,371
	5	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,818	1882	127,866	1,474	1,153
	Total					272,374	
Extrato volátil	1	3-careno	7,509	1013	70,069	0,178	0,254
	2	para-cimeno	9,142	1024	41,156	0,059	0,143
	3	terpinoleno	10,763	1096	28,994	2,014	6,945
	4	linalol	11,368	1281	18,517	0,054	0,290
	5	terpinen-7-al	18,144	1281	19,670	1,123	5,709
	6	β -elemeno	22,932	1393	1,630	0,026	1,584
	7	germacreno D	26,276	1481	7,553	0,035	0,465
	8	β -selineno	26,798	1486	41,746	0,812	1,945
	9	curzereno	27,620	1498	99,431	0,412	0,414
	10	α -cadieno	28,686	1542	46,011	0,094	0,204
	11	germacreno B	29,295	1558	53,652	0,124	0,231
	12	espatulenol	31,575	1573	55,342	1,160	2,096
	13	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,779	1882	76,129	0,990	1,300
	14	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,156	1986	27,868	0,073	0,261
Total					587,769		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 42: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 40 °C e 300 bar, analisados por CG-DIC.

40°C/ 300bar	N° picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,167	1434	18,751	0,065	0,345
	2	germacreno D	26,275	1481	7,386	0,012	0,168
	3	curzereno	27,631	1498	52,788	0,036	0,067
	4	germacreno B	29,329	1558	98,020	0,148	0,151
	5	espatulenol	31,584	1573	24,822	0,037	0,151
	6	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,863	1882	198,280	1,028	0,518
	Total				400,048		
Extrato volátil	1	3-careno	7,516	1013	35,917	0,006	0,017
	2	para-cimeno	9,149	1024	26,274	0,118	0,448
	3	terpinoleno	10,341	1096	6,166	0,025	0,412
	4	acetato de linalol	16,528	1338	19,541	0,065	0,332
	5	terpinen-7-al	18,146	1281	1,007	0,004	0,393
	6	Δ -elemeno	20,588	1338	9,692	0,001	0,005
	7	β -elemeno	22,933	1393	14,671	0,045	0,308
	8	gama-elemeno	24,872	1434	7,025	0,025	0,361
	9	germacreno D	26,283	1481	65,076	0,004	0,006
	10	β -selineno	26,802	1486	36,587	0,431	1,179
	11	curzereno	27,621	1498	28,786	3,302	11,472
	12	α -cadieno	28,691	1542	41,044	0,070	0,170
	13	germacreno B	29,295	1558	61,924	0,410	0,662
	14	espatulenol	31,582	1573	49,726	0,430	0,865
	15	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,746	1882	21,566	0,411	1,908
	16	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,439	1986	22,178	0,071	0,321
	Total				425,002		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 43: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 50°C e 100 bar, analisados por CG-DIC.

50°C/ 100bar	N° picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,156	1434	11,328	0,019	0,168
	2	curzereno	27,623	1498	59,511	0,184	0,309
	3	germacreno B	29,297	1558	41,068	0,008	0,019
	4	espatulenol	31,569	1573	12,882	0,066	0,512
	5	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,798	1882	95,368	0,066	0,069
	Total					220,158	
Extrato volátil	1	3-careno	7,518	1013	8,561	0,089	1,036
	2	para-cimeno	9,151	1024	7,002	0,080	1,142
	3	terpinoleno	10,344	1096	1,793	0,018	1,017
	4	acetato de linalol	16,613	1338	1,981	0,014	0,714
	5	Δ -elemeno	20,592	1338	2,993	0,016	0,528
	6	β -elemeno	22,954	1393	17,848	0,201	1,128
	7	γ -elemeno	24,885	1434	6,415	0,071	1,104
	8	germacreno D	26,329	1481	46,246	0,300	0,649
	9	β -selineno	26,862	1486	51,213	1,509	2,946
	10	curzereno	27,639	1498	14,838	0,075	0,503
	11	α -cadieno	28,744	1542	42,875	0,072	0,168
	12	germacreno B	29,422	1558	132,218	1,176	0,889
	13	espatulenol	31,663	1573	66,820	0,732	1,096
	14	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,968	1882	139,237	0,488	0,351
	15	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,239	1986	35,740	0,116	0,325
Total					575,780		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 44: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 50 °C e 150 bar, analisados por CG-DIC.

