

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DÉBORA NASCIMENTO E SANTOS

**Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição
dos extratos de sementes de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**

Pirassununga
2012

DÉBORA NASCIMENTO E SANTOS

**Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição
dos extratos de sementes de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira.

Pirassununga

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

S237e Santos, Débora Nascimento e
Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo
da composição dos extratos de sementes de pitanga
(*Eugenia uniflora* L.) / Débora Nascimento e Santos. --
Pirassununga, 2012.
99 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lopes de
Oliveira.

1. Extração supercrítica 2. *Eugenia uniflora* L.
3. GC/MS 4. Atividade antioxidante 5. Leishmaniose.
I. Título.

Com todo o amor do mundo e o peito cheio do agradecimento, dedico esse trabalho aos meus amados pais, Francisco e Helena, que souberam me fazer a criança mais feliz do mundo e tanto amor se transformou em asas para que meu voo aqui chegasse, sempre com o apoio de vocês. Às minhas irmãs, Bruna e Diana, que mesmo longe não fazem ideia da força que me transmitem e que me faz persistir. Ao meu amado Fabrício, que vem mostrando ter a paciência de um monge, eu dedico esse e todos os futuros trabalhos. Obrigada meu amor, por não desistir de mim. De fato, o mais difícil é ficar longe de vocês.

AGRADECIMENTOS

Acho maravilhoso olhar pra trás nesses dois anos e pensar que, se pudesse voltar no tempo e ter a chance de mudar como tudo aconteceu, só tiraria a dor que causei pela ausência (e claro, anteciparia todas as bolsas de estudos de todos os meus amigos e a minha!!), apenas isso. Foram momentos de alegria, pesar, inquietação, e sobretudo MUITO aprendizado, em todos os sentidos.

Agradeço a *Deus* por nunca soltar a minha mão e só colocar pessoas maravilhosas na minha vida, começando pela minha querida orientadora *Prof^a Dr^a. Alessandra Lopes de Oliveira*, à qual faltam palavras para agradecer tamanho carinho, orientação, confiança e atenção dispensadas. Foi uma honra ser a sua primeira orientanda de Pós-Graduação, espero ter correspondido às suas expectativas e tomara que no futuro eu possa repetir com muitos tudo o que aprendi com você.

À minha família, namorado e amigos (*Amanda, César Henrique, Davison, Frankeline, Janaína, Lucas, Mariana de Moraes, Mariana Séfora, Marina, Robson e tantos outros queridos*) da minha amada terra, que durante esse tempo me encheram de coragem e persistência.

À todos os professores do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA, obrigada pelos ensinamentos e orientações. Um agradecimento especial a *Prof.^a Dr^a. Eliana Setsuko*, que na ausência da minha orientadora, me ajudou bastante no início desta caminhada. Aos professores *Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira* e *Dr. Edson Roberto da Silva*, pelo uso dos seus laboratórios nas análises de perfil antimicrobiano e inibição da enzima arginase, respectivamente.

Aos meus queridos amigos e colegas: *Adja, Camila, Diane, Eliane, Graziella, Gisele e Fausto, Josianne, Júlio, Keliani, Maira, Mariana C. e K., Mirelle, Mirian, Naira, Natali, Noemi, Paola, Paula, Samira, Sarah, Thaise, e Volnei*; obrigada pelos momentos de alegria, descontração, apoio e torcida. Sei que tudo foi de coração. Essas palavras são também para a maravilhosa equipe do LTAPPN (minha segunda casa), *Nilson* e estagiários.

Aos queridos técnicos *Guilherme, Keila, Marcelo, Márcio e Roice*, obrigada pelo apoio técnico prestado e palavras de amizade.

À querida graduanda *Larissa Lima de Sousa*, por me acompanhar em todo o projeto e pelas horas de descontração que tornaram o trabalho menos cansativo. Sua seriedade no trabalho te levará para longe, assim espero.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESP pelo financiamento do projeto.

Somos o que pensamos. Tudo o que somos surge com nossos pensamentos.

Com nossos pensamentos, fazemos o nosso mundo.

Buda

RESUMO

Santos, D. N. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

A semente de Pitanga é resíduo do processamento da polpa e suco da fruta e os poucos trabalhos existentes sobre sua composição denotam grande valor nutricional. A extração com fluido supercrítico, pelos benefícios que apresenta, constitui uma excelente ferramenta para a obtenção e estudo de extratos. Assim, os objetivos deste trabalho foram obter extratos de sementes de Pitanga utilizando CO₂ supercrítico (SC-CO₂), caracterizá-los e avaliar possíveis atividades biológicas *in vitro*. As sementes lavadas, secas e trituradas foram caracterizadas e apresentaram umidade de 12,73%, granulometria de 0,48mm e extrato etéreo de 0,52%. As sementes foram colocadas em contato com o SC-CO₂ em diferentes condições de pressão (P) e temperatura (T), conforme um Delineamento Composto Central Rotacional com P e T como variáveis independentes. A condição operacional de rendimento mais elevado foi repetida com etanol como co-solvente (SC-EtOH). Para todos os extratos determinou-se o perfil de voláteis por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas (CG/EM), a concentração de compostos fenólicos totais (CFT), a atividade antioxidante pela inativação dos radicais DPPH e ABTS, e a presença de terpenos por cromatografia em camada delgada (CCD). Nos extratos, obtidos via SC-CO₂, Soxhlet e SC-EtOH, além de sua fração purificada, foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) com *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, e a inibição da enzima arginase de *Leishmania* e de rato. O rendimento dos extratos variou de 0,16 a 0,48%, sendo P a única variável que influenciou no processo (p<0,05). Na análise de superfície de resposta constatou-se que os melhores rendimentos foram obtidos a altas pressões, indicando que baixas temperaturas podem ser usadas para não degradar as substâncias termossensíveis. CFT variaram de 17,95 a 73,89 ppm em ácido gálico equivalente (GAE) nos extratos e P e T, no intervalo estudado, não influenciaram (p<0,05) na concentração destes compostos. A presença de terpenos com atividade antioxidante foi detectada preliminarmente, nas análises de CCD. O perfil de voláteis obtidos por CG/EM indicou como componentes majoritários os sesquiterpenos – γ -elemeno (12,54-37,76 ppm equivalente ao limoneno – EqLim) e germacrone (8,44-36,41 ppm EqLim), ambos com reconhecida atividade biológica. A concentração destes sesquiterpenos foi influenciada pela interação entre P e T. A atividade antibacteriana para os quatro extratos foi elevada apresentando uma CIM de 125 ppm para todos os micro-organismos testados. A inibição da

enzima arginase foi baixa para o extrato supercrítico, Soxhlet e a fração purificada, porém o extrato SC-EtOH inibiu em até 48% o que indica forte ação contra o desenvolvimento da *Leishmania*. Ainda, a inibição da arginase em mamíferos tem função vasodilatadora. O extrato SC-EtOH possui compostos diferentes dos demais devido à modificação da polaridade pelo co-solvente (EtOH). Esta hipótese é também constatada pela atividade antioxidante, que foi menor para os extratos supercríticos que para aqueles obtidos com SC-EtOH que apresentou maior concentração em equivalente de Trolox e inibição do radical DPPH de 94%. Os resultados mostram extratos de semente de Pitanga altamente promissores para aplicações contra enfermidades devido à ação antimicrobiana e inibitória da arginase.

Palavras-chave: extração supercrítica; *Eugenia uniflora* L.; GC/MS; atividade antioxidante; leishmaniose.

ABSTRACT

Santos, D. N. **Supercritical extraction with carbon dioxide and study of Pitanga seeds (*Eugenia uniflora* L.) extracts composition.** 2012. 99 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The Pitanga seed is a waste of the fruit pulp and juice processing, and the few existing studies on its composition denote a high nutritional value. Due to its benefits, the supercritical fluid extraction is an excellent tool to obtain and study extracts. Therefore, the objectives of this study were to obtain extracts of Pitanga seeds using supercritical CO₂ (SC-CO₂), characterize them and evaluate potential biological activities *in vitro*. The washed, dried and crushed seeds were characterized and presented 12.73% moisture, particle size of 0.48 mm and 0.52% ether extract. The seeds were placed in contact with the SC-CO₂ under different conditions of pressure (P) and temperature (T), according to a Central Composite Design with P and T as independent variables. The operational condition of higher yield was repeated with ethanol as co-solvent (SC-EtOH). For all extracts were determined: the profile of volatiles by gas chromatography with mass spectrometer (CG/ EM), the concentration of total phenolics compound (CFT), the inactivation of antioxidant activity by DPPH and ABTS radicals and the presence of terpenes by layer chromatography (CCD). In the extracts obtained by SC-CO₂, Soxhlet and SC-EtOH and its purified fraction, the minimum inhibitory concentration (CIM) with *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* were determined, as well as the inhibition of the enzyme arginase of *Leishmania* and rat. The yield of extracts ranged from 0.16 to 0.48%, being P the only variable that influenced the process (p <0.05). In response surface analysis it was found that the best yields were obtained at high pressures, indicating that low temperatures can be used not to degrade the thermo-sensitive substances. CFT ranged from 17.95 to 73.89 ppm gallic acid equivalent (GAE) in extracts and P and T, over the range studied, did not influence (p <0.05) the concentration of these compounds. The presence of terpene with antioxidant activity was detected preliminary, in the analysis of CCD. The volatile profile obtained by CG/ EM indicated the sesquiterpenes as major components - γ -elemeno (12.54 to 37.76 equivalent to ppm limonene - EqLim) and germacrone (8.44 to 36.41 ppm EqLim), both with recognized biological activity. The concentration of these sesquiterpenes was influenced by the interaction between P and T. The antibacterial activity for the four extracts presented a high CIM of 125 ppm for all microorganisms tested. The inhibition of the enzyme arginase was low for the supercritical extract, Soxhlet and purified fraction, but the SC-EtOH extract inhibited up to 48% indicating strong action against the development of *Leishmania*. Furthermore, the inhibition of arginase in mammals has a vasodilator function. The SC-EtOH extract possesses different compounds

due to the modification of their polarity with the co-solvent (EtOH). This hypothesis is also confirmed by the antioxidant activity, which was lower for the supercritical extracts compared with the extracts obtained with SC-EtOH, with the highest equivalent concentration of Trolox and DPPH radical inhibition of 94%. The results show that extracts of Pitanga seeds are highly promising for applications against diseases, due to antimicrobial activity and inhibition of arginase.

Keywords: Supercritical extraction; *Eugenia uniflora* L.; GC/ MS; antioxidant activity; leishmaniasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Pitangueira.....	27
Figura 2 - Biossíntese de compostos terpênicos a partir de isopentil difosfato em tecidos vegetais.....	31
Figura 3 - Semente de Pitanga seca inteira (A) e triturada (B).....	41
Figura 4 - Extração da semente de Pitanga utilizando Soxhlet (A). Detalhe do arraste de lipídios pelo solvente líquido (B).....	42
Figura 5 - Sistema de extração com CO ₂ supercrítico do LTAPPN, FZEA/USP (A). Extrato supercrítico de semente de Pitanga (B).	44
Figura 6 – Curva padrão de Limoneno para o cálculo da concentração de sesquiterpenos expresso em Equivalente de Limoneno (EqLim) dos extratos de semente de Pitanga.....	49
Figura 7 - Curva padrão de ácido gálico para determinação quantitativa de compostos fenólicos totais.....	50
Figura 8 - Curva padrão que relaciona a concentração de Trolox com a resposta da inibição do ABTS•+ com leitura feita a 734 nm.	51
Figura 9 – Rendimento das extrações de semente de Pitanga em função da densidade do CO ₂ supercrítico.....	58
Figura 10 - Diagrama de Pareto das variáveis (P e T) estudadas no rendimento de extratos supercríticos de semente de Pitanga.	59
Figura 11 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que mostra os efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração.	61
Figura 12 – Massa acumulada de extração em função do tempo de extração.	62
Figura 13 – Massa acumulada de extração em função do volume acumulado de CO ₂	63
Figura 14 – Índice de refração dos extratos SFE de sementes de Pitanga a 20 e 40°C.	64
Figura 15 – Cromatograma dos extratos das sementes de Pitanga, em placa de Sílica Gel 60 F254 com fase móvel tolueno e acetato de etila (93:7 v:v) e revelador Anisaldeído para a detecção de terpenos.	65
Figura 16 – Cromatograma dos extratos das sementes de Pitanga em Cromatografia de Camada Delgada, em placa de Sílica Gel 60 F ₂₅₄ com fase móvel tolueno e acetato de etila (93:7 v:v) e revelador uma solução 0,05% do radical DPPH.	67
Figura 17 - Cromatograma de íons total (total ion chromatography, TIC) dos extratos de semente de Pitanga (ensaio 1 ao 8, de baixo pra cima), coluna capilar Rtx®-5MS; fase móvel metanol. Detalhe na seção ampliada, em que são evidenciados os principais picos.	69

Figura 18 - Cromatograma de íons total (<i>total ion chromatography</i> , TIC) da fração Soxhlet e dos extratos supercríticos (ensaios 9, 10 e 11 de baixo para cima) de semente de Pitanga; coluna capilar Rtx®-5MS; fase móvel metanol. Os picos em destaques estão igualmente mostrados na Figura 17.	70
Figura 19 – Espectros de massa (EM) dos compostos majoritários dos extratos de semente de Pitanga. A: EM do gama-elemeno dos extratos. B: EM do gama-elemeno da biblioteca NIST. C: EM do furanodieno dos extratos. D: EM do curzereno da biblioteca NIST. E: EM do germacrone dos extratos. F: EM do germacrone da biblioteca NIST.....	72
Figura 20 - Diagrama de Pareto das variáveis (P e T) estudadas na obtenção de germacrone (A) e γ -elemeno (B) nos extratos supercríticos de semente de Pitanga.....	74
Figura 21 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que mostra os efeitos das variáveis independentes na concentração de germacrone (21.A) e γ -elemeno (21.B) nos extratos.....	76
Figura 22 - Diagrama de Pareto das variáveis (P e T) estudadas na quantidade de compostos fenólicos dos extratos de semente de Pitanga.	77
Figura 23 - Diluição seriada do extrato supercrítico de semente de Pitanga para determinação da concentração inibitória mínima.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de algumas propriedades físicas do gás, líquido e fluido supercrítico.	19
Tabela 2 - Propriedades críticas de solventes que podem ser usados na extração supercrítica.	20
Tabela 3 - Níveis dos dois fatores, pressão e temperatura, no DCCR.	44
Tabela 4 - Matriz do DCCR de dois fatores incluindo três pontos centrais para o estudo do efeito da pressão e temperatura nos extratos da semente de Pitanga.	45
Tabela 5 – Diluição e conteúdo dos tubos de ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima.	53
Tabela 6 - Umidade e extrato etéreo da semente de Pitanga seca e triturada.	55
Tabela 7 - Densidade aparente da amostra de semente de Pitanga seca e triturada.	55
Tabela 8 – Massa de sementes de Pitanga secas e trituradas retidas nas peneiras usadas na determinação do diâmetro médio das partículas.	56
Tabela 9 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional de dois fatores (P e T) com três pontos centrais para o estudo do efeito da pressão e temperatura no rendimento (R), concentrações de compostos fenólicos totais (CFT) e voláteis dos extratos de semente de Pitanga.	57
Tabela 10 - Coeficientes de regressão significativos para modelos linear e quadrático que simulam o rendimento dos extratos de semente de Pitanga obtidos com CO ₂ supercrítico.	60
Tabela 11 - ANOVA para os modelos de primeira e segunda ordem do DCCR para o rendimento (%) dos extratos.	60
Tabela 12 – Índice de retenção dos compostos revelados pela Cromatografia em Camada Delgada dos extratos das sementes de Pitanga, em placa de Sílica Gel 60 F ₂₅₄ com fase móvel tolueno e acetato de etila (93:7 v:v) e revelador Anisaldeído.	66
Tabela 13 - Composição da fração volátil dos extratos supercríticos da semente de Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i>) obtidos por análise em GC/MS em coluna Rtx®-5MS.	70
Tabela 14 - Coeficientes de regressão para modelos linear e quadrático que simulam a concentração dos sesquiterpenos (Germacrone e γ -elemeno) nos extratos de semente de Pitanga obtidos com CO ₂ supercrítico.	74
Tabela 15 - ANOVA para os modelos de primeira e segunda ordem do DCCR com dois fatores para a concentração de germacrone (ppm EqLim) dos extratos.	75
Tabela 16 - ANOVA para os modelos de primeira e segunda ordem do DCCR com dois fatores para a concentração de γ -elemeno (ppm EqLim) dos extratos.	75

Tabela 17 – Atividade antioxidante dos extratos de semente de Pitanga pelo percentual de inibição do radical DPPH· em três concentrações e pelo método de varredura do radical ABTS.	79
Tabela 18 - Concentração inibitória mínima (ppm) dos diferentes extratos de semente de Pitanga.	83
Tabela 19 - Porcentagem (%) da atividade de inibição da arginase isolada de fígado de rato e da <i>Leishmania</i>	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	Radical 2,2 azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
Acetil-CoA	acetil-co-enzima-A
AI	Índice de Van der Dool e Kratz
ASR	Análise de superfície de resposta
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFT	Compostos fenólicos totais
CG/ EM	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massas acoplado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EFS	Extração com fluido supercrítico
EM	Espectro de massa
EqLim	Equivalente de Limoneno
ER	Equivalente de retinol
ESA	Extração por solvente avançado
EtOH	Etanol
FRAP	Capacidade de redução de íons ferro em plasma
GAE	Equivalente de ácido gálico
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-Co-A
IPP	Isopentenil difosfato
KI	Índice de Kovatz
MeOH	Metanol
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
P	Pressão
SC-CO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
SC-EtOH	Extração supercrítica com etanol como co-solvente
SLCC	Sucos de Laranja Concentrado e Congelado
T	Temperatura
TIC	<i>Total ion chromatography</i>
UFC	Unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	18
2.1.1 O uso de co-solvente	22
2.1.2 O estudo da cinética de extração	24
2.2 PITANGA (<i>EUGENIA UNIFLORA</i> L.)	26
2.3 COMPOSTOS TERPÊNICOS	29
2.4 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE MATRIZES VEGETAIS	33
2.4.1 Atividade antioxidante	33
2.4.2 Atividade antimicrobiana	35
2.4.3 Inibição da enzima arginase	38
3 OBJETIVOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA SEMENTE DE PITANGA	41
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	41
4.2.1 Umidade	41
4.2.2 Extrato etéreo	42
4.2.3 Granulometria	42
4.2.4 Densidade aparente	43
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	43
4.3.1 Processo de extração	43
4.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional	44
4.3.3 Extração supercrítica com co-solvente (SC-EtOH)	45
4.3.4 Purificação do extrato supercrítico obtido com co-solvente	45
4.3.5 Cinética de extração	46
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	46
4.4.1 Índice de refração	46
4.4.2 Caracterização dos extratos em cromatografia em camada delgada (CCD)	46
4.4.3 Análise do perfil de voláteis por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM)	47
4.4.4 Análise de compostos fenólicos totais (CFT)	49
4.4.5 Atividade antioxidante pelo método DPPH	50
4.4.6 Atividade antioxidante pelo método ABTS	51
4.4.7 Determinação da atividade antimicrobiana - concentração inibitória mínima	52
4.4.9 Inibição da enzima arginase	53
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE DE PITANGA.....	55
5.2 DETERMINAÇÃO DE RENDIMENTO GLOBAL.....	56
5.3 DETERMINAÇÃO DE CINÉTICA DE EXTRAÇÃO.....	61
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	63
5.4.1 <i>Índice de refração e cromatografia em camada delgada</i>	64
5.4.2 <i>Composição volátil dos extratos</i>	67
5.5 ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DO EXTRATO SUPERCRÍTICO DE SEMENTE DE PITANGA	77
5.5.1 <i>Quantificação dos compostos fenólicos totais</i>	77
5.5.2 <i>Quantificação da atividade antioxidante</i>	78
5.5.3 <i>Determinação da atividade antimicrobiana</i>	81
5.5.4 <i>Determinação da inibição da enzima arginase</i>	83
6 CONCLUSÕES	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1 INTRODUÇÃO

A Pitanga, uma fruta de crescente importância no cenário brasileiro, é composta de polpa e semente, a qual é responsável por 31% do peso total da fruta. A fruta e a polpa são detentoras de substâncias com inúmeras propriedades funcionais, visto a sua elevada concentração em carotenóides. Sendo resíduo do processamento da polpa em suco ou polpa congelada, as sementes atualmente não apresentam nenhuma aplicação industrial. O estudo da composição dos extratos das sementes e suas atividades biológicas vão de encontro às perspectivas da indústria de alimentos, que prezam pelo total aproveitamento das matérias-primas (SANTOS *et al.*, 2011).