50°C/ 150bar	N° picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calç	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,156	1434	11,328	0,019	0,168
	2	curzereno	27,623	1498	59,511	0,184	0,309
	3	germacreno B	29,297	1558	41,068	0,008	0,019
	4	espatulenol	31,569	1573	12,882	0,066	0,512
	5	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,798	1882	95,368	0,066	0,069
	Total					220,158	
Extrato volátil	1	3-careno	7,518	1013	17,315	0,129	0,743
	2	para-cimeno	9,151	1024	8,371	0,032	0,384
	3	acetato de linalol	16,529	1338	5,801	0,041	0,699
	4	Δ -elemeno	20,589	1338	3,186	0,019	0,600
	5	β -elemeno	22,936	1393	7,698	0,078	1,015
	6	γ -elemeno	24,875	1434	3,587	0,035	0,965
	7	germacreno D	26,290	1481	34,762	0,244	0,703
	8	β -selineno	26,808	1486	20,664	0,327	1,581
	9	curzereno	27,626	1498	25,930	0,173	0,669
	10	germacreno B	29,305	1558	38,955	0,301	0,773
	11	espatulenol	31,588	1573	26,471	0,164	0,621
	12	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,775	1882	25,847	0,277	1,074
	13	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,156	1986	3,434	1,958	57,032
Total					222,018		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 45: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 50 °C e 200 bar, analisados por CG-DIC.

50°C/ 200bar	N° picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calç	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,161	1434	14,605	0,010	0,069
	2	germacreno D	26,271	1481	7,547	0,030	0,402
	3	curzereno	27,627	1498	68,120	0,211	0,310
	4	germacreno B	29,303	1558	55,336	0,126	0,227
	5	espatulenol	31,574	1573	16,808	0,030	0,177
	6	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,798	1882	110,300	0,380	0,345
	Total				272,715		
Extrato volátil	1	3-careno	7,519	1013	25,059	0,217	0,866
	2	para-cimeno	9,151	1024	9,335	0,046	0,490
	3	Δ -elemeno	20,593	1338	11,972	0,023	0,190
	4	β -elemeno	22,935	1393	9,272	0,025	0,266
	5	γ -elemeno	24,873	1434	3,921	0,011	0,268
	6	germacreno D	26,282	1481	37,106	0,089	0,241
	7	β -selineno	26,801	1486	21,101	0,025	0,117
	8	curzereno	27,625	1498	37,378	0,035	0,092
	9	germacreno B	29,297	1558	38,707	0,031	0,081
	10	espatulenol	31,580	1573	27,952	0,048	0,172
	11	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,762	1882	30,501	0,001	0,003
	12	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,148	1986	6,712	0,004	0,054
	Total				259,016		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 46: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 50 °C e 250 bar, analisados por CG-DIC.

50°C/ 250bar	Nº picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calç	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,160	1434	20,058	0,016	0,080
	2	germacreno D	26,268	1481	8,136	0,011	0,133
	3	curzereno	27,625	1498	65,759	0,119	0,181
	4	germacreno B	29,315	1558	103,723	0,042	0,040
	5	espatulenol	31,575	1573	26,213	0,117	0,445
	6	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,844	1882	208,060	0,508	0,244
	Total				431,949		
Extrato volátil	1	3-careno	7,519	1013	34,193	0,385	1,125
	2	para-cimeno	9,152	1024	19,728	0,122	0,618
	3	linalol	10,769	1281	6,467	0,039	0,599
	4	acetato de linalol	16,531	1338	15,974	0,539	3,377
	5	terpinen-7-al	18,149	1281	8,776	0,055	0,624
	6	Δ -elemeno	20,590	1338	8,346	0,031	0,368
	7	β -elemeno	22,936	1393	11,070	0,101	0,909
	8	germacreno D	26,281	1481	46,403	0,219	0,472
	9	β -selineno	26,801	1486	25,143	0,558	2,220
	10	curzereno	27,623	1498	48,835	0,197	0,403
	11	germacreno B	29,294	1558	43,713	0,320	0,732
	12	espatulenol	31,578	1573	33,169	0,437	1,318
	13	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,747	1882	22,988	0,133	0,580
	14	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,440	1986	20,951	0,017	0,080
	Total				345,756		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 47: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 50 °C e 300 bar, analisados por CG-DIC.