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos óleos essenciais de cítricos, que são subprodutos da indústria de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC). No passado, o país teve destaque como exportador de óleo essencial de pau-rosa, sassafrás e menta. Nos dois últimos casos, passou à condição de importador (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Na obtenção de óleos essenciais, além do enfoque dado às matrizes vegetais, como a semente de Pitanga, por exemplo, a escolha do método de extração é fundamental para a preservação das suas características. Dentre os novos métodos de extração existentes, o que utiliza fluido supercrítico têm se tornado foco de estudos, já que este possui várias vantagens em relação aos demais métodos, pelas condições brandas de operação, ausência de resíduos após a extração, dentre outras (SANTOS *et al.*, 2011). Inúmeros trabalhos mostram que a qualidade dos extratos obtidos pela extração supercrítica são superiores aos obtidos pelos métodos convencionais. Porém, quando se remete a tecnologia supercrítica, sabe-se que o investimento inicial de uma planta industrial possui custo mais elevado tendo em vista as particularidades de um sistema que opera a alta pressão. Para se chegar a condições otimizadas de operação e baratear o produto final, é crucial o estudo das variáveis que interferem no processo, para que se possam obter os rendimentos máximos, o que se consegue através de um planejamento experimental e análise de superfície de resposta das variáveis estudadas na operação.

A busca por produtos naturais com propriedades biológicas e que não ofereçam riscos aos consumidores é crescente e tem sido tema de trabalhos de inúmeros grupos de pesquisa. As diversas metodologias existentes para a avaliação e comprovação de atividades bioativas (antimicrobiano, antioxidante, antineoplásica, antimutagênica, dentre outras) auxiliam na pesquisa de aplicações de tais produtos e justificam etapas posteriores,

quando necessárias, como a purificação destes produtos naturais ou mesmo a aplicação em testes *in vivo*, os quais são bem mais complexos.

Neste trabalho foram obtidos extratos supercríticos de semente de Pitanga, sob condições pré-estabelecidas de pressão e temperatura. Foi realizado o estudo destes extratos avaliando sua composição volátil, quantidade de compostos fenólicos totais, além de ensaios de bioatividade, tais como a antimicrobiana, antioxidante e de inibição da enzima arginase.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Extração com Fluidos Supercríticos

Desde os primórdios históricos praticou-se a extração de substâncias a partir de matrizes vegetais, com fins alimentícios, aromáticos e medicamentosos. A finalidade sempre foi obter um produto mais específico, puro e padronizado (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1986). O fracionamento de misturas naturais complexas para a obtenção de compostos puros ou concentrados de interesse tem sido objeto de pesquisas. Os métodos tradicionais de obtenção de extratos são destilação a vapor (com ou sem vácuo), extração por solvente líquido, cromatografia preparativa, adsorção e processos seletivos por membranas. O uso da extração com fluido supercrítico e, em particular com o dióxido de carbono supercrítico, é uma alternativa interessante devido às várias vantagens que apresenta (GAÑÁN; BRIGNOLE, 2011).

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na recuperação de compostos bioativos de fontes naturais para o desenvolvimento de alimentos funcionais. A extração com fluido supercrítico (EFS) tem sido reconhecida como um procedimento promissor para aplicações em alimentos, na área farmacêutica e cosmética, pois proporciona maior seletividade, menores tempos de extração e não utiliza solventes orgânicos tóxicos (SERRA *et al.*, 2010).

O potencial do fluido supercrítico como solvente foi inicialmente estudado na década de 60, por uma equipe de pesquisadores russos em Kniipp, e nos Estados Unidos pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, na Califórnia. Os equipamentos em pequena e grande escala surgiram no mercado na década de 70 e as primeiras plantas em escala industrial surgiram na década de 80 na Alemanha, para a descafeinação de café e para a extração de lúpulo. Esta operação, embora ainda não tenha uma aplicação industrial mundialmente disseminada, tem despertado grande interesse de pesquisas devido às suas vantagens que refletem na qualidade dos produtos extraídos quando comparados com aqueles extraídos por técnicas convencionais (PENEDO, 2007).

A tecnologia com fluidos supercríticos tem se desenvolvido consideravelmente em um grande número de setores industriais. Fluidos supercríticos são empregados para extração de várias substâncias tais como a cafeína do café, nicotina do tabaco, óleos de alimentos, em corantes de tecidos fabris ou como fase móvel em cromatografia de fluidos supercríticos (MARSAL *et al.*, 2000).

O fluido quando submetido à pressão e temperatura acima de seu ponto crítico torna-se supercrítico. Várias propriedades dos fluidos são alteradas sob essas condições, tornando-se parecidas com as de alguns gases e líquidos. A densidade do fluido supercrítico é similar à dos líquidos, sua viscosidade assemelha-se à dos gases e sua capacidade de difusão é intermediária entre os dois estados. Portanto, o estado supercrítico de fluidos pode ser definido como o estado no qual líquido e gás são indistinguíveis entre si. Devido à sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão (Tabela 1), os fluidos supercríticos apresentam propriedades de transporte melhores que os líquidos, permitindo que as taxas de extração aumentem. Podem se difundir facilmente através de materiais sólidos, resultando em melhores rendimentos nas extrações (ANDREO; JORGE, 2006; BERNA *et al.* 2000).

Tabela 1 - Comparação de algumas propriedades físicas do gás, líquido e fluido supercrítico.

Propriedades físicas	Gás (1atm, 15 – 30°C)	Fluido supercrítico		Líquido 15 – 30°C
		T_c, P_c	$T_c, 4P_c$	
Coefficiente de difusão ^a (cm ² .s ⁻¹)	0,1-0,4	$0,7 \times 10^{-3}$	$0,2 \times 10^{-3}$	$(0,2-2) \times 10^{-5}$
Viscosidade (g.cm ⁻¹ .s ⁻¹)	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(3-9) \times 10^{-4}$	$(0,2-3) \times 10^{-2}$
Densidade (g.L ⁻¹)	$(0,6-2) \times 10^{-3}$	0,2-0,5	0,4-0,9	0,6-1,6

^a autodifusão para gás e gás denso; mistura binária para líquido.
 FONTE: TZIA; LIADAKIS, 2003.

Alguns fluidos têm sido examinados como solventes em estado supercrítico. Por exemplo, hidrocarbonetos como hexano, pentano e butano, óxido nitroso, hexafluoreto de enxofre e hidrocarbonetos fluorados. Entre estes, o dióxido de carbono (CO₂) é o mais popular solvente supercrítico porque ele é seguro, facilmente disponível e tem um baixo custo (REVERCHON; DE MARCO, 2006). Na análise dos valores de pressão e temperatura crítica de diferentes solventes (Tabela 2) nota-se que existem substâncias que possuem condições muito brandas de operação, como o etano, etileno e clorotrifluormetano. Porém, desvantagens como ser reativo, caro, pouco disponível e deixar resíduos após o processo, fizeram do dióxido de carbono a opção melhor empregável.

O uso da extração com dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) como solvente tem um interesse crescente para a recuperação de compostos benéficos à saúde, sendo por isso, adequado para aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Dióxido de carbono é um solvente ideal para a extração de produtos naturais, porque é de baixa toxicidade, não explosivo, prontamente disponível e fácil de remover a partir de produtos extraídos. Por fazer parte de um método de extração livre de solventes orgânicos, o uso do CO₂ é

favorável ao meio ambiente e, além disso, por possuir uma temperatura crítica de 31°C oferece a possibilidade de recuperar com o mínimo de danos possíveis os compostos naturais termossensíveis, preservando suas propriedades bioativas. A desvantagem do dióxido de carbono supercrítico é que os compostos polares muitas vezes são difíceis de extrair. Essa dificuldade pode ser facilmente resolvida usando pequenas quantidades de modificadores orgânicos ou co-solventes (DANH *et al.*, 2009; LAROZE *et al.*, 2010; SALGIN, 2007).

Tabela 2 - Propriedades críticas de solventes que podem ser usados na extração supercrítica.

Solvente	Temperatura Crítica (°C)	Pressão Crítica (bar)
Dióxido de carbono	31,10	73,76
Etano	32,30	48,84
Etanol	240,75	61,40
Etileno	9,30	50,36
Propano	96,70	42,45
Propileno	91,90	46,20
Ciclohexano	280,30	40,73
Benzeno	289,00	48,94
Tolueno	318,60	41,14
Clorotrifluormetano	28,90	39,21
Triclorofluormetano	198,10	44,70
Amônia	132,50	112,77
Água	374,20	220,48

FONTE: DIEHL, 2008.

Um empecilho à propagação industrial desta tecnologia reporta-se ao custo inicial de montagem da planta de operação. O equipamento que opera à alta pressão é mais caro que aqueles dos processos de separação convencionais, contudo, conforme Goodarznia e Eikani (1998), o custo de funcionamento é geralmente inferior, e isto faz com que o custo total sejam comparáveis quando o processo for conduzido em condições otimizadas e com volume de extração adequado.

Para possíveis aplicações industriais, a otimização e avaliação do processo de extração com modelagem matemática são fundamentais. Em métodos clássicos, os parâmetros de processo são otimizados através da realização de experimentos concentrando-se em um fator de cada vez, o que é mais trabalhoso e demorado, e também ignora o efeito da interação entre os parâmetros do processo. Comparado aos métodos

clássicos, a metodologia de superfície de resposta (ASR) é mais eficiente pois, requer menos dados e fornece os efeitos da interação entre as variáveis na resposta. Por isso, tem sido amplamente aplicada para aperfeiçoar os parâmetros de processamento na produção de alimentos e medicamentos, por exemplo (XIA *et al.*, 2011).

Sobrepunhando a dificuldade de custos e operando em condições de altos rendimentos, o produto extraído através desta tecnologia é de boa qualidade e pouco necessita de operações de refino posteriores. Portanto, os extratos obtidos via extração com CO₂ supercrítico são geralmente reconhecidos como seguro (*Generally Recognised as Safe - GRAS*) para ser usado na produção de alimentos. A tecnologia de extração com SC-CO₂ tem sido aplicada na extração de óleos a partir de um grande número de materiais e seus extratos têm demonstrado um alto potencial para futuras aplicações em fármacos e alimentos (ZHANG *et al.*, 2010).

No processo de extração, vários fatores interferem no rendimento final, como o tipo de matriz envolvida, por exemplo. Estudos comparativos de diferentes procedimentos de secagem das matrizes vegetais mostraram que o melhor rendimento do soluto em estudo é obtido a partir da biomassa seca naturalmente (exposição ao ar), enquanto que o material seco em estufa fornece menor rendimento. Análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a amostra seca em estufa tem uma película superficial sólida que contrasta com a superfície porosa das matrizes secas ao ar (MOLYNEUX; COLEGATE, 2008).

Outro fator que influencia no rendimento da extração é o tamanho das partículas da matriz vegetal. Como uma tendência geral, a diminuição do tamanho das partículas gera um aumento do rendimento de extração. O menor tamanho de partícula facilita o acesso do solvente de extração até o soluto, reduzindo as limitações de transferência de massa. A redução das partículas é, provavelmente, associada a uma quebra mais intensa da parede celular e o rompimento da parede celular facilita a difusão do soluto (LAROZE *et al.*, 2010). Por exemplo, os óleos são armazenados dentro de vesículas celulares. Após a moagem, estas vesículas podem ser danificadas levando a uma liberação mais rápida dos óleos. Assim, quanto mais as vesículas são danificadas, mais acessível o soluto fica para o dióxido de carbono supercrítico, levando a um maior rendimento de extração (MHEMDI *et al.*, 2001).

A quantidade de água disponível presente no substrato também pode condicionar o rendimento final do processo de extração. Sahena *et al.* (2009) reportam que o alto teor de umidade reduz o contato da matriz com o SC-CO₂, devido à consistência pastosa que a amostra apresenta, e nesses casos a umidade atua como uma barreira para a difusão da SC-CO₂ na amostra, assim como para a difusão de lípidos para fora desta. O aumento da recuperação lipídica com a diminuição do conteúdo de umidade tem sido demonstrada em amostras úmidas tais como a carne e de peixe, embora a umidade não afeta a

extratibilidade destes a níveis baixos. Assim, amostras com alto teor de umidade são geralmente liofilizadas antes da extração com SC-CO₂ para melhorar a sua eficiência.

Ainda na redução de partículas, a utilização do CO₂ como agente de extrusão pode anteceder a própria operação de extração. Alguns autores propuseram um pré-tratamento original para a extração do óleo de sementes que consistiu de uma rápida depressurização do sistema contendo a matriz vegetal e o CO₂ pressurizado no sentido de quebrar as células das sementes. Foi mostrado que a depressurização em poucos segundos a partir de 20MPa e 35°C em condições atmosféricas aumentou a quantidade de óleo recuperado na extração (BOUTIN; BADENS, 2009).

Outra aplicação que vem ganhando espaço é o processo de tingimento com CO₂ supercrítico. Esta tecnologia limpa se tornou uma alternativa viável para o tingimento convencional de tecidos, o qual utiliza quantidades excessivas de água. As vantagens do CO₂ supercrítico neste processo referem-se ao fato de poder ser reciclado, ser barato, essencialmente não-tóxico, não inflamável e ter fácil acesso às condições críticas. Além destas vantagens comuns a todas as suas aplicações neste processo, os restos de corante dissolvido no fluido supercrítico podem ser recuperados quando o fluido é expandido. Estudos mostram o sucesso desta técnica no tingimento de polímeros (poli tereftalato de etileno e polipropileno) e fibras naturais (algodão e lã). Neste sentido, pesquisas seguem estudando as condições operacionais que favorecem uma melhor solubilidade dos corantes no fluido supercrítico, aperfeiçoando o processo (CABRAL *et al.*, 2007).

Demonstrando algumas das aplicações essenciais do CO₂ supercrítico em diferentes e relevantes processos, vale revisar àquelas que correlacionam o emprego de co-solventes ou modificadores nos processos de extração, mesmo porque também é enfoque deste trabalho.

2.1.1 O uso de co-solvente

O uso de co-solventes em extração com fluido supercrítico (pequenas quantidades de solventes orgânicos combinados com CO₂ supercrítico) tem sido empregado para melhorar a eficiência da extração, aumentando a produtividade e modificando a seletividade do processo. O co-solvente pode alterar algumas características da mistura de solventes (CO₂ e co-solvente), tais como polaridade e interações específicas com o soluto, formando pontes de hidrogênio ou interagindo com sítios ativos da matriz sólida (DALMOLIN *et al.*, 2010).

Propano/butano, metanol, etanol e outras substâncias podem ser usadas como co-solventes (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001). Alguns autores estudaram o uso de etanol (EtOH) como co-solvente para obter extratos supercríticos e observaram que a solubilidade do extrato aumentou com o aumento da concentração deste co-solvente

(DALMOLIN *et al.*, 2010). A presença de etanol afeta positivamente a extração de polifenóis. Este fato está relacionado com as interações covalentes (ligações de hidrogênio) e dipolo-dipolo que aumentam a solubilidade de compostos fenólicos. Outros autores já mostraram que a solubilidade de polifenóis em (SC-CO₂ + etanol) depende da polaridade final adquirida pelo sistema de extração (SERRA *et al.*, 2010).

Os resultados do rendimento de extratos constituintes de compostos fenólicos na extração com fluido supercrítico aumentam diretamente com a polaridade do solvente. O uso de etanol como co-solvente demonstrou-se particularmente viável para melhorar o rendimento desta fração fenólica. A uma temperatura constante, o aumento da pressão aumentou o rendimento devido ao aumento da densidade, já para uma pressão constante, o rendimento total e da fração fenólica decresceu quando a temperatura aumentou devido à redução da densidade do solvente (GARCIA-SALAS *et al.*, 2010).

Trabalhos de pesquisa que indicam a influência de etanol como co-solvente receberam especial atenção já que estes resultados serviram como parâmetros indicativos de procedimentos adaptados neste trabalho. Somado a isso, o EtOH foi escolhido como co-solvente também por ser GRAS e por ser o Brasil um dos maiores produtores. Fatores como este também devem ser considerados no estudo de processo.

Em estudo proposto por Sun e Temelli (2006) para a extração de carotenóides, foi utilizado óleo de canola como co-solvente, por possuir alta solubilidade em SC-CO₂ se comparada ao β-caroteno. Além disso, óleos vegetais constituem bons solventes para carotenos. Nesta pesquisa, o rendimento de α e β-caroteno aumentou em duas vezes e o de luteína aumentou cerca de quatro vezes com a incorporação de óleo de canola como co-solvente no processo de extração.

Na pesquisa realizada por Vasapollo *et al.* (2004), foi utilizado óleo de avelã como co-solvente da extração de licopeno de tomates. As justificativas para a escolha do óleo foram baixo custo e sua baixa acidez que evita degradação do carotenóide durante a extração, além de reproduzir os mais altos rendimentos dentre os demais testados (amendoim, amêndoa e girassol). Os índices de extração de licopeno em condições otimizadas e na presença de co-solvente chegaram a 60% sob a fração total extraível. Em outro trabalho semelhante, foi verificado que a presença de óleos vegetais como co-solvente aumentaram o rendimento de extração e contribuíram para a estabilidade do licopeno (YI *et al.*, 2010).

O uso de co-solventes em condições especiais também tem sido proposto para melhorar a solubilidade de diferentes solutos e/ou para aumentar a seletividade de extração. Um exemplo é a aplicação de extração por solvente avançado (ESA). Esta técnica envolve o uso de CO₂, água e/ou solventes orgânicos a temperaturas e pressões elevadas, de 40 a 200°C, e de 3,3 a 20,3 MPa. Esta técnica tem sido aplicada com sucesso na extração de solutos polares, incluindo as antocianinas do bagaço de sabugueiro (SERRA *et al.*, 2010).

Assim como o emprego de co-solvente na modificação da polaridade do CO₂ supercrítico e consequente modificação da solubilidade e seletividade do soluto, não há como desenvolver estudos de extração sem acompanhar o comportamento da cinética de extrações. A cinética aponta a influência do equipamento e condições operacionais na extração e caracteriza o processo especificamente para a matriz vegetal em estudo.

2.1.2 O estudo da cinética de extração

O estudo das curvas de extração supercrítica e o conhecimento dos efeitos das variáveis operacionais permitem a definição do volume do extrator e vazão de solvente. Segundo a literatura, as curvas de extração são claramente divididas em três períodos, controlados por diferentes mecanismos de transferência de massa (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PIANTINO *et al.*, 2008):

- (a) A curva inicia-se com o período de taxa de extração constante: nesta fase a superfície externa das partículas é coberta com soluto (de fácil acesso) e a convecção é o mecanismo de transferência de massa dominante;
- (b) No segundo período ocorre a taxa de extração *Falling*, nesta etapa as falhas do soluto na camada externa da superfície da matriz aparecem e então inicia-se o mecanismo de difusão, fenômeno que atua combinado com a convecção;
- (c) Finalmente, ocorre o período de difusão controlada, onde a camada de soluto na superfície externa praticamente desapareceu e a transferência de massa ocorre principalmente por difusão do interior das partículas da matriz sólida.

O objetivo principal da modelagem das curvas de cinéticas de extração com fluido supercrítico é definir parâmetros para desenho de processos, como as dimensões do equipamento a ser projetado, fluxo do solvente e tamanho de partícula da matriz. Esses parâmetros são usados para prever a curva total de extração e dessa forma estimar a viabilidade de processo em escala industrial. Vários modelos matemáticos são apresentados na literatura para descrever a extração com fluido supercrítico. Um modelo deve ser um instrumento matemático que reflete o comportamento físico da estrutura sólida e as observações experimentais. Desta forma, poderá ser usado como uma ferramenta de simulação para as curvas de cinética de EFS e depois, para aplicações industriais desta tecnologia (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009).

Os principais parâmetros da EFS são a vazão do solvente, o tamanho da partícula do sólido e a duração do processo de extração. Outros fatores determinantes do processo são o poder de solubilização e a seletividade do solvente com relação aos componentes de interesse e a capacidade de difusão destes no fluido (BRUM, 2010).

Zizovic *et al.* (2007) discutem em sua revisão bibliográfica que o modelo matemático amplamente utilizado no estudo de processo foi introduzido por Sovová. O pressuposto básico deste modelo é que parte das células, unidades contendo hipoteticamente o soluto são abertas pela moagem. O soluto facilmente acessível a partir destas células trituradas é extraído primeiro, e a fração mais protegida pelas paredes celulares segue sendo extraída mais lentamente. As vantagens deste modelo é que ele pode ser aplicado em qualquer tipo de matriz vegetal contendo diferentes tipos de solutos, lipídios ou óleos essenciais, por exemplo. A contribuição significativa para a modelagem da extração supercrítica de óleo essencial foi dada por Reverchon, Donsi e Sesti (1993), que introduziram modelos baseados no balanço de massa diferencial no vaso extrator, fazendo analogia à transferência de calor. Operações de extração supercrítica de óleos essenciais foram modeladas e preditas em macro-escala por muitos autores, e os resultados experimentais foram ajustados e descritos em modelos posteriormente propostos. Mais recentemente, Sovová (2005) introduziu um novo modelo para a extração supercrítica de produtos naturais, o qual também se baseia no conceito de células intactas e trituradas e com dois períodos de extração, o primeiro regido pelo equilíbrio de fases e o segundo governado por difusão interna nas partículas.

Na extração de óleo de sementes peletizadas ou esmagadas, diz-se que a cinética de extração é dividida em duas principais etapas. O óleo livre é extraído inicialmente a partir da superfície das partículas de semente a uma taxa constante que é parcialmente determinada por mecanismos de transferência externa de massa. Na segunda etapa, quando o óleo livre na superfície da partícula se esgota, a taxa de extração é determinada por mecanismos de transferência de massa interna do óleo aprisionado nas células (del VALLE *et al.*, 2004).

A modelagem matemática da extração com fluido supercrítico de solutos com alto valor agregado a partir de matrizes vegetais, tais como ervas, sementes, folhas ou casca é dificultada pela existência de estruturas diferenciadas para cada material. Antes da extração, o material geralmente é moído para aumentar a superfície em contato com o solvente SC-CO₂ e também aumentar a acessibilidade do soluto aprisionado nas estruturas celulares e com isso fornecer a cinética de transferência de massa que também é influenciada pela forma das partículas. Na modelagem, normalmente empregam-se formas geométricas básicas (cilindro, placa ou esfera). Para reduzir a complexidade do modelo, também é necessário fazer suposições simplificadas sobre como o soluto é distribuído dentro da matriz sólida que pode estar – adsorvido na rede de poros, aprisionado dentro de estruturas celulares ou distribuído de forma homogênea dentro das partículas. As resistências

envolvidas nos mecanismos de transferência de massa também devem ser consideradas como a resistência de transferência interna de massa, resistência de transferência externa de massa ou uma combinação de várias resistências (OLIVEIRA; SILVESTRE; SILVA, 2011).

2.2 Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)

A Pitanga, fruto da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pertence à família botânica das Myrtaceae. É uma planta frutífera nativa do Brasil, mas encontrada também no Norte da Argentina e Uruguai. Apesar de constituir um cultivo tradicional das regiões Sul e Sudeste do Brasil, nos últimos anos a região Nordeste iniciou um cultivo mais tecnificado para exploração comercial desta fruta de alto potencial econômico. A pitangueira (Figura 1) frutifica de outubro a janeiro, sendo que a principal forma de comercialização é a polpa congelada (EMBRAPA, 2006). No que concerne à produção e comercialização da fruta, não se dispõe de dados oficiais, tanto no Brasil quanto no mundo, no entanto estima-se que o Brasil seja o maior produtor mundial. Os maiores plantios estão localizados no Estado de Pernambuco, onde a região possui cerca de 300 ha cultivados (BEZERRA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2002).

O fruto é uma baga globosa, com sete a dez sulcos longitudinais de 1,5 a 5,0 cm de diâmetro e corado com sépalas persistentes, possuindo um aroma característico intenso e sabor doce e ácido. No processo de maturação, o epicarpo passa de verde para amarelo, alaranjado, vermelho, vermelho-escuro, podendo chegar até quase negro. No Brasil não se conhecem variedades perfeitamente definidas de pitangueiras e em Pernambuco, é comum encontrar pitanga de coloração variando de alaranjada a avermelhada (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002).

O valor nutricional da Pitanga é relevante, já que ela apresenta elevado teor em carotenóides (225,9 mg.g⁻¹) com valor de pró-vitamina A de 991 ER.100 g⁻¹ e teor de vitamina C de 29,4 mg.100mg⁻¹, podendo contribuir para o requerimento diário destas vitaminas na alimentação (MÉLO; LIMA; NASCIMENTO, 1999). Além disso, a Pitanga contém grandes quantidades de cálcio, fósforo e antocianinas (SILVA, 2006). Devido ao seu sabor altamente particular e seu conteúdo de carotenóides, o cultivo da cereja brasileira, como também é chamada, tem-se demonstrado promissor aos programas de exploração sustentável na Mata Atlântica brasileira, um dos pontos de Conservação Internacional da Biodiversidade do Cerrado. Esta atenção dada à Pitanga nestes programas de exploração sustentável se deve ao fato da Mata Atlântica ser uma área caracterizada pela baixa

atividade econômica e pela Pitanga ser cultivada, em sua grande maioria, em pomares domésticos ou como atividade agrícola de pequena escala, ou ainda colhidas selvagemmente (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011).



Figura 1 - Pitangueira.

A polpa congelada da Pitanga tem elevado conteúdo de compostos fenólicos, os quais são conhecidos pela sua atividade antioxidante. Dentro do grupo dos carotenóides, no estudo realizado por Filho *et al.* (2008), foram encontrados no extrato supercrítico da polpa de Pitanga os seguintes compostos: *All-trans*-luteína, *All-trans*-zeaxantina, *All-trans*-rubixantina, *cis*-rubixantina I, *cis*-rubixantina II, *All-trans*- β -criptoxantina, *All-trans*-licopeno, *13-cis*-licopeno, *All-trans*- α -caroteno, *All-trans*- γ -caroteno, (*all-trans*+9-*cis*)- β -caroteno e (13-*cis*+15-*cis*)- β -caroteno. A respeito dos compostos fenólicos, a fração aquosa de frutos de Pitanga contém antocianinas antioxidantes (BAGETTI *et al.*, 2009).

O emprego das folhas de *Eugenia uniflora* L., cuja infusão tem sido utilizada na medicina popular como anti-hipertensiva e antireumática, é bem conhecido no Brasil. As folhas e frutos são empregados na medicina popular em várias regiões do país, por serem considerados excitantes, febrífugos, aromáticos e antidisentéricos. O extrato alcoólico é utilizado em bronquites, tosses, febres, ansiedade e verminoses (AURICCHIO *et al.*, 2007).

O extrato hidroalcoólico das folhas diminuiu os níveis da enzima xantina oxidase, supostamente envolvida no desencadeamento da gota, além de ter apresentado características de vaso-relaxante, antioxidante, antidiarréico, hipotrigliceridêmico, hipoglicêmicos e propriedade bactericida, este último também observado no óleo essencial (AMORIM *et al.*, 2009). Ogunwande *et al.* (2005) demonstram efeitos como abaixamento

dos níveis de glicose sanguínea e, diurético, antifebril, anti-inflamatório e contra doenças estomacais.

Há uma gama de fitoquímicos já identificados nas folhas da Pitanga, são eles os compostos fenólicos da família dos flavonóides como o miricitrina, quercetina e seus derivados como a quercitrina 3-l-ramnosídeos, terpenóides como monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, taninos hidrolisados como o eugeniflorina D1 e o eugeniflorina D2 (EMBRAPA, 2006). Em estudo com as cascas da árvore da Pitanga, realizado por Brandelli *et al.* (2009), observou-se que essa tem a capacidade de inativar trofozoítos de *Giardia lamblia* (um dos mais comuns parasitas intestinais), com uma concentração mínima inibitória de 0,313 mg.mL⁻¹ de extratos. Alguns taninos hidrolisados presentes no extrato da folha inibem o vírus Epstein-Barr, conhecido por estar intimamente associado ao carcinoma nasofaríngeo (LEE *et al.*, 2000).

Um trabalho pioneiro realizado por Oliveira *et al.* (2006) mostra que o fruto da pitangueira possui monoterpenos como componentes voláteis majoritários, sendo *trans*- β -ocimeno, *cis*-ocimeno, β -ocimeno e β -pineno em sua composição e o fato do suco da Pitanga ser usado na medicina popular brasileira contra diarreia, reumatismo, febre e diabetes, pode estar relacionado ao fato do fruto possuir compostos voláteis semelhantes àqueles presentes nas folhas, cuja bioatividade tem sido comprovada cientificamente.

Considerando esta particularidade do fruto, o mesmo grupo de pesquisa estudou a otimização do processo de obtenção de extratos de pitanga pelo emprego de CO₂ supercrítico (MALAMAN *et al.*, 2011). Análises sensoriais revelaram que os extratos ricos em compostos voláteis, principalmente os β -damascenone, 5,6,7,7a-tetraidro-4-4-7a-trimetil-2(4H)-benzofuranone, germacrene B, espatulenol, selina-1,3,7(11)-trien-8-one, 10-(1-metiletetil)-(E, E)-3,7-ciclododecadien-1-one, farnesil acetone e 2-etil-2-metil-tridecanol contribuíram para a percepção da maior intensidade do aroma característico da fruta, os quais também estão presentes nas folhas como revelado pela literatura (PINO *et al.*, 2003). Neste estudo, a otimização do processo revelou que as melhores condições de extração supercrítica foram aquelas que empregavam 200 bar e 50°C.

Segundo Ogunwande *et al.* (2005) e Costa *et al.* (2009) o óleo essencial da folha e do fruto de Pitanga contém sesquiterpenos oxigenados dentre estes os principais são isofurano-germacreno, germacrene B e germacrone. Componentes do óleo essencial de folhas de Pitanga foram identificados por CG/EM, o seu aroma foi classificado como semelhante a "cogumelo", "madeira" e "especiarias", devido à presença de furanodieno e notas de "ervas daninhas" e "pepino", devido à a presença de selinatrienone (selina-1, 3,7 (11)-trien-8-one), o componente em maior concentração, recentemente sintetizado. Muitos compostos voláteis das folhas de Pitanga também são evidenciados no fruto, incluindo selina-1, 3, 7 (11)-trien-8-one. (OLIVEIRA; KAMIMURA; RABI, 2009).

Com relação a sua semente, existem poucos trabalhos que relatam a sua composição. Bagetti e colaboradores (2009) avaliaram a composição nutricional e a atividade antioxidante destas sementes e os resultados revelaram os carboidratos como a classe mais abundante, compostos principalmente de fibras insolúveis. A fração protéica é muito reduzida e dentre os ácidos graxos presentes, 45 a 47% destes são polinsaturados, desejáveis à dieta humana por exercer efeito sobre a redução da incidência de doenças cardiovasculares. Em outro estudo com semente de Pitanga realizado por Luzia, Bertanha e Jorge (2010), foi obtido extrato etanólico das sementes para investigar seu potencial antioxidante. A concentração do extrato que alcançou uma atividade antioxidante de 50% foi de 30,72 ppm. A concentração de compostos fenólicos presentes nos extratos etanólicos de semente de Pitanga também elevada, de 75,64mg.g⁻¹ extrato.

Segundo Andrade *et al.* (2009), a semente de Pitanga ainda possui uma proteína, a lectina, que exibe uma notável atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* sp. com uma concentração inibitória mínima de 1,5 µg.mL⁻¹, e moderadamente inibe o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* sp. e *Escherichia coli* com uma concentração mínima inibitória de 16,5 µg.mL⁻¹.

Considerando a informação escassa da composição das sementes de Pitanga, a sua possível aplicação industrial, visto ao fato de ser resíduo do processamento do fruto, o histórico deste grupo de pesquisa na investigação da composição dos extratos supercríticos das folhas e do fruto da Pitangueira e as informações bibliográficas que revelam sua alta atividade antioxidante e antimicrobiana geraram o estímulo para o desenvolvimento deste trabalho.

2.3 Compostos Terpênicos

Os óleos voláteis de plantas são conhecidos e utilizados desde a antiguidade por suas propriedades biológicas, especialmente antibacteriana, antifúngica e antioxidante (SOUZA *et al.*, 2007). Óleos essenciais, também denominados óleos voláteis, geralmente extraídos por destilação das plantas, são líquidos hidrofóbicos contendo compostos aromáticos voláteis. Os óleos essenciais são amplamente utilizados em perfumes, cosméticos, bem como em alimentos e bebidas como aditivos de *flavor*. Alguns óleos essenciais mostram várias atividades farmacológicas e são considerados as frações ativas mais importantes de medicamentos fitoterápicos (DANG *et al.*, 2010).

Óleos essenciais, com ou sem resinas e gomas são encontrados em estruturas secretoras especializadas situadas dentro dos tecidos vegetais ou na superfície da planta (tricomos). O tipo de estrutura secretora é específico para a família ou espécie vegetal. O

processo de isolamento do óleo essencial quer por extração ou destilação, deve ser dependente da forma como o óleo está armazenado na estrutura vegetal e do tipo de estrutura secretora. Estruturas secretoras no tecido da planta podem ser células secretoras, cavidades secretoras ou canais secretores. Uma cavidade secretora normal em vegetais são os dutos, os quais se alongam na forma de uma rede se estendendo desde as raízes através do caule até as folhas, flores e frutos (ZIZOVIC *et al.*, 2007).

De acordo com a sua disposição na matriz vegetal, os óleos essenciais são classificados como óleos superficiais ou subcutâneos. O primeiro é secretado pelas glândulas superficiais, e o subcutâneo é secretado bem abaixo da superfície externa do material vegetal, como pela casca de árvores, entre as fissuras da madeira, nas flores secas e brotos, nas sementes, raízes e frutos (ARAUS; URIQUE; del VALLE, 2009). Os óleos essenciais têm uma composição complexa, contendo de algumas dezenas a centenas de constituintes, especialmente hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, óxidos, lactonas, éteres e ésteres). Ambos os hidrocarbonetos e compostos oxigenados são responsáveis pelos odores e sabores característicos. O aroma de um óleo é o resultado da combinação dos aromas de todos os seus componentes (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Terpenos podem ser originados tanto do metabolismo de carboidratos quanto de lipídios e são classificados pelo número de unidades de isopreno que contêm. Monoterpenos contêm duas unidades de isopreno (10 carbonos), sesquiterpenos contêm três unidades de isopreno (15 carbonos) e diterpenos contêm quatro unidades de isopreno (20 carbonos). Desses grupos, os monoterpenos, e mais especificamente, os monoterpenos oxigenados, são considerados os mais importantes na constituição do aroma de certas frutas, como por exemplo, as cítricas. Limoneno, um hidrocarboneto monoterpênico que possui um odor suave, é o principal terpeno na maioria dos óleos cítricos representando até 95%. Os terpenos oxigenados, muitas vezes, compreendendo menos de 5% do óleo, geralmente fornecem o sabor característico de espécies cítricas diferentes. Por exemplo, citral é considerado o componente de impacto no sabor que caracteriza o óleo de limão, mas é raro encontrar mais de 2% de citral neste óleo essencial (REINECCIUS, 2006).

A via biossintética proposta para a síntese de isopentenil difosfato (IPP) combina três moléculas de acetil-co-enzima-A (acetil-CoA) para formar moléculas de 3-hidroxi-3-metilglutaril-Co-A (HMG-CoA) que por sua vez, são reduzidos a ácido mevalônico e depois fosforilados e descarboxilados para formar o IPP, o elemento chave na síntese natural dos terpenos. Sabe-se que o IPP também pode ser formado através de uma via que não inclui o ácido mevalônico, mas ainda faltam evidências para amparar a existência desta alternativa. A próxima etapa desta síntese envolve a combinação de unidades de IPP para formar geranyl difosfato, farnesil difosfato e geranyl-geranyl difosfato, que servem como precursores

das famílias mono-, sesqui- e diterpenos, respectivamente (Figura 2). Os demais membros dessas famílias surgem a partir da ciclização secundária ou modificação destes três precursores (REINECCIUS, 2006).

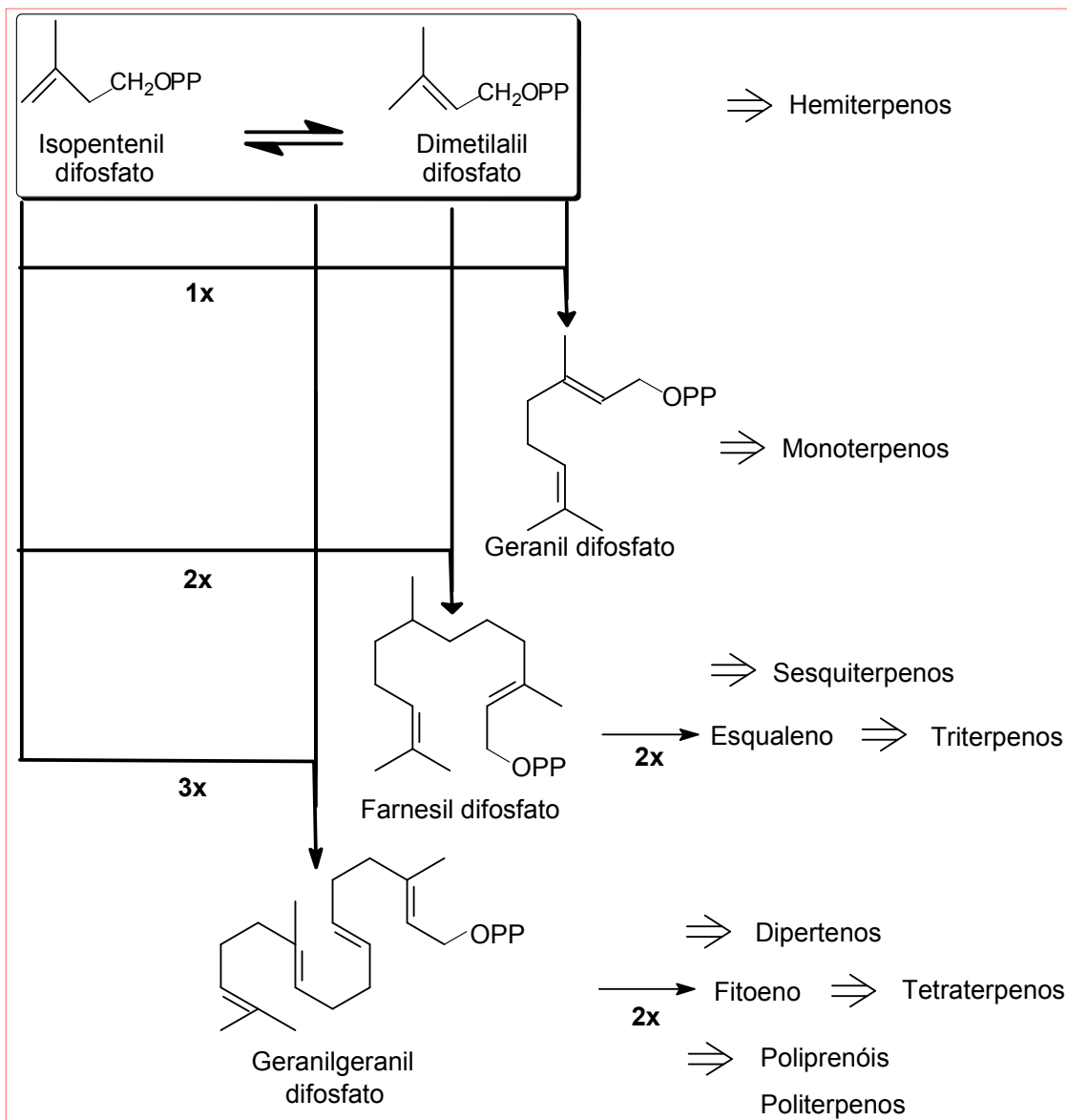


Figura 2 - Biossíntese de compostos terpênicos a partir de isopentenil difosfato em tecidos vegetais.

Adaptado de REINECCIUS, 2006.

Sesquiterpenos são uma das classes estruturalmente mais diversificadas de produtos naturais isolados de plantas, fungos, bactérias e invertebrados marinhos. Nas plantas eles podem atuar contra parasitas, como predadores, ou para atrair polinizadores. Todas as dezenas de milhares de sesquiterpenos conhecidos presentemente são derivados a partir

de trezentas estruturas de hidrocarbonetos básicos gerados por sesquiterpenos adenilato sintases usando farnesil difosfato como substrato (GARMS; KÖLLNER; BOLAND, 2010).

Dentre os métodos de obtenção de óleos essenciais a partir de fontes vegetais, a destilação a vapor tem sido a mais tradicionalmente aplicada. Uma das desvantagens dos métodos de arraste a vapor ou hidrodestilação é que os óleos essenciais sofrem alteração química já que os compostos sensíveis ao calor podem ser facilmente destruídos. Portanto, a qualidade do óleo essencial é extremamente prejudicada. Nesse ínterim, os mesmos autores relatam que a extração dos componentes de óleos essenciais com a utilização de solventes a alta pressão, ou fluidos supercríticos, tem recebido muita atenção nos últimos anos, especialmente na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, porque apresenta uma alternativa aos processos convencionais, que normalmente empregam alta temperatura (BOCEVSKA; SOVOVÁ, 2007; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Além da degradação térmica, a hidrodestilação de compostos voláteis torna-se ineficiente também por alguns desses componentes se dissolverem parcialmente na água e sua distribuição entre as fases óleo essencial e água no separador do aparelho de destilação ficar desfavorecida. Assim, a extração com SC-CO₂ mostra-se ser a técnica de escolha para o isolamento de ésteres monoterpênicos, alguns de seus álcoois, e sesquiterpenos de plantas (BOCEVSKA; SOVOVÁ, 2007).

A extração com CO₂ supercrítico também é uma ferramenta poderosa na pesquisa de fragrâncias e de óleos essenciais, especialmente porque o isolamento de componentes voláteis usando métodos tradicionais, como a destilação a vapor ou de amostragem de *headspace* dinâmico produz extratos com fragrância que podem não refletir as propriedades de aroma do material natural. Com as condições de extração que empregam temperaturas brandas, a extração com fluido supercrítico é a mais adequada para isolar óleos essenciais de especiarias, flores, ervas, folhas, sementes e raízes. Os extratos obtidos são geralmente considerados como sensorialmente superiores aos concentrados produzidos pelas técnicas tradicionais. Uma desvantagem da extração com CO₂ supercrítico, no entanto, é a presença de outros compostos no extrato que não contribuem para a impressão de fragrância, tais como hidrocarbonetos de cadeia longa ou álcoois parafínicos (MARSILI, 2002).

A co-extração de substâncias de baixa volatilidade como ceras cuticulares juntamente com o óleo essencial volátil é típico para extração com SC-CO₂ de óleos essenciais a partir de material herbáceo. Uma possibilidade de obter um óleo essencial relativamente puro é a utilização de separação em dois estágios. No primeiro estágio as substâncias de baixa volatilidade e indesejadas são precipitadas e separadas do CO₂ supercrítico à baixa temperatura e o óleo essencial, sendo mais solúvel ao solvente, se separa deste após uma alteração na pressão e temperatura no segundo separador (BOCEVSKA; SOVOVÁ, 2007).