50°C/ 300bar	Nº picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calç	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,157	1434	15,352	0,055	0,359
	2	curzereno	27,622	1498	67,393	0,244	0,362
	3	alfa-cadieno	28,682	1542	8,416	0,442	5,255
	4	germacreno B	29,308	1558	80,460	0,313	0,389
	5	espatulenol	31,571	1573	19,416	0,184	0,947
	6	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,827	1882	174,229	1,423	0,817
	Total				365,265		
Extrato Volátil	1	3-careno	7,519	1013	30,834	0,164	0,533
	2	para-cimeno	9,150	1024	12,766	0,018	0,141
	3	Δ -elemeno	20,592	1338	11,192	0,011	0,095
	4	β -elemeno	22,937	1393	8,758	0,024	0,276
	5	germacreno D	26,283	1481	37,861	0,069	0,182
	6	β -selineno	26,804	1486	20,656	0,154	0,746
	7	curzereno	27,626	1498	44,810	0,098	0,219
	8	germacreno B	29,296	1558	37,026	0,163	0,440
	9	espatulenol	31,580	1573	27,866	0,107	0,384
	10	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,755	1882	21,378	0,012	0,054
	11	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,446	1986	18,603	0,006	0,031
	Total				271,752		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 48: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 60 °C e 100 bar, analisados por CG-DIC.

60°C/ 100bar	N° picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	curzereno	27,625	1498	96,888	0,081	0,083
	2	germacreno B	29,325	1558	169,853	0,290	0,171
	3	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,837	1882	271,742	1,927	0,709
	Total					538,483	
Extrato Volátil	1	3-careno	7,516	1013	11,564	0,078	0,675
	2	para-cimeno	9,149	1024	9,002	0,077	0,852
	3	terpinoleno	10,342	1096	2,443	0,011	0,435
	4	linalol	10,769	1281	3,394	0,015	0,447
	5	acetato de linalol	16,534	1338	5,682	0,027	0,468
	6	terpinen-7-al	18,150	1281	3,741	0,017	0,444
	7	Δ-elemeno	20,592	1338	3,619	0,003	0,091
	8	β-elemeno	22,949	1393	1,830	0,016	0,886
	9	γ-elemeno	24,882	1434	6,939	0,071	1,024
	10	germacreno D	26,321	1481	52,672	0,223	0,424
	11	β-selineno	26,848	1486	53,087	1,240	2,335
	12	curzereno	27,634	1498	18,288	0,049	0,267
	13	germacreno B	29,387	1558	121,186	1,141	0,942
	14	espatulenol	31,643	1573	65,782	1,011	1,537
	15	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,888	1882	93,101	0,553	0,594
	16	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,449	1986	10,817	0,053	0,492
Total					463,146		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 49: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 60 °C e 150 bar, analisados por CG-DIC.

60°C/ 150bar	Nº picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato Supercrítico	1	β-elemeno	22,938	1393	6,025	0,037	0,621
	2	γ-elemeno	25,163	1434	19,845	0,047	0,235
	3	curzereno	27,628	1498	56,868	0,124	0,219
	4	germacreno B	29,334	1558	138,371	0,169	0,122
	5	espatulenol	31,580	1573	29,434	0,155	0,527
	6	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,612	1882	272,423	0,026	0,010
	Total					522,967	
Extrato Volátil	1	3-careno	7,519	1013	21,731	0,113	0,521
	2	para-cimeno	9,153	1024	13,586	0,030	0,220
	3	terpinoleno	10,343	1096	4,215	0,028	0,656
	4	linalol	10,767	1281	4,718	0,024	0,513
	5	acetato de linalol	16,531	1338	5,417	0,081	1,497
	6	terpinen-7-al	18,149	1281	3,853	0,027	0,712
	7	Δ-elemeno	20,591	1338	3,655	0,007	0,203
	8	β-elemeno	22,940	1393	13,896	0,085	0,613
	9	γ-elemeno	24,877	1434	5,776	0,036	0,631
	10	germacreno D	26,294	1481	49,303	0,193	0,392
	11	β-selineno	26,814	1486	35,928	0,445	1,239
	12	curzereno	27,627	1498	32,204	0,100	0,310
	13	germacreno B	29,318	1558	73,944	0,443	0,600
	14	espatulenol	31,597	1573	45,901	0,314	0,683
	15	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,791	1882	49,995	0,291	0,582
	16	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,158	1986	11,076	0,030	0,268
Total					375,195		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 50: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica à 60 °C e 200 bar, analisados por CG-DIC.