A extração com fluido supercrítico do óleo essencial melhora a qualidade do óleo evitando o estresse térmico dos componentes terpênicos. No entanto, as condições de extração, principalmente pressão e temperatura, responsáveis pelo poder de solvente do fluido supercrítico devem ser otimizadas, uma vez que estas variáveis são diretamente responsáveis pela composição do extrato e, portanto, por suas propriedades funcionais. No entanto, outros fatores como a geometria do leito fixo, o número de estágios de extração e separação, e o fluxo de solvente podem influenciar no desempenho do processo (LANGA *et al.*, 2009). Goodarznia e Eikani (1998) afirmam que a pressão e a temperatura ótima de extração para a obtenção de alto rendimento de óleos essenciais, resultando em solubilidade insignificante dos outros componentes estão nas faixas de 80 a 100 bar e de 40 a 50 °C.

Esta faixa de pressão e temperatura foi estudada neste trabalho. Assim como o estudo da extração supercrítica, o estudo da aplicação dos extratos complementa os resultados de forma a justificar a viabilidade da tecnologia empregada. Deste modo, análises da bioatividade dos extratos supercríticos das sementes de Pitanga foram contempladas neste trabalho.

2.4 Ensaios para Detecção de Bioatividade de Extratos de Matrizes Vegetais

2.4.1 Atividade antioxidante

Em humanos, o desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes pode provocar uma série de desordens celulares, tais como peroxidação lipídica, danos protéico-enzimáticos e inclusive, alterações no DNA, as quais podem estar associadas a inúmeros processos deletérios, como o câncer, aterosclerose, diabetes *mellitus*, artrite reumatóide, distrofia muscular, catarata, desordens neurológicas e do trato respiratório além de envelhecimento precoce (BIANCO; SANTOS, 2010).

Recentemente, tem havido um interesse crescente em espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos e seus papéis como agentes causais implícitos na etiologia de uma variedade de doenças crônicas. Assim, a atenção está sendo focada nas funções bioquímicas de proteção dos antioxidantes naturais nas células dos organismos que os contenham (MENSOR *et al.*, 2001).

Para medir a capacidade antioxidante de alimentos e amostras biológicas, diferentes ensaios foram introduzidos. O conceito de capacidade antioxidante foi primeiro originado para a química e mais tarde adaptado para a biologia, medicina, epidemiologia e nutrição.

Ele descreve basicamente a habilidade de moléculas eletronicamente instáveis em neutralizar os radicais livres de sistemas biológicos através de reações de oxido-redução (redox). Este conceito fornece um quadro mais amplo dos antioxidantes presentes em uma amostra biológica, uma vez que considera os efeitos aditivo e sinérgico de todos os antioxidantes e não somente o efeito de um dos compostos isolados, e podem, portanto, causar benefícios à saúde como antioxidantes potenciais contra doenças mediadas pelo estresse oxidativo (FLOEGEL *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, vários ensaios espectrofotométricos foram adotados para medir a capacidade antioxidante de alimentos, sendo os mais populares os ensaios que utilizam os radicais 2,2 azobis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) (ABTS) e o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Além daquele que mede a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e a capacidade de redução de íons ferro em plasma (FRAP). A maioria destes ensaios emprega o mesmo princípio, um composto radicalar sintético de cor ou oxi-redutor é gerado e a capacidade de uma amostra biológica para eliminar os radicais ou para reduzir o composto redox-ativo é monitorado por espectrofotômetro, juntamente com a aplicação de um padrão adequado para quantificar esta capacidade antioxidante, por exemplo, por equivalente de Trolox (TEAC) ou equivalente de vitamina C (VCEAC). Além disso, existem dois tipos básicos de mecanismos. Um deles baseia-se na transferência de elétrons e envolve a redução de um oxidante de cor, como o ABTS, DPPH e ensaio FRAP. O outro aborda uma transferência de átomo de hidrogênio, como no teste ORAC, em que os antioxidantes e o substrato competem termicamente pelos radicais peroxila gerados (FLOEGEL *et al.*, 2011).

Em se tratando do estudo de extratos vegetais, os quais são compostos por uma infinidade de substâncias, além de conhecer a capacidade antioxidante total, mais recentemente tem-se agregado outras metodologias com o intuito de identificar os compostos que mais contribuem para tal efeito. A cromatografia em camada delgada (CCD) combinada com ensaio de inibição do radical DPPH é um método que tem a capacidade de garantir a reação de oxi-redução suficiente a partir do isolamento de grupos de componentes com atividade antioxidante em uma mistura. Os compostos ativos, separados em bandas, são vistos como manchas claras contra um fundo roxo na cromatoplaça. Testes preliminares usando CCD possibilitam direcionar a separação de compostos antioxidantes em cromatografia de alta resolução como a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ZHAO, J. *et al.*, 2010).

O radical DPPH (DPPH•) também tem sido utilizado em CLAE com a finalidade de indicar a atividade antioxidante de cada componente, a qual é medida pela inibição destes radicais livres. Embora a combinação da CLAE com as reações de oxi-redução usando DPPH• seja eficiente, o sistema *on-line* pode apresentar uma cinética de reação lenta que

permite uma caracterização imprecisa da atividade antioxidante destes compostos. Além disso, esta técnica desconsidera o efeito sinérgico que uma substância pode exercer sob a outra e assim, um composto que na prática teria uma alta atividade antioxidante, por esta técnica (CLAE + DPPH•) é visualizado um baixo efeito, pois este composto é analisado individualmente (ZHAO, J. *et al.*, 2010).

A interação de um potencial antioxidante com DPPH• depende de sua conformação estrutural. O número de moléculas de DPPH• que são reduzidas parece estar correlacionado com o número de grupos hidroxila disponível. É sugerido que o DPPH• livre abstrai o hidrogênio de moléculas de compostos fenólicos que são doadores de elétrons. Este poderia ser o mecanismo geral das reações com flavonóis antiperoxidativos, por exemplo. Com base no mecanismo de redução da molécula de DPPH• extensivamente descritos na literatura, que está correlacionada com a presença de grupos hidroxila na molécula antioxidante, pode-se inferir que a grande atividade de extratos polares é, provavelmente, devido à presença de substâncias com um grupo hidroxila disponível, fenólico ou não. Esta exigência estrutural poderia estar ligada à presença de flavonóides ou taninos condensados, por exemplo (MENSOR *et al.*, 2001).

O radical 2,2 azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}) é um conhecido composto utilizado para a análise colorimétrica de oxidantes químicos diversos. A molécula de ABTS incolor é convertida para a cor azul-esverdeada na sua forma radicalar, pela oxidação de um elétron. O ABTS^{•+} mostra fortes bandas de absorção de UV-vis em 415, 648, 728 e 812 nm, e é conhecido por ser uma espécie radicalar mais duradoura, pois diferente do radical DPPH que, quando formado só pode ser usado para análises no mesmo dia, o radical ABTS quando em solução pode ser estocado por até um mês sob refrigeração. Tem sido relatado que ABTS pode ser rapidamente formado por reações com vários radicais inorgânicos, como •OH, Br₂^{•-} e RS•, e diversos radicais orgânicos, tais como radicais alcóxil ou alcóxilperóxil. Além disso, oxidantes não radicalares, como o ácido percarboxílico, ferrato, espécies de bromo e cloro, são conhecidos por reagir com ABTS para produzir estequiometricamente ABTS^{•+}. Portanto, ABTS^{•+} tem sido utilizado como uma sonda cinética para o estudo de reações de neutralização de radicais livres, bem como um reagente para a análise quantitativa de oxidantes químicos (LEE; YOON, 2008). Este método tem sido aplicado para o estudo de frações antioxidantes solúveis em água e antioxidantes lipossolúveis, compostos puros e extratos (RE *et al.*, 1999).

2.4.2 Atividade antimicrobiana

A sobrevivência e proliferação dos micro-organismos nos alimentos é um problema importante, que pode levar à deterioração e assim prejudicar a qualidade de produtos alimentícios ou causar infecção e doença. Estima-se que as doenças diarréicas de origem alimentar já causam cerca de 4 a 6 milhões de mortes por ano, sendo crianças a maioria. Apesar dos conservantes químicos serem utilizados há anos, existem controvérsias já que alguns podem causar problemas de saúde respiratória, por exemplo. Portanto, é necessário encontrar uma nova maneira de reduzir ou eliminar micro-organismos nos alimentos e prolongar a vida de prateleira. Somado a isto, a crescente demanda dos consumidores por produtos naturais tem levado à investigação de novos agentes antimicrobianos a partir de matrizes vegetais (LV *et al.*, 2011).

O estudo para a descoberta de novas substâncias com capacidade antimicrobiana tem sido estimulado pela demanda dos consumidores que relacionam extratos obtidos de fontes vegetais com saúde e alimentos mais saudáveis. Produtos naturais têm sido uma fonte particularmente rica de agentes anti-infecciosos, produzindo, por exemplo, a penicilina, em 1940, as tetraciclina em 1948 e os glicopeptídeos em 1955 (CUSHNIE; LAMB, 2005). Dentre os extratos de matrizes vegetais já reconhecidamente antimicrobianos, destaca-se os óleos essenciais de cravo, orégano, alecrim, tomilho, sálvia e vanilina. Eles têm geralmente ação inibitória mais expressiva contra bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas (HOLLEY; PATEL, 2005).

Vários fatores relacionados aos próprios micro-organismos condicionam a resistência aos agente antimicrobianos, como a complexidade da parede celular. De acordo com Lv *et al.* (2011), é geralmente reconhecido que as células da fase logarítmica do crescimento microbiano são mais sensíveis aos fatores de estresse externos, enquanto as células da fase estacionária são mais resistentes. Este fenômeno pode ser explicado pelas mudanças estruturais ou conformacionais na parede celular dos micro-organismos por ser uma estrutura dinâmica que pode se adaptar a mudanças fisiológicas. Por exemplo, tem sido demonstrado que no peptidoglicano de células de *Escherichia coli* ocorrem alterações evidentes durante a transição da fase logarítmica (início do ciclo microbiano de grande multiplicação dos micro-organismos) para fase estacionária (final do ciclo microbiano, no qual o número de bactérias originadas é praticamente igual ao número de bactérias que morrem), incluindo o espessamento da camada de peptidoglicano e o aumento da grau de ligações cruzadas deste glico-polissacarídeo. Isso mostra que o aumento das ligações químicas no peptidoglicano tornam as células cultivadas há mais tempo mais difíceis de serem danificadas.

A Organização Mundial de Saúde não tem medido esforços para padronizar os testes de susceptibilidade antimicrobiana a nível internacional. Estudos colaborativos publicados na década de 70 tiveram o objetivo de padronizar a diluição em caldos e testes de

susceptibilidade antimicrobiana em meios de cultura com diluição em ágar. Depois, testes de difusão em disco foram cuidadosamente padronizados para uso nos países escandinavos e nos Estados Unidos. Com a divulgação destes dois procedimentos, muitos detalhes processuais passaram a ser cuidadosamente controlados e bem definidos. Uma variedade de outros métodos foram criados, mas houve pouco esforço para o controle de variáveis importantes, como a densidade de inóculo, ágar, condições de incubação, dentre outros. Os testes padronizados de disco envolvem medir o diâmetro de cada zona de inibição e comparar com a concentração inibitória mínima (CIM) obtida por testes de suscetibilidade de diluição em ágar ou caldo (SCHWALBE; STEELE-MOORE; GOODWIN, 2007).

Basicamente, maior poder antimicrobiano terá a substância que conseguir um grande halo de inibição (distância sem crescimento microbiano) com uma baixa concentração, o que significa que esta substância a uma concentração baixa consegue reproduzir uma resposta inibitória eficiente. Em teste de inibição de micro-organismos através da medição do halo de inibição, existe uma classificação com três níveis que leva em conta a distância entre a substância teste presente no disco de papel e a cultura bacteriana, sendo ela: baixa atividade (zona de inibição $\leq 12\text{mm}$), atividade moderada ($12\text{mm} < \text{zona de inibição} < 20\text{mm}$) e forte atividade (zonas de inibição $\geq 20\text{mm}$) (LV *et al.*, 2011).

São várias as classes de compostos químicos que apresentam atividade antimicrobiana. Dentre a classe dos flavonóides, um grupo de substâncias proveniente do metabolismo secundário de plantas que exibem inúmeras propriedades, vários compostos mostraram possuir algum nível de atividade antimicrobiana. São a apigenina, galangina, pinocembrina, ponciretina, genkwanina, soforaflavanona G e seus derivados, naringina e naringenina, galato de epigalocatequina e seus derivados, luteolina e luteolina 7-glicosídeo, quercetina, 3-O-metilquercetina e vários glicosídeos de quercetina e kaempferol e seus derivados. Outras flavonas, glicosídeos de flavona, isoflavonas, flavanonas, isoflavanonas, isoflavanas, flavonóis, glicosídeos de flavonóis e chalconas também exibem tal atividade (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes em óleos essenciais, é mais provável que a atividade antimicrobiana deles não seja atribuída a um mecanismo específico e que existem vários pontos de susceptibilidade nas células, que podem ser alvo de tais compostos. Alguns possíveis mecanismos antimicrobianos dos óleos essenciais e seus componentes têm sido propostos, incluindo a degradação da parede celular, danos à membrana citoplasmática, danos às proteínas da membrana, vazamento do conteúdo celular, coagulação do citoplasma e depleção do transporte de prótons ativos. Portanto, para entender o modo preciso de ação e atividade

antimicrobiana de um óleo essencial particular, o conhecimento da composição química é fundamental (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010).

Na revisão publicada por Cushnie e Lamb (2005), foi abordado o mecanismo de ação de flavonóides que podem compreender três vias principais de inativação dos micro-organismos: uma das vias é a inibição da síntese de ácidos nucléicos, através de ligação de hidrogênio formadas entre o flavonóide com a cadeia de DNA ou intercalação dos anéis do flavonóide com as bases dos ácidos nucléicos e essa rota leva a inibição da síntese de DNA e RNA. Outro mecanismo é a inibição do funcionamento da membrana citoplasmática por meio da modificação das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas da membrana. Algumas catequinas interagem com a bicamada lipídica pela penetração direta e posterior interrupção da função de barreira, através da perda da permeabilidade seletiva. O terceiro mecanismo é a inibição do metabolismo de energia, através do bloqueio do consumo de oxigênio celular e da absorção de metabólitos para a biossíntese de macromoléculas.

Em alimentos, com o objetivo de utilizar óleos essenciais sem comprometer o seu sabor, tem sido sugerido a combinação entre os extratos de plantas. Embora os óleos essenciais tenham maior atividade do que misturas de seus componentes principais, a combinação destes componentes principais com outros constituintes com fraca atividade pode resultar em um efeito aditivo, sinérgico ou antagonista. O óleo essencial de orégano combinado com o de tomilho em doses baixas mostrou ser um potencial controlador do crescimento de patógenos e micro-organismos deterioradores, enquanto que as combinações de óleo essencial de orégano com óleo essencial de manjerona ou o óleo essencial de tomilho com o de sálvia podem ser úteis para o controle das principais bactérias deterioradoras de alimentos, Gram-negativas ou Gram-positivas. Considerando que os óleos essenciais são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), a possibilidade de reforçar os seus efeitos antimicrobianos naturais pela adição de pequenas quantidades de outros conservantes naturais pode ser uma maneira de alcançar um equilíbrio entre a aceitabilidade sensorial e eficiência antimicrobiana (GOÑI *et al.*, 2009).

2.4.3 Inibição da enzima arginase

Arginase é uma metaloenzima trimérica contendo um sitio binuclear de manganês no sítio ativo de cada subunidade. No fígado de mamíferos, é uma enzima citosólica envolvida no ciclo da uréia, que converte a arginina em ornitina e uréia. Em tecido não hepáticos, a arginase está envolvida na regulação da concentração celular de L-arginina para a produção de óxido nítrico e ornitina e consequente biossíntese de prolina e poliaminas. Nos seres humanos, um desequilíbrio na atividade de arginase no tecido extra-hepático está

relacionado a uma série de distúrbios fisiológicos, tais como hipertensão e impotência sexual (SILVA; FLOETER-WINTER, 2010), além de estar relacionado, segundo Silva *et al.* (2002), na regulação da síntese de óxido nítrico (NO) o qual modula a disponibilidade de L-arginina e conseqüentemente está ligada aos processos citotóxicos em mecanismos imunológicos de proteção contra doenças infecciosas.

No parasita protozoário *Leishmania*, a arginase desempenha um papel central na infecção de macrófagos. Para os seres humanos, a inibição da arginase da *Leishmania* pode ser considerada um alvo potencial no desenvolvimento de drogas contra a leishmaniose, mas a necessária presença de um ou dois Mn_{2+} em cada monômero deve ser levada em conta. Esta exigência pode ser crucial para a interpretação dos resultados de inibição, porque a incapacidade de impedir a ação da arginase pode ser associado a uma variação em seu estado de ativação (SILVA; FLOETER-WINTER, 2010).

Assim, de acordo com Silva *et al.* (2008) a inibição da arginase endógena de macrófagos infectados tem um efeito terapêutico devido a um aumento da produção de NO, e a enzima codificada pelo parasita subverte a atividade microbicida dos macrófagos infectados em murinos. Tomadas em conjunto, estas evidências sugerem que o arginases de mamíferos e da *Leishmania* podem ser usadas como alvos terapêuticos relevantes no tratamento da leishmaniose.

O fato de a inibição da enzima arginase afetar o desenvolvimento e conseqüentemente o potencial patológico é importante, pois de acordo com Marques *et al.* (2011), a leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas, devido às poucas ferramentas disponíveis para o seu controle e também à falta de critérios claros para a gestão da doença. Leishmaniose representa um grupo de doenças parasitárias que se espalhou pelo mundo, ocorrendo em 88 países tropicais e subtropicais. Aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em áreas de transmissão ativa de *Leishmania*, no qual 12 milhões de pessoas podem estar infectadas, e todos os anos estima-se que surjam cerca de um a dois milhões de novos casos nas regiões da África, Ásia, Europa e Américas, diretamente afetadas pela leishmaniose. Mais de 90% dos casos cutâneos aparecem nos países em desenvolvimento.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi obter extratos de semente de Pitanga utilizando CO₂ em estado supercrítico com e sem emprego de etanol como co-solvente e caracterizá-los sob diferentes aspectos.

Especificamente, os objetivos constituíram-se de:

- Análises de caracterização da matéria-prima (semente triturada), quanto às condições de umidade, granulometria e densidade aparente;
- Extração supercrítica das sementes de Pitanga em diferentes condições de extração, otimizando o rendimento do processo, segundo condições operacionais delineadas com base em planejamento experimental;
- Determinação experimental da cinética de extração, visando avaliar o comportamento da obtenção dos extratos;
- Análise dos extratos supercríticos de semente de Pitanga com relação à presença de compostos voláteis e compostos fenólicos totais (CFT);
- Determinação da bioatividade dos extratos (atividade antioxidante pelos métodos de inibição do radical DPPH e ABTS, atividade antimicrobiana dos extratos através da determinação da Concentração Mínima Inibitória, para diferentes micro-organismos e atividade de inibição da enzima arginase verificando o efeito do extrato contra leishmaniose).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e Preparação da Semente de Pitanga

Frutas maduras de Pitanga nativa foram coletadas no campus da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, Brasil. No Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/FZEA/USP), as sementes foram selecionadas, lavadas para retirada de vestígios da polpa, e secas em estufa com circulação de ar a 38°C por 54 horas (Figura 3A). Baixa temperatura foi aplicada com o intuito de evitar ao máximo a degradação de compostos termossensíveis, o que justifica o longo período de secagem.

As sementes secas foram descascadas e trituradas (Figura 3B) em moinho tipo martelo (Buhlermiag, GE), para que se permitisse uma granulometria constante em todas as extrações, sendo então acondicionadas em embalagens plásticas impermeáveis ao vapor d'água para armazenamento refrigerado a -18°C.



Figura 3 - Semente de Pitanga seca inteira (A) e triturada (B).

4.2 Caracterização da Amostra

4.2.1 Umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico que considera a perda de massa da amostra através da dessecação até peso constante (AOAC, 1995). A eq.(1) relaciona a massa úmida e a massa seca e fornece a percentagem de umidade na amostra.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{P-p}{p} \times 100 \quad [1]$$

Onde: P: massa em gramas da amostra úmida e p: massa em gramas da amostra seca.

4.2.2 Extrato etéreo

O extrato etéreo foi obtido através do método de extração de lipídios a quente, utilizando Soxhlet, com éter de petróleo padrão analítico (*Synth*, BR) como solvente orgânico. Estes extratos, além de caracterizar a amostra, foram utilizados na análise comparativa da composição com os extratos supercríticos, representando um extrato obtido por um método convencional de extração. Durante a extração Soxhlet, o solvente foi continuamente aquecido e recuperado durante 6h, sendo removido depois do processo por evaporação (IAL, 2008). A Figura 4 ilustra o aparato para a extração tipo Soxhlet.

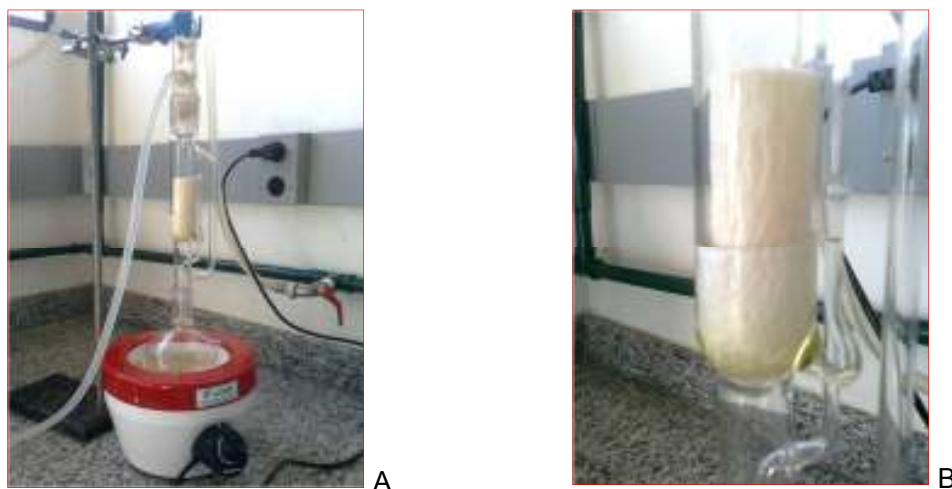


Figura 4 - Extração da semente de Pitanga utilizando Soxhlet (A). Detalhe do arraste de lipídios pelo solvente líquido (B).

4.2.3 Granulometria

A granulometria das sementes trituradas (200g) foi determinada em um jogo de seis peneiras da série padrão Tyler, com agitação durante 15 min. O diâmetro médio foi calculado pela relação descrita na eq.(2) (ASAE, 2008 - S319.4).

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log d_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right] \quad [2]$$

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

4.2.4 Densidade aparente

Para a determinação da densidade aparente, utilizou-se o leito fixo de 300 cm³ (extrator) como recipiente de volume padrão. Por 10 vezes seguidas, completou-se o seu volume com a semente de Pitanga triturada e depois de retirada do extrator, a massa foi mensurada em um béquer previamente tarado. A densidade aparente foi obtida pela relação entre a média das massas e o volume do leito fixo.

4.3 Obtenção dos Extratos com CO₂ Supercrítico

4.3.1 Processo de extração

O procedimento de extração consistiu em promover o contato entre as sementes trituradas, que estavam acondicionadas no extrator de leito fixo de 300 cm³, com o CO₂ supercrítico em condições pré-estabelecidas de pressão (P) e temperatura (T) em um delineamento experimental. O controle da pressão foi realizado por uma bomba de alta pressão, enquanto que a temperatura de operação foi mantida através de um banho termostaticado, no qual o extrator foi acondicionado. O extrato, separado do gás, foi continuamente coletado em um frasco coletor imerso em banho de gelo e o CO₂ quantificado em um rotâmetro, medidor de vazão de gás às condições ambientes. Ao final do processo, os extratos foram pesados e relacionados com a massa de sementes secas acondicionadas no extrator para o cálculo do rendimento global. A Figura 5 mostra o equipamento utilizado no presente experimento e o produto final do processo, o extrato supercrítico.



1: cilindro de CO₂; 2: manômetro do cilindro; 3: banho termostatzado; 4: tanque de refrigeração do CO₂; 5: bomba HPLC; 6: painel de comando do banho termostatzado; 7: banho termostatzado do extrator; 8: tanque pulmão; 9: manômetros tipo Bourbon do tanque pulmão (esquerda) e do extrator (direita); 10: extrator; 11: válvulas de estanque e válvulas micrométricas; 12: medidor de vazão em condições ambiente.

Figura 5 - Sistema de extração com CO₂ supercrítico do LTAPPN, FZEA/USP (A). Extrato supercrítico de semente de Pitanga (B).

4.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional

As condições operacionais do procedimento experimental foram definidas de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com P e T como variáveis independentes. Foram considerados cinco níveis com quatro pontos estrela e triplicatas no ponto central (Tabela 3) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 3 - Níveis dos dois fatores, pressão e temperatura, no DCCR.

Fatores	Níveis				
	-α	-1	0	+1	+α
Pressão P (Kgf.cm ⁻²)	83	110	175	240	267
Temperatura T (°C)	31	35	45	55	59

α = ±1,41

Esse delineamento experimental gerou uma matriz com 11 ensaios (Tabela 4), os quais foram realizados aleatoriamente. Para todos os testes, foi padronizado um tempo de equilíbrio estático de 16h (período em que a matriz fica em contato com o CO₂ nas condições supercríticas definidas no DCCR, sem ocorrer o arraste do extrato) e o tempo de extração dinâmica, também padronizado para todos os ensaios, foi de 6h.

Tabela 4 - Matriz do DCCR de dois fatores incluindo três pontos centrais para o estudo do efeito da pressão e temperatura nos extratos da semente de Pitanga.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis	
	P	T	(P) (Kgf.cm ⁻²)	T (°C)
1	-1	-1	110	35
2	+1	-1	240	35
3	-1	+1	110	55
4	+1	+1	240	55
5	-1.41	0	83	45
6	+1.41	0	267	45
7	0	-1.41	175	31
8	0	+1.41	175	59
9 ^e	0	0	175	45
10 ^e	0	0	175	45
11 ^e	0	0	175	45

e = pontos centrais

4.3.3 Extração supercrítica com co-solvente (SC-EtOH)

Com o objetivo de comparar com os extratos obtidos pelo uso somente do CO₂ supercrítico, fez-se uma extração supercrítica utilizando Etanol (EtOH) padrão analítico (*Synth*, BR) como co-solvente (SC-EtOH). Adicionou-se 30 mL de etanol em 72 g de sementes trituradas, o suficiente para umedecê-las e acondicionou-se a matriz embebida em EtOH no extrator e procedeu-se a extração nas condições de 175 Kgf.cm⁻² e 45°C, as condições do ponto central do DCCR também com 16h de tempo de equilíbrio estático e 6h de extração.

4.3.4 Purificação do extrato supercrítico obtido com co-solvente

Extratos obtidos com EtOH e outros solventes polares normalmente extraem taninos com alto grau de polimerização de matrizes vegetais. Sendo as sementes ricas em taninos e visando estudar a composição da fração dos extratos supercríticos obtidos por SC-EtOH isentos destes taninos com alto grau de polimerização, diluiu-se 100 mg do extrato bruto, obtido pelo emprego do co-solvente (SC-EtOH), em 2,5 mL de metanol (MeOH) de grau cromatográfico (J.T.Baker, USA) e adicionou-se 32,5 mL de clorofórmio padrão analítico (*Synth*, BR). Esta solução foi estocada a 4°C durante 3h na ausência de luz e logo em

seguida, centrifugada (FANEN 215, BR) a 4.000 rpm e 5°C durante 10 min. O sobrenadante separado do decantado foi rotaevaporado à uma pressão de 600 mmHg (YAMATO RE-41, JP), à temperatura ambiente e ausência de luz (LHUIILLIER *et al.*, 2007).

4.4.5 Cinética de extração

Baseando-se nas condições operacionais que favoreceram os mais altos rendimentos, selecionou-se o ponto central do DCCR (175 Kg.cm⁻² e 45°C), estudou-se a cinética durante 18h de extração dinâmica, com trocas de frascos de coleta a cada 20 min. Foram mensuradas as vazões volumétricas e a massa do extrato obtido para cada intervalo. Os valores experimentais da taxa de transferência de massa para cada 20 min geraram a curva cinética (Origin v. 8.0, USA), que também foi expressa em função da vazão volumétrica de CO₂.

4.4 Caracterização dos Extratos

4.4.1 Índice de refração

O índice de refração dos extratos supercríticos de semente de Pitanga foi mensurado em refratômetro (LAMBDA 2WAJ, ATTO Instruments Co, HK), em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3 nm e à temperatura de 20°C e 40°C. A calibração do aparelho foi feita com água destilada, cujo índice de refração é de 1,3330 a 20°C (IAL, 2008). Para manter a temperatura constante durante as mensurações, circulou-se água proveniente de um banho termostaticado na temperatura de leitura.

4.4.2 Caracterização dos extratos em cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise foi feita em todos os extratos obtidos a uma concentração de 5.000 ppm, em MeOH de grau cromatográfico (J.T.Baker, USA).

Para a visualização da presença de terpenos nos extratos foi utilizado como revelador uma solução ácida de Anisaldeído (Sigma Aldrich, GE) preparada conforme descrito por Wagner e Bladt (2009). Como fase estacionária utilizou-se placas de Sílica Gel 60 F₂₅₄ e como fase móvel, uma solução de tolueno (Merck,GE), acetato de etila grau cromatográfico (Mallinckrodt Chemicals, USA) (93:7, v:v). Após a eluição da amostra, o Anisaldeído foi aspergido sobre a placa, seco com o auxílio de um secador de cabelos (Airstyle 130, BR) e

aquecido com uma pistola térmica (Steinel, HL 1605S, USA) até que se visualizassem as bandas eluídas com coloração variada.

Para cada banda visualizada na cromatoplaca, relacionou-se as distâncias percorridas pelas bandas e a distância percorrida pelo solvente (eq.3) para se obter o fator de retenção (R_f) relativo a cada banda. O R_f é uma constante física de uma determinada substância, desde que se observem as condições de corrida (características da cromatoplaca, a qualidade e quantidade da fase móvel, a temperatura, o volume e a concentração das substâncias aplicadas) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

$$R_f = \frac{\text{distância (cm, mm) percorrida pela substância}}{\text{distância (cm, mm) percorrida pela frente da fase móvel}} \quad [3]$$

Na análise da atividade antioxidante nos extratos, utilizou-se como fase móvel uma solução de tolueno (Merck, GE), acetato de etila (Mallinckrodt Chemicals, USA) (95:5, v:v) e como revelador, uma solução metanólica de 0,05% do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (Sigma Aldrich, GE) aspergido sobre a placa após eluição e secagem. As placas foram incubadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e então ocorreu a visualização das bandas. Aquelas que apresentaram coloração amarela sob o fundo roxo mostraram o indicativo de reação de oxi-redução, indicando componentes com atividade antioxidante.

4.4.3 Análise do perfil de voláteis por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM)

A composição volátil dos extratos, a uma concentração de 400 ppm em MeOH foi analisada por meio de cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas acoplado (CG/EM) (QP 2010 Plus, Shimadzu, JP) com injetor automático (AOC-5000, SWI). Nesta análise utilizou-se uma coluna capilar Rtx[®]-5MS (30 m × 0,25 mm id × 0,25 µm df, 5% difenil/95% dimetilpolisiloxano) (Restek, USA) e Hélio, como gás de arraste a uma pressão interna de 60 psi. Foi injetado 1 µL dos extratos para uma razão de split de 1:20. A temperatura do injetor foi de 220°C e a da interface entre a coluna e a fonte de íons foi de 250°C. A temperatura do forno foi regulada de forma a se obter uma rampa linear de 60 a 246°C em um gradiente de 3°C por minuto (ADAMS, 2009). A energia de ionização foi de 70 eV na fonte, e a faixa de varredura de massas foi de 50 a 500 m/z.

O tratamento dos espectros foi feito através do software GCMS solutions ver. 2.5 que possui como base de dados as bibliotecas NIST 08 e NIST 08s. Além das bases de dados existentes no software do CG/EM, como ferramenta de auxílio na identificação dos

componentes presentes nos extratos, calculou-se o índice de Kovats (KI) (eq. 4) e Van der Dool e Kratz (AI) (eq. 5) (ADAMS, 2009). Para tal, foi utilizado um padrão de alcanos C₁₀–C₄₀ (Fluka, GE), que foi analisado no CG/EM nas mesmas condições dos extratos e os tempos de retenção, bem como as respectivas temperaturas.

$$KI(x) = 100P_z + 100 \left[\frac{\log RT(x) - \log RT(P_z)}{\log RT(P_{z+1}) - \log RT(P_z)} \right] \quad [4]$$

Onde: RT(x) é o tempo de retenção do analito; RT(P_z) é o tempo de retenção do alcano imediatamente anterior ao do analito; RT(P_{z+1}) é o tempo de retenção do alcano imediatamente posterior ao do analito.

$$AI(x) = 100P_z + 100 \left[\frac{(T(x) - T(P_z))}{(T(P_{z+1}) - T(P_z))} \right] \quad [5]$$

Onde: T(x) é a temperatura no tempo de retenção do analito; T(P_z) é a temperatura no tempo de retenção do alcano imediatamente anterior ao do analito; T(P_{z+1}) é a temperatura no tempo de retenção do alcano imediatamente posterior ao do analito.

Com vistas a quantificar os sesquiterpenos em maior concentração nos extratos, utilizou-se o método de normalização externa e, como padrão o monoterpeno R-(+)-limonene (Sigma Aldrich, GE) em diferentes concentrações nas mesmas condições de análise de CG/EM que os extratos, e fez-se uma curva padrão com o eixo das ordenadas sendo as áreas dos picos e o eixo das abscissas sendo as concentrações em ppm das diluições (Figura 6).

A partir da equação gerada com o ajuste linear dos pontos experimentais, quantificou-se os sesquiterpenos relacionando-os à concentração em Equivalente de Limoneno (EqLim). A concentração dos terpenos nos extratos também foi uma resposta analisada no DCCR, utilizando a análise de superfície de resposta (ASR).

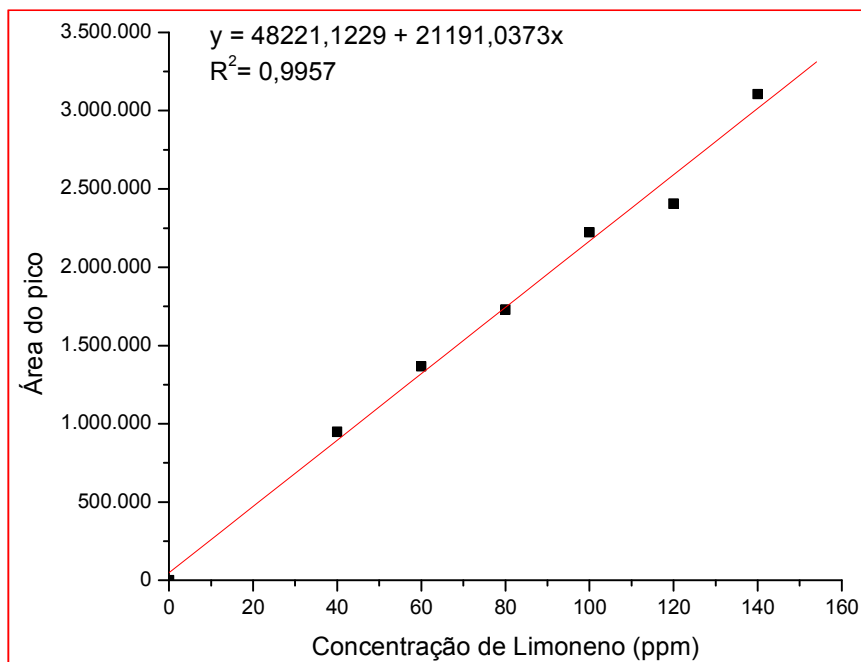


Figura 6 – Curva padrão de Limoneno para o cálculo da concentração de sesquiterpenos expresso em Equivalente de Limoneno (EqLim) dos extratos de semente de Pitanga.

4.4.4 Análise de compostos fenólicos totais (CFT)

Compostos polifenólicos são relevantes por agirem contra as patologias cardíacas, hipertensão arterial e degeneração relacionada à idade. Polifenóis totais são comumente quantificados pelo método Folin-Ciocalteu. Uma série de estudos tem apresentado o conteúdo total de polifenóis de produtos alimentares, a fim de estabelecer comparações com outros produtos similares e informações mais detalhadas sobre este sub-grupo de antioxidantes que compreendem, principalmente os flavonóides, ligninas e taninos (WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011).

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada usando a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Foram adicionados 1 mL dos extratos diluídos em MeOH grau cromatográfico (J.T.Baker, USA) à 1.000 ppm, a 5 mL de solução de reagente de Folin-Ciocalteu (Haloquímica, BR) diluída em água destilada (1:10, v:v). Após 10 min, 4 mL de solução aquosa com 7,5% de carbonato de sódio anidro padrão analítico (*Synth*, BR) foi adicionado. Depois de 2h em temperatura ambiente sem a presença de luz, as medidas das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro (Biospectro SP 22, BR) com comprimento de onda variando entre 400 e 800 nm. O branco foi preparado similar aos extratos, porém com 1mL de MeOH em substituição à solução contendo os extratos.

Ácido Gálico (Fluka, SWI) foi utilizado na determinação da curva padrão (0, 20, 30, 40 e 60 ppm) (Figura 7). A concentração de fenólicos totais foi calculada e expressa em mg equivalente de ácido Gálico (GAE) por 100 g de sementes de Pitanga secas.

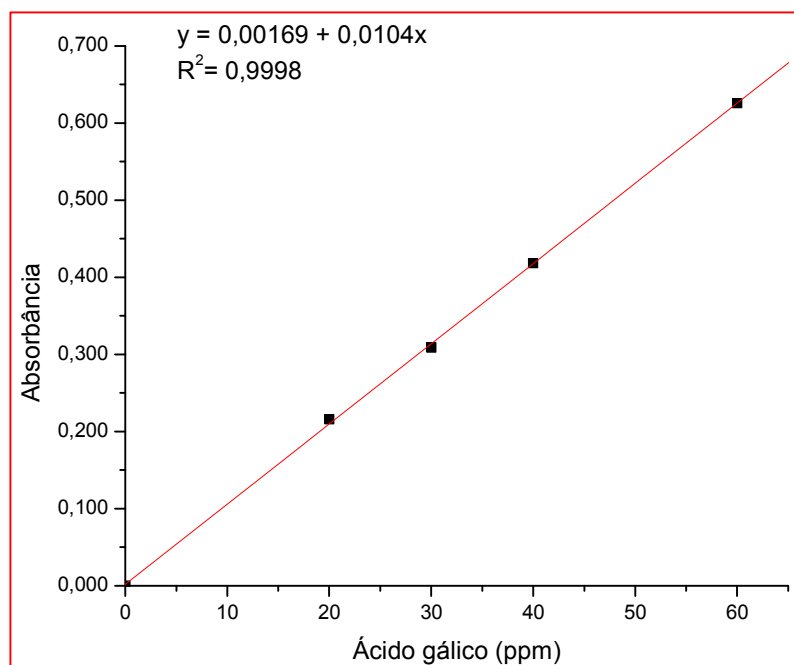


Figura 7 - Curva padrão de ácido gálico para determinação quantitativa de compostos fenólicos totais.

4.4.5 Atividade antioxidante pelo método DPPH

DPPH é um radical livre, estável a temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em etanol. Na redox, ele é reduzido na presença de moléculas antioxidantes, resultando no descolorimento da solução para amarelo (MENSOR *et al.*, 2001). Em um tubo de ensaio, adicionou-se a 3,9 mL da solução metanólica (J.T.Baker, USA) à 6×10^{-5} M de DPPH• (Sigma Aldrich, GE) e uma alíquota de 0,1 mL de diferentes concentrações de todos os extratos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Biospectro SP 22, BR) a 515 nm, sendo todas as determinações realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle sem o antioxidante. A queda na leitura da densidade ótica dos extratos adicionados de radical DPPH• foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do DPPH•, a qual indicou a atividade antioxidante para os extratos obtidos nos diferentes testes (BRAND-WYLLIANS *et al.*, 1995).

4.4.6 Atividade antioxidante pelo método ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) (Sigma Aldrich, GE), usou-se a metodologia descrita por Re *et al.* (1999), com adaptações de Rufino *et al.* (2007). Inicialmente o ABTS^{•+} foi formado a partir da reação de 7 mM de ABTS^{•+} com 140 mM de persulfato de potássio padrão analítico (Synth, BR). Esta solução foi incubada a temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 h. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol padrão analítico (Synth, BR) até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,70 (\pm 0,02) no comprimento de onda de 734 nm. No momento da mensuração da atividade antioxidante, foram misturados 30 μ L de todos os extratos diluídos em diferentes concentrações com 3 mL da solução contendo o radical e determinou-se a absorvância em espectrofotômetro (Biospectro SP 22, BR) a 734 nm, após 9 horas de reação, período necessário para o alcance da estabilidade das leituras das absorvâncias. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox (Sigma Aldrich, GE) nas concentrações de 100 a 2.000 μ M em EtOH e a resposta da ativação deste antioxidante nas reações de oxirredução com o ABTS^{•+} (Figura 8) indicada pela queda da absorvância com a concentração de antioxidante foi utilizada para indicar a atividade antioxidante dos extratos. Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em mM de Trolox por 100g de sementes secas.