60°C/ 200bar	Nº picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,160	1434	16,869	0,097	0,577
	2	curzereno	27,625	1498	72,494	0,359	0,495
	3	germacreno B	29,313	1558	98,856	0,490	0,495
	4	espatulenol	31,663	1573	23,800	0,126	0,528
	5	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,819	1882	162,679	0,319	0,196
	Total					374,698	
Extrato Volátil	1	3-careno	7,519	1013	21,537	0,120	0,558
	2	para cimeno	9,151	1024	12,389	0,021	0,170
	3	terpinoleno	10,342	1096	4,438	0,002	0,045
	4	linalol	10,764	1281	4,089	0,000	0,009
	5	Δ -elemeno	20,595	1338	12,975	0,022	0,171
	6	beta-selineno	22,935	1486	6,300	0,011	0,180
	7	germacreno D	26,284	1481	31,873	0,003	0,009
	8	β -selineno	26,805	1486	20,461	0,083	0,405
	9	curzereno	27,625	1498	30,832	0,042	0,136
	10	germacreno B	29,297	1558	32,544	0,024	0,074
	11	espatulenol	31,582	1573	23,937	0,205	0,857
	12	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,754	1882	16,020	0,120	0,748
	13	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,150	1986	4,117	0,023	0,565
Total					221,512		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 51: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 60 °C e 250 bar, analisados por CG-DIC.

60°C/ 250bar	Nº picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato Supercrítico	1	γ -elemeno	25,161	1434	13,388	0,003	0,019
	2	germacreno D	26,272	1481	7,236	0,010	0,134
	3	curzereno	27,627	1498	59,182	0,128	0,217
	4	germacreno B	29,312	1558	68,200	0,018	0,027
	5	espatulenol	31,577	1573	18,141	0,071	0,390
	6	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,817	1882	124,227	0,914	0,736
	Total				166,147		
Extrato Volátil	1	3-careno	7,519	1013	27,508	0,157	0,570
	2	para-cimeno	9,152	1024	15,167	0,055	0,361
	3	terpinoleno	10,342	1096	6,588	0,042	0,644
	4	linalol	10,762	1281	5,412	0,162	2,991
	5	Δ -elemeno	11,593	1338	12,166	0,000	0,004
	6	β -elemeno	22,938	1393	7,368	0,024	0,320
	7	germacreno D	26,287	1481	42,261	0,017	0,041
	8	β -selineno	26,804	1486	22,902	0,305	1,330
	9	curzereno	27,626	1498	40,118	0,017	0,042
	10	germacreno B	29,297	1558	36,579	0,037	0,102
	11	espatulenol	31,581	1573	28,322	0,341	1,204
	12	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,742	1882	11,375	0,028	0,246
	13	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,441	1986	16,416	0,060	0,367
	Total				272,181		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100

Tabela 52: Composição e identificação dos compostos presentes no extrato supercrítico e no extrato volátil de *E. uniflora* obtido por extração supercrítica a 60 °C e 300 bar, analisados por CG-DIC.

60°C/ 300bar	Nº picos	Composto	Tempo de retenção médio (min)	RI calc	C média (mg/g ext)	Desvio padrão	Erro (%)
Extrato supercrítico	1	γ -elemeno	25,159	1434	15,881	0,045	0,282
	2	germacreno D	26,270	1481	8,246	0,062	0,753
	3	curzereno	27,623	1498	71,928	0,526	0,732
	4	germacreno B	29,308	1558	85,179	0,415	0,488
	5	espatulenol	31,575	1573	21,786	0,392	1,797
	6	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,815	1882	157,489	3,078	1,955
	Total				360,508		
Extrato volátil	1	3-careno	7,520	1013	25,920	0,003	0,010
	2	para-cimeno	9,151	1024	12,834	0,022	0,174
	3	terpinoleno	10,342	1096	4,820	0,006	0,121
	4	linalol	10,763	1281	4,805	0,005	0,102
	5	Δ -elemeno	20,595	1338	13,279	0,034	0,254
	6	β -elemeno	22,935	1393	5,569	0,019	0,336
	7	germacreno D	26,281	1481	28,925	0,050	0,174
	8	β -selineno	26,802	1486	17,160	0,115	0,672
	9	curzereno	27,627	1498	37,723	0,051	0,135
	10	germacreno B	29,296	1558	30,229	0,036	0,120
	11	espatulenol	31,580	1573	21,828	0,093	0,426
	12	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	42,755	1882	17,985	0,008	0,047
	13	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	46,155	1986	5,472	0,017	0,313
	Total				226,550		

Erro (%)= (desvio padrão/C média)*100