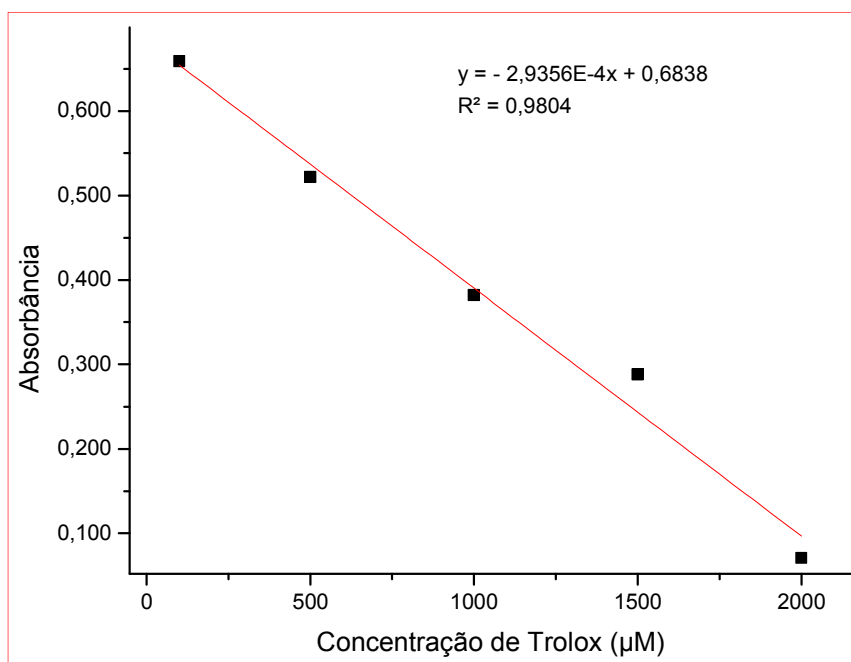


Figura 8 - Curva padrão que relaciona a concentração de Trolox com a resposta da inibição do ABTS^{•+} com leitura feita a 734 nm.

4.4.7 Determinação da atividade antimicrobiana - concentração inibitória mínima

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP). Estas análises foram realizadas para os extratos obtidos com CO₂ supercrítico, ponto central do DCCR, com o CO₂ supercrítico e etanol como co-solvente (SC-EtOH), via Soxhlet e a fração purificada do extrato obtido na extração SC-EtOH. Os testes utilizaram as cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Bacillus subtilis* ATCC 6623, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CEFAR, BR), conforme metodologia descrita por Andrade *et al.* (2010) e Dall' Stella (2008).

As cepas puras das bactérias foram repicadas em 10 mL de caldo nutriente (Oxoid, UK) e incubadas a 35°C, 24 h antes do teste. Após as 24 horas de incubação, as absorbâncias dos tubos contendo o caldo e os micro-organismos foram comparados com a absorbância do tubo 0,5 da escala de MacFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias pra cada mL (UFC.mL⁻¹), por meio de densitômetro UV (Suspension Turbidity Detector, DEN-1, LV) em comprimento de onda de 625 nm.

O teste consistiu em inocular assepticamente os extratos diluídos em MeOH (1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,625 ppm) no caldo Mueller-Hinton (Oxoid, UK) já contendo as bactérias incubadas ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) e após mais 24 h de incubação a 37°C, avaliou-se a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a mais baixa concentração onde não ocorre desenvolvimento microbiano. Esta análise constituiu em verificar a ausência da turbidez no tubo contendo a amostra, como um indicativo da inibição do crescimento das bactérias. A organização das diluições dos extratos bem como os controles (tubos 8 e 9) está listada na Tabela 5.

O controle negativo (tubo 8) se faz necessário para eliminar a possibilidade de resultados falso-positivos em função da turbidez apresentada pelo extrato. O controle positivo (tubo 9) indica o crescimento dos microorganismos, sem a influência das amostras, nas mesmas condições do ensaio. A leitura do resultado, através da análise visual da turbidez, foi realizada pela comparação de cada tubo com o controle negativo, sendo considerado como CIM a menor concentração da amostra nas diluições estudadas em que não houve crescimento bacteriano, verificada pela limpidez da amostra contida nos tubos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 5 – Diluição e conteúdo dos tubos de ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima.

Tubo	Diluição	Conteúdo
1	1:1ou 1000 ppm	1 mL do extrato
2	1:2 ou 500 ppm	1 mL do extrato e 1 mL de caldo Mueller Hinton
3	1:4 ou 250 ppm	1 mL do 2º tubo e 1 mL de caldo Mueller-Hinton
4	1:8 ou 125 ppm	1 mL do 3º tubo e 1 mL de caldo Mueller-Hinton
5	1:16 ou 62,5 ppm	1 mL do 4º tubo e 1 mL de caldo Mueller-Hinton
6	1:32 ou 31, 25 ppm	1 mL do 5º tubo e 1 mL de caldo Mueller-Hinton
7	1:64 ou 15,625 ppm	mL do 6º tubo e 1 mL de caldo Mueller-Hinton
8	-	1:64 ou 15,625 ppm (controle negativo)
9	-	1mL de caldo (controle positivo)

4.4.9 Inibição da enzima arginase

A determinação da inibição da enzima arginase foi realizada no Laboratório de Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP). A enzima arginase foi obtida de duas fontes, a partir do fígado de rato e replicada através do protozoário *Leishmania amazonensis*, modificado geneticamente na sua forma pró-mastigota, que cresce em ambiente extracelular e possui flagelo. Para a produção da enzima no protozoário, primeiramente o gene responsável pela produção da arginase foi isolado e amplificado em reação em cadeia de polimerase (PCR), adicionado a um organismo vetor, neste caso, a *E. coli* BL21 como plasmídeo e finalmente conjugado a outros protozoários, que uma vez assimilando o DNA com alta expressão de arginase, iniciam a sua produção (SILVA *et al.*, 2008). As enzimas provenientes do fígado de rato e da *Leishmania amazonensis* foram purificadas por técnicas de cromatografia de afinidade com metal imobilizado e cromatografia de troca iônica. O eluato foi então usado para teste de inibição da arginase neste trabalho.

Para este teste, foram utilizados os seguintes extratos, com composição diferentes: (1) o extrato supercrítico de sementes de Pitanga obtido nas condições de 175 Kgf.cm⁻² e 45°C, ponto central do DCCR, (2) extrato obtido pelo método Soxhlet, (3) extrato supercrítico em que se utilizou Etanol como co-solvente (SC-EtOH) e (4) fração purificada do extrato SC-EtOH. Todos os extratos foram diluídos a 1.000 ppm em MeOH grau cromatográfico (J.T.Baker, USA). O ensaio de inibição continha 10 mL de arginase de fígado de rato, 100 mM de L-arginina (pH 9,6) como substrato e 40 mL dos extratos que compunham o volume final de reação de 100 mL aferindo com água destilada. A mistura de reação foi incubada por 15 minutos a 37°C. Para a arginase da *Leishmania*, o procedimento foi o mesmo

diferindo somente a procedência da enzima. O controle para os experimentos foi um a mistura contendo o substrato, o solvente e a enzima arginase. Atividade de arginase foi determinada por ensaio espectrofotométrico, no qual a leitura da absorbância do tubo contendo os extratos foi relacionada com as leituras do controle negativo, sem os analitos (BERGMEYER, 1985). A enzima utilizada neste ensaio foi capaz de produzir 100 mM de uréia por minuto. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.5 Análise Estatística

As análises de caracterização da amostra (umidade, densidade aparente e extrato etéreo) foram apresentadas apenas em médias seguidas dos desvios padrões. As variáveis dependentes obtidas como respostas, tais como o rendimento da extração, a concentração de compostos fenólicos totais e os compostos sesquiterpênicos majoritários de interesse, foram analisados por ASR do DCCR com as duas variáveis independentes (P e T) (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 1996). A análise de superfície foi feita empregando o programa STATISTICA v.7.0 (USA). Os resultados de bioatividade (ação antioxidante, antimicrobiana e inibição da enzima arginase) foram apresentados em médias de triplicatas das análises.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Semente de Pitanga

As sementes de Pitanga secas e trituradas apresentaram uma porcentagem de umidade aproximada de 13% (Tabela 6). Vale ressaltar que tal resultado expressa as condições em que a semente se encontrava no momento da extração supercrítica após a secagem (38°C por 54h), e não o seu verdadeiro conteúdo de água, o qual, segundo Bagetti *et al.* (2009), chega a ser 58,6%. O valor médio de extrato etéreo obtido foi de 0,52%. Como a preparação da amostra para análise não influencia no teor de lipídios, estes estão similares ao encontrado por Bagetti *et al.* (2009).

Tabela 6 - Umidade e extrato etéreo da semente de Pitanga seca e triturada.

Ensaio	% Umidade	% Extrato etéreo
1	12,50	0,56
2	12,80	0,59
3	12,90	0,41
Média	12,73 ± 0,17	0,52 ± 0,07

O valor médio da densidade aparente (ρ_a) medida empiricamente foi de 0,482 g.cm⁻³ para as sementes de pitanga trituradas. As massas das sementes acondicionadas no extrator nos dez ensaios e seu respectivo valor são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Densidade aparente da amostra de semente de Pitanga seca e triturada.

Ensaio	Massa da semente (g)	Densidade (g/cm ³)
1	143,74	0,479
2	145,04	0,483
3	145,69	0,486
4	143,28	0,477
5	144,31	0,481
6	145,93	0,486
7	145,93	0,486
8	144,95	0,483
9	143,56	0,478
10	144,90	0,483
Média	144,73 ± 0,92	0,482 ± 0,003

Com as massas retidas nas seis peneiras da série Tyler indicada para análise de granulometria (Tabela 8), obteve-se o diâmetro médio das partículas de 0,48 mm. Este valor foi obtido pela relação entre a massa de sementes retida em cada peneira como demonstra a eq.(2). De acordo com Oliveira (2010), esse parâmetro é muito importante, pois está relacionado com a resistência interna à transferência de massa. Muitas vezes, para aumentar o rendimento de extração, pode-se reduzir o tamanho das partículas, com a finalidade de aumentar a área de contato entre o sólido e o solvente, diminuindo, desta forma, a distância que o soluto percorre no interior da partícula porosa para a superfície. Porém, a redução da granulometria do sólido não pode ser realizada de forma indefinida, pois partículas muito pequenas tendem a formar aglomerados e interromper a passagem do solvente pelo leito, além de proporcionar perda de compostos voláteis em matrizes vegetais ricas em óleos essenciais, por exemplo. De um modo geral, são utilizadas partículas com diâmetro médio entre 0,25 e 2 mm. O diâmetro encontrado nesse estudo está dentro do intervalo de trabalho recomendado.

Tabela 8 – Massa de sementes de Pitanga secas e trituradas retidas nas peneiras usadas na determinação do diâmetro médio das partículas.

Mesh	Abertura (mm)	Massa retida (%)	Massa retida (g)
10	1,700	0,02	0,05
14	1,180	4,49	8,99
20	0,850	20,38	40,75
28	0,600	16,15	32,30
35	0,425	12,42	24,83
48	0,300	16,24	32,49
Resíduo	< 0,300	30,15	60,31

* As frações de Tyler/Mesh 10 e o resíduo não entraram no cálculo do diâmetro médio.

5.2 Determinação de Rendimento Global

O rendimento global das extrações supercríticas (R) foi obtido pela relação entre a massa do extrato obtido no final da extração e a semente de Pitanga empacotada no extrator de leito fixo. Além do rendimento, a Tabela 9 apresenta os valores de outros resultados como a quantidade de compostos fenólicos totais (CFT), e a concentração dos principais compostos voláteis, γ -elemeno e germacrone, expresso em EqLim. As diferentes condições operacionais de P e T influenciaram em cada uma destas respostas e as análises de superfícies de respostas (ASR) irão indicar se esta influência foi significativa ou não.

Tabela 9 - Matriz do Delineamento Composto Rotacional de dois fatores (P e T) com três pontos centrais para o estudo do efeito da pressão e temperatura no rendimento (R), concentrações de compostos fenólicos totais (CFT) e voláteis dos extratos de semente de Pitanga.

Ensaio	Codificadas			Variáveis			ρCO ₂ (kg.m ⁻³)	R (%)	CFT (ppm GAE)	CFT* (mg GAE)	γ-elemento (ppm EqLim)	γ-elemento* (mg EqLim)	Germacrone (ppm EqLim)	Germacrone* (mg EqLim)
	P (Kgf.cm ⁻²)	T (°C)	P (Kgf.cm ⁻²)	T (°C)	P (Kgf.cm ⁻²)	T (°C)								
1	-1	-1	110	35	747,17	0,28	49,74	0,014	17,38	0,0048	16,66	0,0047		
2	+1	-1	240	35	896,08	0,46	73,48	0,034	22,67	0,0104	21,35	0,0098		
3	-1	+1	110	55	420,89	0,23	44,41	0,010	39,66	0,0091	38,35	0,0088		
4	+1	+1	240	55	802,33	0,47	39,79	0,019	16,21	0,0076	11,20	0,0052		
5	-1,41	0	83	45	242,37	0,16	18,08	0,003	15,18	0,0024	18,28	0,0029		
6	+1,41	0	267	45	865,54	0,42	66,75	0,028	25,85	0,0108	19,16	0,0080		
7	0	-1,41	175	31	862,77	0,39	61,59	0,024	16,39	0,0063	15,24	0,0059		
8	0	+1,41	175	59	674,89	0,46	61,42	0,028	16,73	0,0076	14,41	0,0066		
9 ^e	0	0	175	45	777,57	0,44	48,76	0,021	16,45	0,0072	13,00	0,0057		
10 ^e	0	0	175	45	777,57	0,40	42,65	0,017	21,21	0,0084	16,15	0,0064		
11 ^e	0	0	175	45	777,57	0,48	23,35	0,011	16,62	0,0079	14,00	0,0067		

*para 100g de sementes.

Para cada ensaio ou para cada valor de P e T nas condições operacionais supercríticas existe um valor correspondente da densidade do CO₂ que foi calculada pela equação de Huang *et al.* (1985) com auxílio de um programa computacional (Tabela 9). Quando se avalia o rendimento global relacionando-o com as densidades do CO₂ supercrítico (Figura 9), constata-se que as densidades elevadas fazem com o fluido supercrítico tenha um maior poder de solvatação do soluto e, conseqüentemente, maiores rendimentos destes extratos. Não há como discutir separadamente os efeitos da densidade, pressão e temperatura do CO₂ supercrítico. Por exemplo, o rendimento obtido no ensaio 8,

($\rho_{\text{CO}_2} = 674,89 \text{ kg.m}^{-3}$) foi tão elevado quanto aquele obtido no ensaio 2 ($\rho_{\text{CO}_2} = 896,08 \text{ kg.m}^{-3}$) e isto se deve à influência da temperatura que no ensaio 8 é de 59°C enquanto que no ensaio 2 é de 35°C (Tabela 9).

Nas proximidades do ponto crítico do solvente um pequeno aumento na pressão aumenta substancialmente a densidade do solvente e, conseqüentemente, aumenta o poder de solvatação do fluido. Por outro lado, um pequeno aumento na temperatura perto do ponto crítico diminui a densidade do solvente e, conseqüentemente, seu poder de solvatação. Assim, a solubilidade de solutos em fluidos supercríticos aumenta abruptamente, próximo ao ponto crítico com a elevação da pressão em condições isotérmicas. Apesar do aumento da temperatura diminuir o poder de solvatação do solvente, isso eleva a pressão de vapor do soluto. Portanto, a variação da solubilidade com a temperatura depende da pressão e este fato explica o rendimento dos extratos (Figura 9).

Este comportamento é comum em extratos vegetais e foi também observado por Boutin e Badens (2009), quando obtiveram extratos supercríticos de sementes oleaginosas e por Kopcapk e Mohamed (2005) no estudo da solubilidade de cafeína.

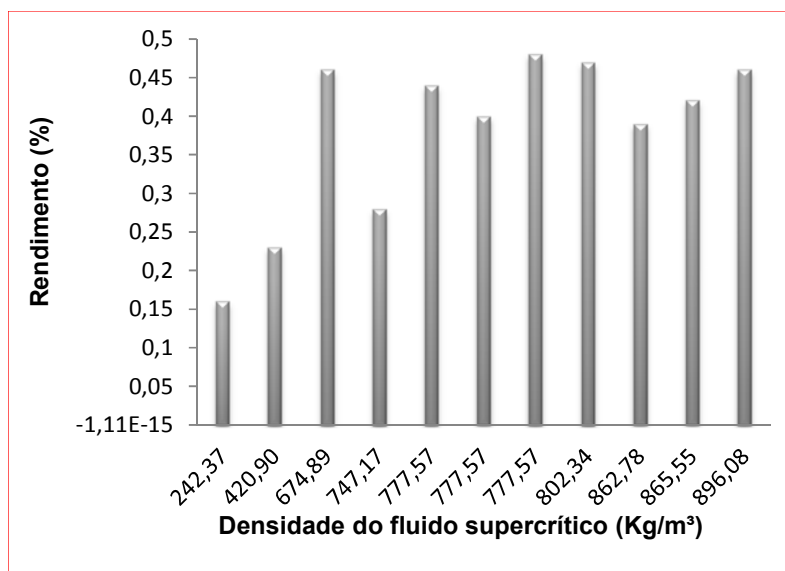


Figura 9 – Rendimento das extrações de semente de Pitanga em função da densidade do CO_2 supercrítico.

Os rendimentos dos extratos supercríticos de semente de Pitanga variaram de 0,16% a 0,48%, sendo a média de 0,38%. Como os maiores valores de rendimento foram obtidos no ponto central, usou-se essa condição operacional na extração com o co-solvente (SC-EtOH). Porém, na extração com o co-solvente, foi obtido um rendimento de apenas 0,35%. Isso pode ser explicado pela alteração na polaridade do fluido e conseqüentemente na sua solubilidade resultante da incorporação do etanol. Considerando o rendimento obtido

quando o co-solvente foi usado, nota-se que as condições de pressão e temperatura estudadas neste ensaio não são as condições que levam a um rendimento aumentado com a adição de EtOH, e mais estudos seriam necessários para se chegar às condições operacionais adequadas para otimizar o processo quando EtOH é empregado como co-solvente, mesmo porque o aumento da polaridade do fluido supercrítico ocasionado pela adição do EtOH irá proporcionar a solubilização de compostos polares diferentes daqueles obtidos quando somente o CO₂ supercrítico é utilizado como solvente.

Analisando a influência dos fatores estudados (P e T) no rendimento da extração com CO₂ supercrítico, o diagrama de Pareto (Figura 10) mostra na análise de efeitos, que apenas a pressão foi significativa para esta resposta, ao nível de 95% de significância.

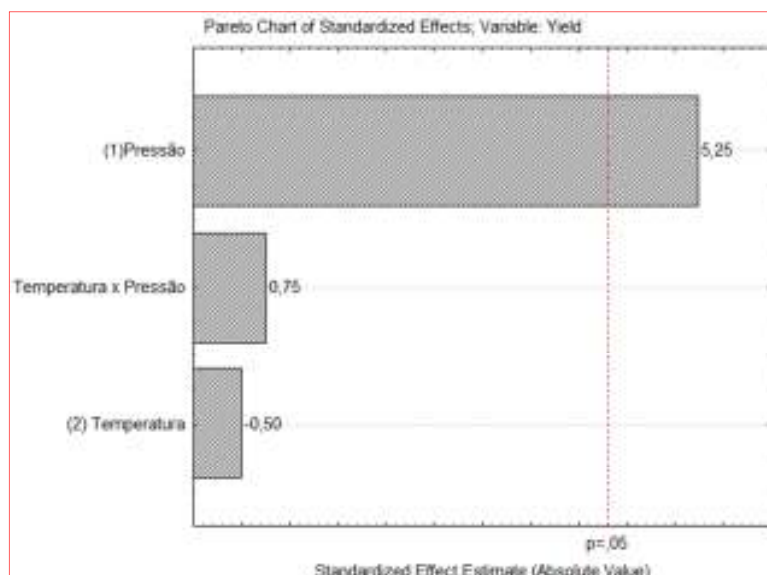


Figura 10 - Diagrama de Pareto das variáveis (P e T) estudadas no rendimento de extratos supercríticos de semente de Pitanga.

Os coeficientes de regressão da equação preditiva do rendimento dos extratos de sementes de Pitanga (R) em função das variáveis independentes (P e T) são apresentados na Tabela 10. Nos modelos matemáticos gerados a partir destes coeficientes (eq.6 e 7) nota-se que os coeficientes significativos foram aqueles relacionados à pressão e, nem mesmo a interação entre P e T, apresentou coeficientes significativos nos modelos.

Na análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 11, para os delineamentos experimentais de primeira e segunda ordem para o rendimento da extração supercrítica, nota-se que ambos os modelos, linear e quadrático comprovam que há efeito significativo de pelo menos uma das variáveis estudadas, já que o valor do teste F calculado (F_{calc}), comparado com o F tabelado (F_{tab}) para uma distribuição F a 95% de confiança foi maior. Os

coeficientes de determinação (R^2) (Modelo linear 0,76 e Modelo quadrático 0,95) calculados sugerem que o modelo de segunda ordem possui um bom ajuste dos dados experimentais à reta de regressão, apresentando uma boa capacidade preditiva para o rendimento do extrato.

Tabela 10 - Coeficientes de regressão significativos para modelos linear e quadrático que simulam o rendimento dos extratos de semente de Pitanga obtidos com CO₂ supercrítico.

Resposta	Coeficientes de regressão	
Linear	$R = 0,394 + 0,105P$	[6]
Quadrático	$R = 0,22 + 0,05P - 0,035P^2$	[7]

Tabela 11 - ANOVA para os modelos de primeira e segunda ordem do DCCR para o rendimento (%) dos extratos.

Modelo linear ou de primeira ordem					
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado médio QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	0,057	1	0,057	95	6,61
Resíduo (r)	0,003	5	0,0006		
Total (T)	0,060	6			
Modelo quadrático ou de segunda ordem					
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado médio QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	0,114	2	0,057	152	4,46
Resíduo (r)	0,003	8	0,000375		
Total (T)	0,117	10			

F_{tabelado} com 95% de confiança .

O F_{calc.} (QM_R/QM_r) maior que o F_{tab.} no nível de 95% de confiança

Ainda é possível visualizar, através da análise de superfície de resposta (ASR) gerada pelo modelo de segunda ordem (Figura 11) que para o intervalo de P e T estudado a região otimizada é aquela com maiores valores de P para toda a faixa de T. O fato de poder operar o equipamento em uma região com baixas temperaturas obtendo um bom rendimento acarreta na garantia da integridade das substâncias termossensíveis. Desse modo, a extração com CO₂ supercrítico pode apresentar grande vantagem em relação aos métodos convencionais, nos quais algumas vezes, obrigatoriamente, devem ser usadas altas temperaturas. Ainda, com emprego de temperaturas brandas, o consumo de energia é menor o que representa uma consideração econômica a ser analisada.

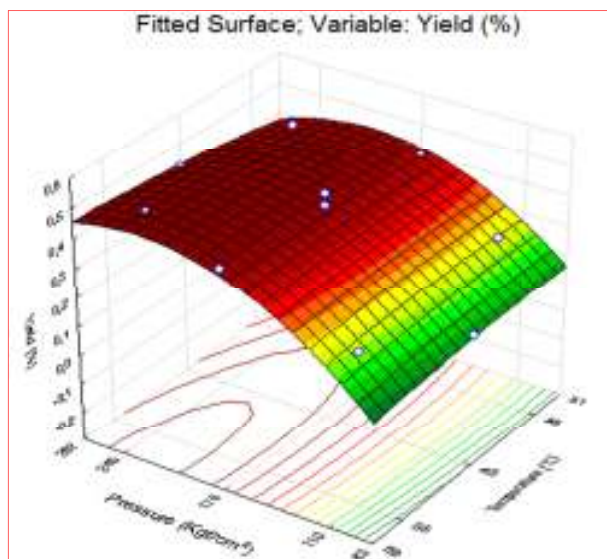


Figura 11 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que mostra os efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração.

5.3 Determinação de Cinética de Extração

Uma vez que os investimentos na construção de uma unidade de EFS são elevados, a otimização das condições operacionais do processo são essenciais no sentido de tornar a técnica economicamente atraente. Este é o objetivo da modelagem matemática dos experimentos, através da qual as curvas cinéticas de extração são analisadas a fim de se determinar parâmetros relacionados ao desenvolvimento de processos. As curvas cinéticas de extração fornecem informações consistentes relacionadas à pressão, temperatura e vazão de solvente, auxiliando o desenvolvimento e aumento de escala de processos de extração supercrítica (TAKEUCHI, 2009).

A curva cinética do ensaio cujos maiores rendimentos foram obtidos (175 Kgf.cm⁻² e 45°C) ponto central do DCCR estão expressas em taxa de massa em função do tempo (Figura 12) e razão de massa em função da vazão de CO₂ (Figura 13). As curvas obtidas mostram o comportamento típico da cinética de extração com fluido supercrítico. Na primeira região da curva a transferência de massa é controlada pela convecção do soluto presente na superfície da matriz vegetal; a segunda região expressa a diminuição da transferência de massa ocasionada pela difusão do soluto do centro da matriz para a superfície e pela convecção, e a terceira na qual não se tem soluto facilmente disponível na matriz e a difusão do centro para a superfície é o principal mecanismo de obtenção do extrato.

Nas curvas cinéticas da extração supercrítica de sementes de Pitanga (Figuras 12 e 13) observa-se que duas fases merecem maior atenção. Na primeira fase ocorre um rápido aumento acumulado da massa de extrato em um curto período o que reflete na rápida solubilização do extrato pelo CO₂ supercrítico e a segunda fase (platô da curva) indica que a mobilidade do extrato das sementes para o solvente é quase nula. É comum não visualizar distintivamente todas as três fases típicas de uma curva de cinética, principalmente quando a solubilidade do extrato é alta no CO₂ supercrítico.

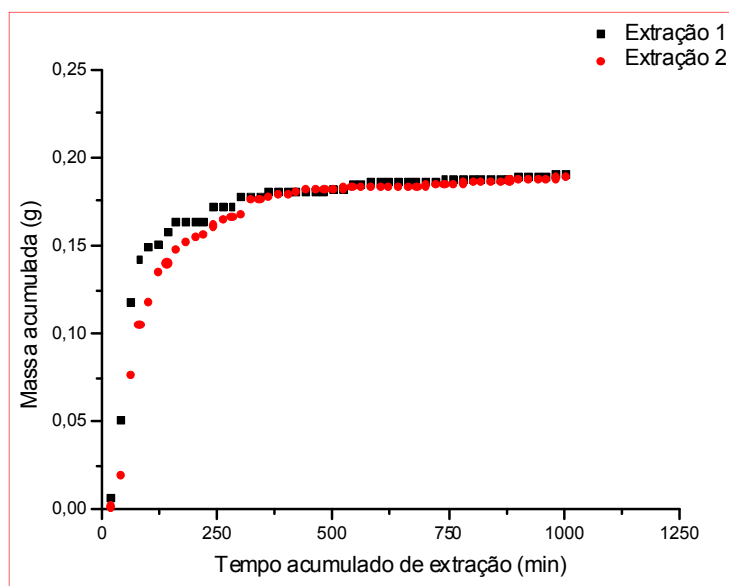


Figura 12 – Massa acumulada de extração em função do tempo de extração.

Na extração do óleo de vetiver estudado por Danh *et al.* (2009), foram observadas apenas duas fases. Inicialmente, o aumento na quantidade total de CO₂ supercrítico utilizado resultou em um aumento acentuado no rendimento. No entanto, à medida em que mais CO₂ supercrítico foi utilizado na extração, incrementos menores na produção de óleo foram ocorrendo. Os resultados podem ser explicados com base na distribuição de óleos dentro das células da raiz. Na fase inicial, o óleo é extraído da superfície das partículas, e a solubilidade do óleo em CO₂ supercrítico controla a transferência de massa. Na última etapa, o óleo a partir de células intactas vai se difundindo e a transferência de massa é controlada pela difusão do óleo de dentro das partículas. A taxa de transferência de massa é baixa e incrementos de rendimento de óleo são insignificantes em comparação com o período de extração rápida.

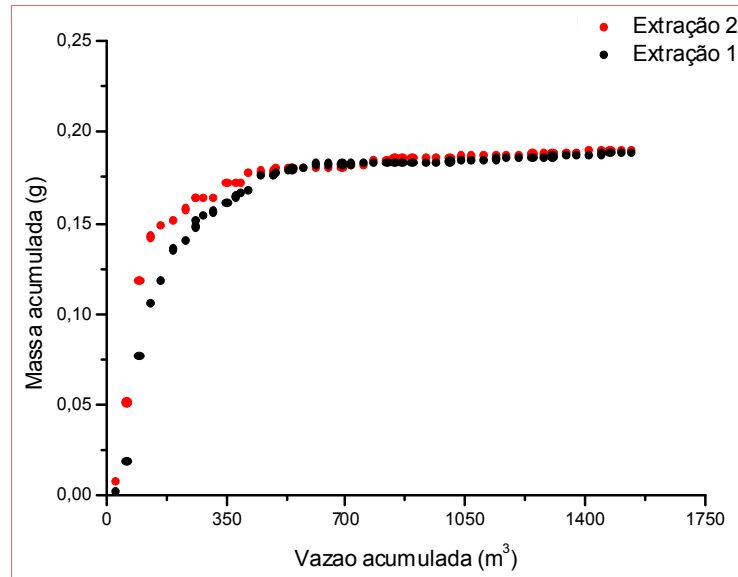


Figura 13 – Massa acumulada de extração em função do volume acumulado de CO₂.

No estudo da cinética de extração de alecrim-do-campo (PIANTINO *et al.*, 2008), o primeiro período foi quase inexistente, cerca de 50% do extrato foi obtido com aproximadamente 20 g de CO₂ (primeiro período) e os outros 50% com 400 g de CO₂. Neste estudo também foi notado que não existe uma tendência de combinar os rendimentos globais a diferentes diâmetros médios de partículas após longos períodos de tempo, indicando que a difusão não é o único fenômeno que limita a extração durante o período de diminuição das taxas de extração.

5.4 Caracterização dos Extratos

Em complementação ao estudo da otimização do processo de extração, os extratos também foram preliminarmente caracterizados com relação à presença de terpenos, e sua indicação de respectiva atividade antioxidante, e quantitativamente quanto à concentração dos compostos voláteis e concentração de compostos fenólicos totais (CFT) presentes, além da sua bioatividade (efeito antioxidante *in vitro*, ação antimicrobiana e de inibição da enzima arginase). Algumas de suas caracterizações foram tratadas como respostas às diferentes condições operacionais, as quais foram analisadas por análise de superfície de resposta (ASR).

5.4.1 Índice de refração e cromatografia em camada delgada

O índice de refração de uma substância é a relação entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz na substância testada (JORGE; LOPES, 2003) e constitui um dos mais importantes parâmetros ópticos dos materiais, desempenhando um papel importante em caracterizações físicas e químicas das substâncias. Medições precisas do índice de refração de líquidos e variações neste índice, dependendo da concentração de soluções, indicam as propriedades moleculares de compostos químicos e a caracterização de líquidos em processos químicos. Um conhecimento preciso do índice de refração apresenta uma visão sobre a pureza e a reprodutibilidade do material para instrumentação óptica (SAMEDOV, 2006).

A Figura 14 apresenta o índice de refração a 20 e 40 °C dos extratos supercríticos de semente de Pitanga, os quais variaram de 1,503 a 1,519 a 20°C e de 1,490 a 1,510 a 40°C. Destaca-se também a similaridade dos índices de refração para os ensaios E9, E10 e E11, os quais foram obtidos nas mesmas condições operacionais.

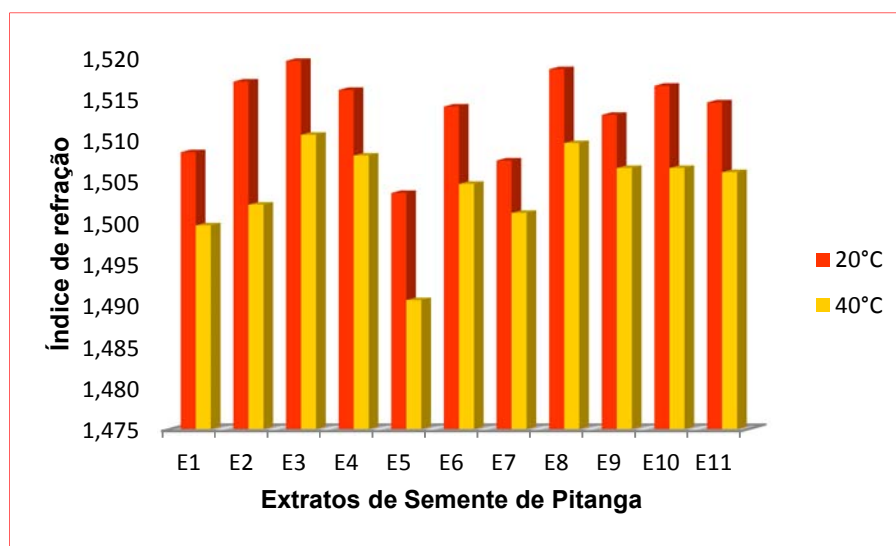


Figura 14 – Índice de refração dos extratos SFE de sementes de Pitanga a 20 e 40°C.

O índice de refração encontrado nos extratos está de acordo com o que Baser e Buchbauer (2010) afirmam, que para óleos essenciais este índice fica em uma escala de 1,4500 a 1,5900, a 20 °C. Assim, pode-se dizer que os componentes presentes nos extratos supercríticos de semente de Pitanga possuem esta característica de óleo essencial. Os dados deste estudo estão similares aos de óleos essenciais obtidos por outros métodos, como no trabalho de Bousbia *et al.* (2009), que obteve óleo essencial de alecrim por micro-ondas e hidrodifusão e para os dois métodos, encontrou valores de 1,468 e 1,470,

respectivamente. O óleo essencial de tomilho obtido na pesquisa de Golmakani e Rezaei (2008) por técnicas como hidrodestilação assistida por micro-ondas e hidrodestilação convencional também apresentou um índice de refração similar ao dos extratos da semente de Pitanga, 1,503 a 20°C.

A Figura 15 mostra a revelação de diversos compostos terpênicos em cromatoplaças, totalizando sete substâncias diferentes. Porém, nem todas aparecem em todos os extratos. A exemplo, o composto 7 não aparece nos extratos 1, 2, 3 e 5. A presença destes compostos terpênicos nos extratos Soxhlet, SC-EtOH e SC-EtOH purificado também são diferenciados, havendo menor número de bandas que indicam os terpenos revelados. A determinação qualitativa de terpenos por CCD revelou a presença destes compostos em todos os extratos analisados, sugerindo que possuem óleo essencial em sua composição, o que convém com a análise de índice de refração. Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropenos são as classes de compostos mais comuns. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os mono- e sesquiterpenos, bem como os diterpenos, que são constituintes minoritários (CASTRO *et al.*, 2004).

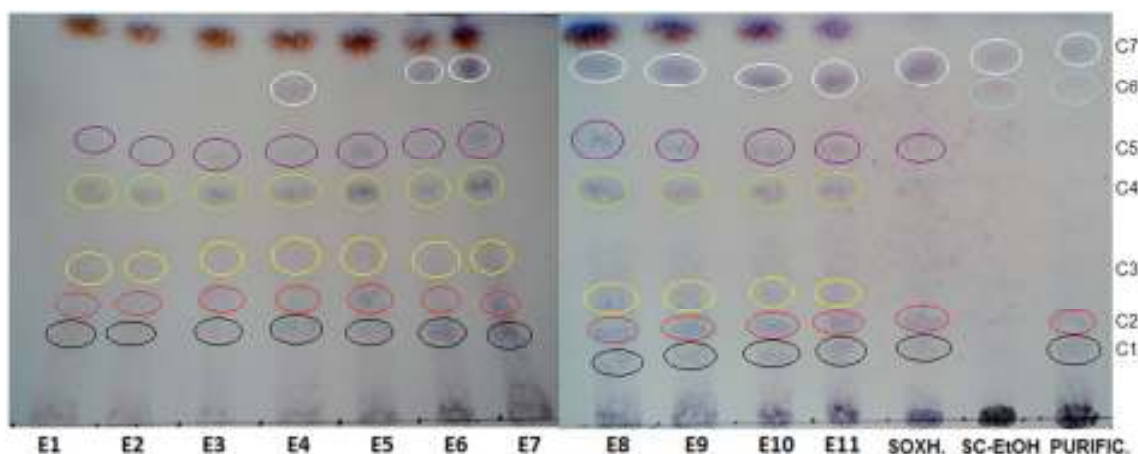


Figura 15 – Cromatograma dos extratos das sementes de Pitanga, em placa de Sílica Gel 60 F254 com fase móvel tolueno e acetato de etila (93:7 v:v) e revelador Anisaldeído para a detecção de terpenos.

Naturalmente, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas que os contêm. Apresentam funções como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros por reduzir seu apetite pelas plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis. Atualmente, cerca de 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, principalmente para as indústrias

farmacêutica, odontológica, de alimentos, agrônômica, sanitária, indústrias de cosméticos e perfumes, para os mais diversos fins (BAKKALI *et al.*, 2008).

Através da relação entre a medida da eluição dos compostos revelados e da fase móvel na CCD, calculou-se o índice de retenção para todos os componentes encontrados (Tabela 12). Os extratos que tiveram o etanol como co-solvente na extração supercrítica SC-EtOH ou SC-EtOH purificado a apresentaram um componente distinto dos demais (C₆) com maior índice de retenção e menor polaridade que os demais.

Terpenos provenientes de óleos essenciais de plantas sílica Gel 60 F₂₅₄ usando como fase móvel tolueno e acetato de etila (93:7) mostram que alguns destes compostos têm índice de retenção em uma zona que varia de 0,2 à 0,9 aproximadamente (WAGNER; BLADT, 2009), o que coincide com os índices determinados experimentalmente neste trabalho (Tabela 12).

Tabela 12 – Índice de retenção dos compostos revelados pela Cromatografia em Camada Delgada dos extratos das sementes de Pitanga, em placa de Sílica Gel 60 F₂₅₄ com fase móvel tolueno e acetato de etila (93:7 v:v) e revelador Anisaldeído.

EXTRATO	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
SC-1	0,23	0,29	0,40	0,55	0,68	-	-
SC-2	0,25	0,32	0,41	0,53	0,65	-	-
SC-3	0,23	0,33	0,41	0,53	0,63	-	-
SC-4	0,23	0,32	0,43	0,55	0,65	-	0,81
SC-5	0,21	0,33	0,43	0,55	0,68	-	-
SC-6	0,21	0,32	0,43	0,55	0,68	-	0,86
SC-7	0,21	0,32	0,41	0,57	0,71	-	0,88
SC-8	0,18	0,23	0,34	0,44	0,72	-	0,89
SC-9	0,18	0,25	0,34	0,44	0,69	-	0,88
SC-10	0,18	0,25	0,34	0,44	0,69	-	0,86
SC-11	0,18	0,26	0,35	0,46	0,68	-	0,86
SOXHLET	0,20	0,26	-	-	0,68	-	0,89
SC-EtOH	-	-	-	-	-	0,78	0,91
SC-EtOH Purificado	0,20	0,26	-	-	-	0,78	0,94

Utilizando a mesma fase móvel, mas revelando com o radical livre DPPH, com o intuito de verificar a atividade antioxidante, foi possível visualizar manchas amarelas, indicativas da inibição do radical livre (Figura 16). Assim, é possível que os terpenos revelados tenham atividade antioxidante, tal como revela Souza *et al.* (2007), o qual afirma que é comprovada a ação provedora e termotolerância, fotoprotetora e antioxidante de monoterpenos de

plantas, relacionadas especialmente à sua capacidade de captar radicais de oxigênio oriundos do processo fotossintético.

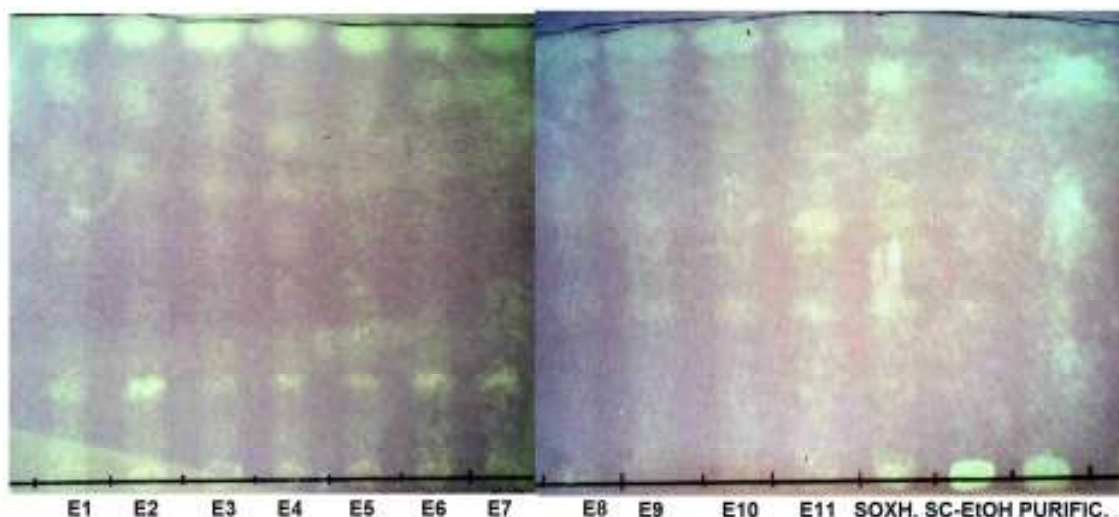


Figura 16 – Cromatograma dos extratos das sementes de Pitanga em Cromatografia de Camada Delgada, em placa de Sílica Gel 60 F₂₅₄ com fase móvel tolueno e acetato de etila (93:7 v:v) e revelador uma solução 0,05% do radical DPPH.

Em trabalho realizado por Zhao J. e colaboradores (2010), com óleos essenciais de diferentes espécies de cúrcuma a análise de CCD, com revelador constituído do radical DPPH a 0,04%, indicou que os padrões utilizados (curzereno, germacrone e furanodienone) demonstraram atividade antioxidante. Nesta análise os autores identificaram previamente alguns compostos existentes no óleo essencial com base no índice de retenção. Ainda, placas reveladas foram escaneadas para determinar a contribuição da ação antioxidante de cada composto.

O efeito protetor de óleos essenciais foi estudado, via modelagem, na bicamada lipídica de membranas celulares por Beretta *et al.* (2011). Eles mostraram que alguns componentes de óleos essenciais exercem uma ação antiperoxidante por interagir rápido e de maneira estável com a face externa da bicamada fosfolipídica das membranas celulares sendo este mais um indicativo de ação antioxidante de óleos essenciais.

5.4.2 Composição volátil dos extratos

As Figuras 17 e 18 apresentam os cromatogramas de íons totais dos extratos supercríticos de sementes de Pitanga, ensaios de 1 a 8 e de 9 a 11, respectivamente, bem como o extrato Soxhlet. Na Figura 18 observa-se em destaque a ampliação da região onde os principais picos se concentram. Os extratos obtidos com CO₂ supercrítico modificado pelo

co-solvente (EtOH), diluídos na mesma concentração dos extratos obtidos quando SC-CO₂ foi empregado, não apresentaram os compostos voláteis visualizados nas Figuras 18 e 19. Nos cromatogramas, os picos que mais se destacam aparecem nos tempos de retenção 28,53 e 33,72 min, sendo, respectivamente, γ -elemeno e germacrone. Para cada extrato, a Tabela 13 mostra a área percentual dos voláteis encontrados.

Entre os extratos supercríticos, os teores dos voláteis majoritários, γ -elemeno e germacrone expressos pela soma da área percentual dos picos, variaram de 75,18% a 81,60% nos extratos. Para o germacrone, a área percentual dos picos variaram para as diferentes condições operacionais, de 33,04% para o ensaio 6 até 38,02% para os ensaios 1 e 7. O γ -elemeno apresentou variação na área percentual dos picos de 36,70% para o ensaio 5 até 46,14 % para o ensaio 4.

Os extratos obtidos pelo método de extração Soxhlet também apresentam os voláteis majoritários, porém em menores quantidades quando comparadas aos obtidos pelo emprego de SC-CO₂. O γ -elemeno aparece nos extratos entre 1,65 até 3,21 ppm em EqLim, o furanodieno está presente de 0,57 a 0,80 ppm e a concentração do germacrone varia de 1,85 até 2,72 ppm. Isso pode ser explicado pela alta temperatura empregada nesta extração, que ao longo das 6h de extração promove a degradação das substâncias mais sensíveis, a exemplo dos compostos terpênicos.

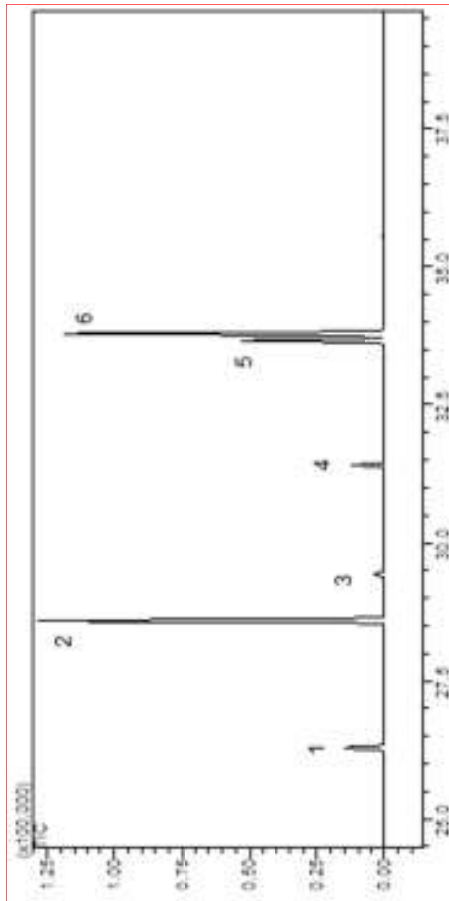
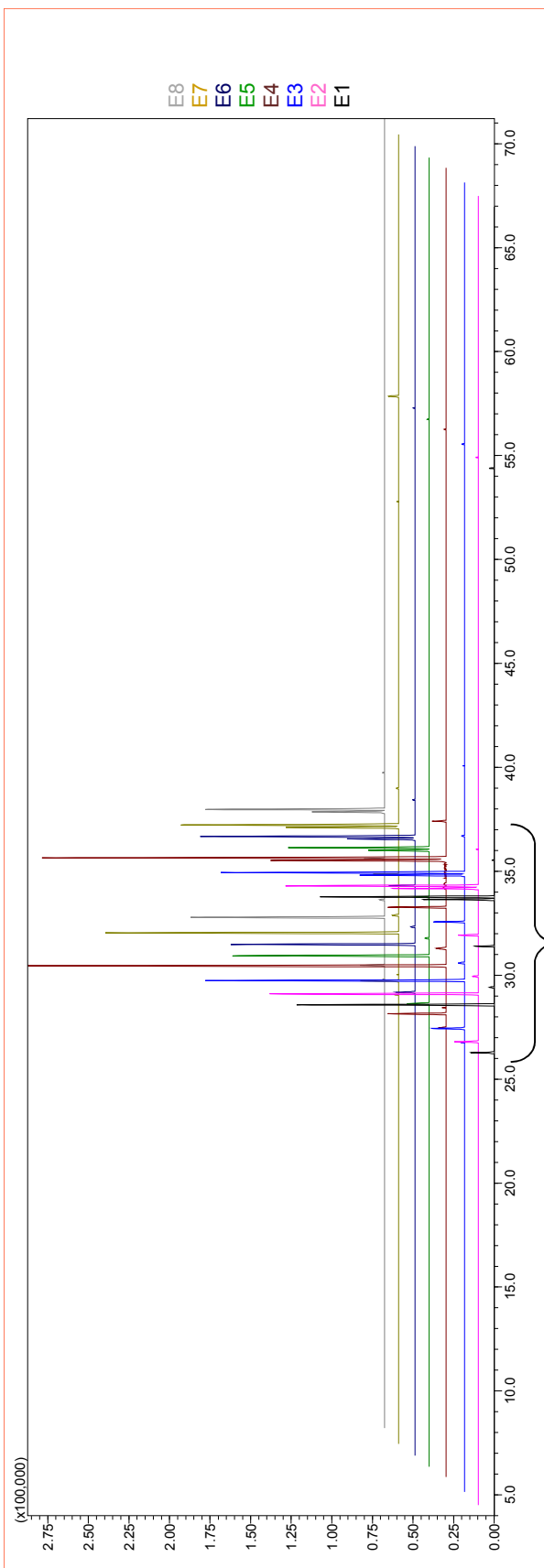


Figura 17 - Cromatograma de íons total (total ion chromatography, TIC) dos extratos de semente de Pitanga (ensaio 1 ao 8, de baixo pra cima), coluna capilar Rx@-5MS; fase móvel metanol. Detalhe na seção ampliada, em que são evidenciados os principais picos.

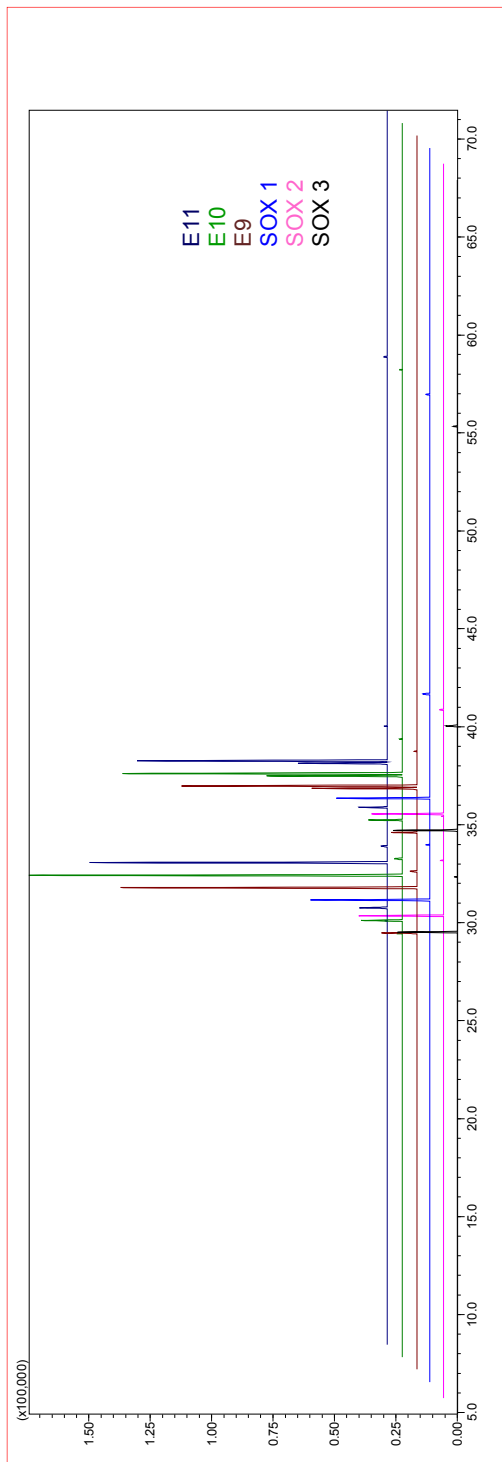


Figura 18 - Cromatograma de íons total (*total ion chromatography*, TIC) da fração Soxhlet e dos extratos supercríticos (ensaios 9, 10 e 11 de baixo para cima) de semente de Pitanga; coluna capilar Rtx®-5MS; fase móvel metanol. Os picos em destaques estão igualmente mostrados na Figura 17.

Tabela 13 - Composição da fração volátil dos extratos supercríticos da semente de Pitanga (*Eugenia uniflora*) obtidos por análise em GC/MS em coluna Rtx®-5MS.

Pico	Substância	TR	Área dos picos nos extratos (%)											KI	KI*	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
1	Isosericinina	26,23	4,27	4,62	5,11	4,50	3,32	5,13	4,36	4,34	4,25	4,64	3,47	1450	1454	
2	Gama-elemeno	28,53	39,47	39,02	38,17	46,14	36,70	42,93	40,52	41,99	43,86	43,52	43,83	1479	1481	1436*
3	Impureza	29,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	N.I.	31,36	3,23	3,97	4,87	2,53	4,42	3,28	3,48	3,33	2,84	3,07	3,26	1617	1618	
5	Furanodieno	33,60	15,01	15,20	14,84	13,19	12,33	15,62	13,62	13,46	13,27	14,63	11,67	1648	1650	1666**
6	Germacrone	33,72	38,02	37,19	37,01	33,64	43,22	33,04	38,02	36,87	35,78	34,13	37,77	1648	1652	1655***

TR = tempo de retenção; KI = Índice de Kovatz determinado usando n-hidrocarbonetos C₉ – C₂₂ como padrão de referência externa; KI* = Índice de Kovatz da literatura. * Costa et al.(2010); **Chang et al. (2011); ***Marongiu et al. (2005).

Como ferramentas de identificação dos componentes presentes nos extratos, utilizou-se primeiramente as bibliotecas NIST e NIST08 acopladas ao software. Os espectros de massa do γ -elemeno e do germacreno dos extratos apresentaram uma porcentagem de similaridade de 91 a 93% em comparação com os espectros existentes no programa. A Figura 19 mostra o espectro de massa do γ -elemeno e do germacreno dos extratos de semente de Pitanga bem como os espectros de massa dos mesmos compostos da biblioteca NIST.

Em segunda instância, calculou-se o índice de Kovatz (eq.3) para os componentes e comparou-se com os valores reportados na literatura, como é mostrado na Tabela 13. Os valores de IK calculados para os componentes voláteis da semente de Pitanga são próximos dos valores referenciados.

Em relação ao terceiro componente mais intenso, o furanodieno, a similaridade mostrada pela biblioteca NIST e NIST08 indicava ser o curzereno, com valores de 71 a 77% de semelhança entre o composto proveniente dos extratos e o padrão apresentado pela biblioteca. Calculando o índice de Kovatz para esse componente observou-se uma grande diferença com os valores de KI para o curzereno disponíveis na literatura, em torno de 1470 e o valor encontrado neste estudo, 1650.

Um estudo recentemente realizado por Chang e colaboradores (2011) analisou a influência das condições de análise de cromatografia gasosa sobre a quantificação de substâncias termossensíveis como os compostos voláteis em óleo essencial de Pitanga. Foi visualizada a conversão estrutural de furanodieno a curzereno sob condições de aquecimento da rampa de temperatura da coluna similares à realizada neste estudo, e, sob condições brandas de corrida esta conversão não foi verificada pelo autores. De acordo com esse trabalho, é possível que se tenha concentrações parciais de cada um dos compostos (furanodieno e curzereno) nos extratos, porém, levando em consideração o KI calculado e aqueles reportados na literatura, foi considerado que a substância presente na fração volátil da semente de Pitanga é o furanodieno.

Os componentes encontrados, germacreno, furanodieno e γ -elemeno pertencem ao grupo dos sesquiterpenos germacranos, aos quais são atribuídos vários efeitos, tais como de intermediários de biossíntese de vários sesquiterpenos, como feromônios sexuais e de alarmes, anti-inflamatório, agentes anticancerígenos, atividade antiplasmodial, atividades antibacteriana e antifúngica, atividade fitotóxica, inibidor de necrose tumoral, atividade nematicida, atividade citotóxica, atividade inibitória de tirosinase e outras diversas atividades biológicas (ADIO, 2009).

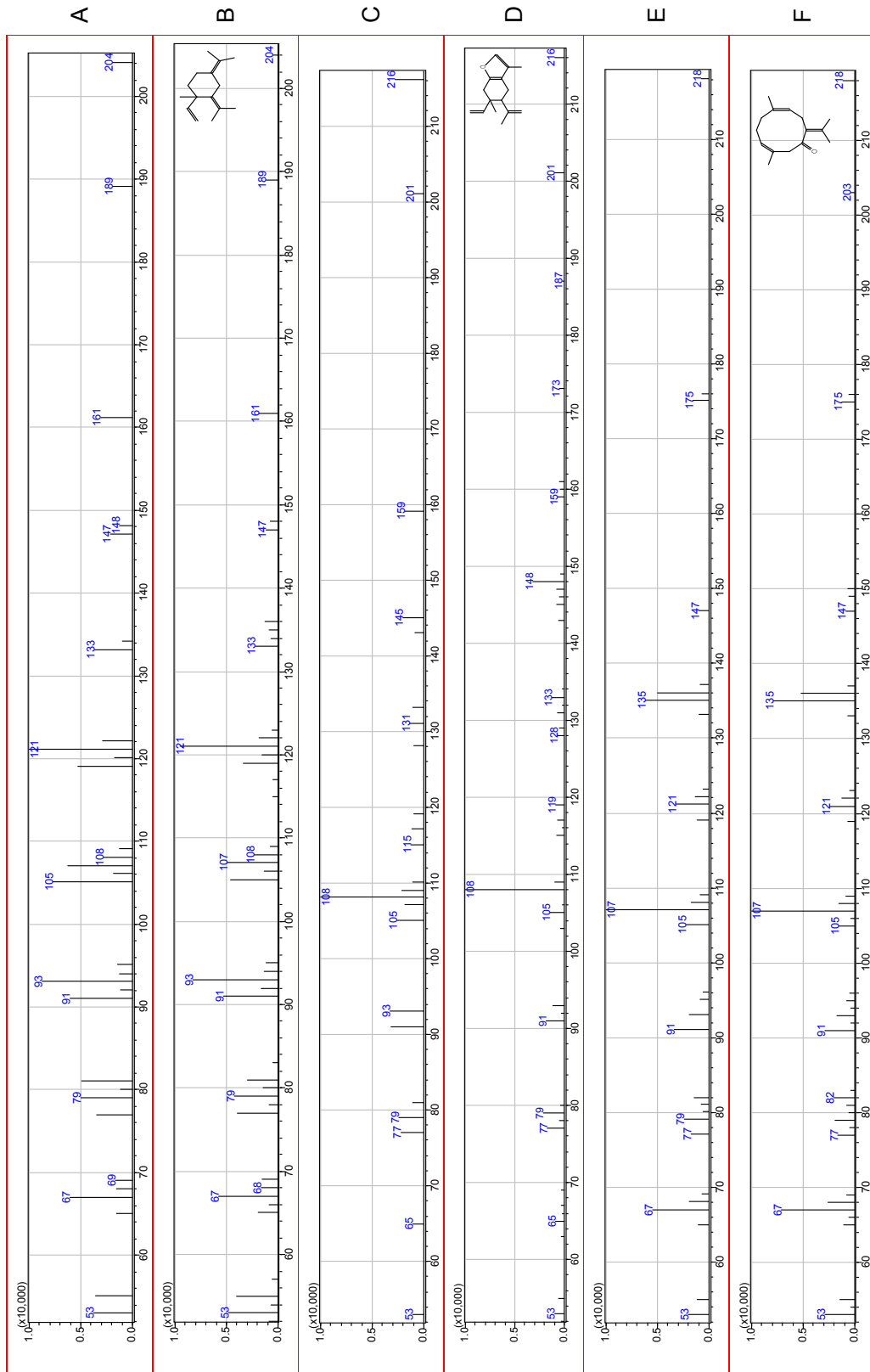


Figura 19 – Espectros de massa (EM) dos compostos majoritários dos extratos de semente de Pitanga. A: EM do gama-elemento dos extratos. B: EM do gama-elemento da biblioteca NIST. C: EM do furanodieno dos extratos. D: EM do curzereno da biblioteca NIST. E: EM do germacrone dos extratos. F: EM do germacrone da biblioteca NIST.

Estudos sobre a atividade biológica do germacrone são limitados. No entanto, pesquisas demonstraram que este composto exerce atividade antitumoral pela indução a apoptose de células de câncer de pulmão (ZHONG *et al.*, 2011). Na China, o óleo essencial de *Curcuma zedoaria* é administrado como medicamento e o germacrone, que aparece na sua formulação como um dos principais componentes, é tão importante que chega a ser considerado uma substância chave no controle de qualidade da produção deste óleo essencial (ZHAO, Y. *et al.*, 2010).

Furanodieno, o terceiro sesquiterpeno mais intenso nos extratos de semente de Pitanga, foi identificado por possuir efeitos analgésicos, efeitos anti-inflamatórios e efeitos protetores sobre lesão hepática induzida por D-galactosamina/lipopolissacarídeo ou de necrose tumoral fator-alfa. Este resultado demonstrou que furanodieno tem efeito de proteção sobre a função imunológica. O furanodieno não só tem ação antitumor direta, mas também pode ter outras atividades, tais como melhorar a função imunológica do corpo e ativar a capacidade antitumoral do próprio organismo, o que indica que furanodieno é vantajoso em comparação com as atuais drogas clínicas quimioterápicas. Ele mostra potencial para ser um agente antitumor clinicamente eficaz, devido ao seu potente efeito anticâncer e baixa toxicidade (BA *et al.*, 2009).

Para compreender de que forma as variáveis operacionais influenciam a presença de um componente isolado no extrato, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta para chegar às condições operacionais que favoreceriam o fracionamento desses compostos. A concentração destes sesquiterpenos foi determinada por normalização externa como descrito no item 4.4.3. A concentração (ppm) dos dois principais componentes presentes no extrato (germacrone e γ -elemeno) em equivalente de limoneno (EqLim) foi determinada para os 11 ensaios (Tabela 9).

Em relação ao germacrone, o diagrama de Pareto (Figura 20) mostra que a pressão e a interação entre pressão e temperatura exerceram influência significativa, ao nível de 95% de significância, na obtenção deste sesquiterpeno nos extratos. Para o γ -elemeno, pode ser observado que somente a interação entre a pressão e temperatura foi significativa.

A Tabela 14 mostra os modelos matemáticos, linear e quadrático, que relacionam o comportamento das variáveis (P e T) com a concentração de germacrone (eqs. 8 e 9) e γ -elemeno (eqs. 10 e 11) presentes nos extratos. Para o germacrone, o coeficiente de regressão para o modelo de primeira ordem é 0,80 e de segunda ordem é 0,72. Pelo valor dos coeficientes, nota-se que os modelos não têm uma boa capacidade preditiva. O mesmo pode-se dizer para os coeficientes de regressão para os modelos de γ -elemeno, os quais são 0,83 para o de primeira ordem e 0,53 para o de segunda ordem.

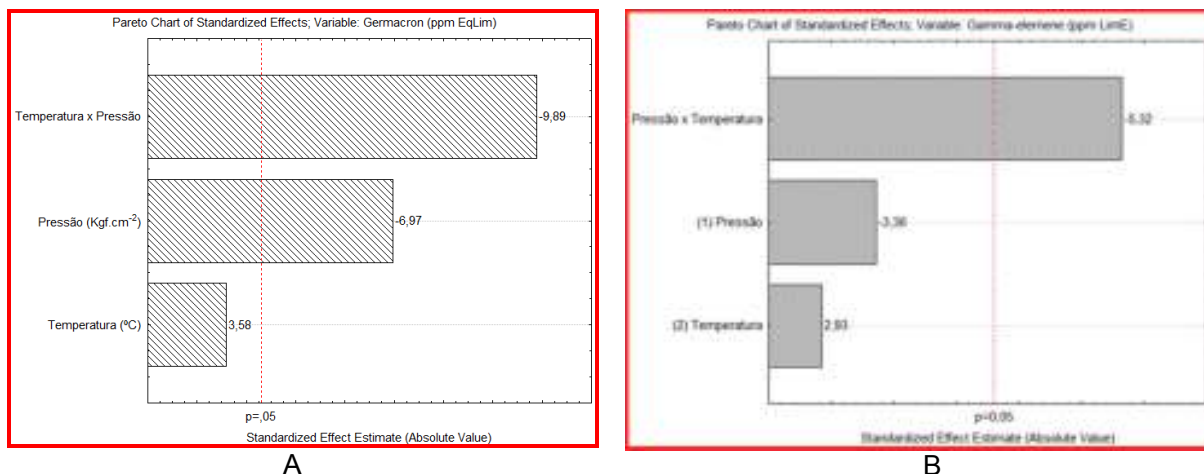


Figura 20 - Diagrama de Pareto das variáveis (P e T) estudadas na obtenção de germacrone (A) e γ -elemeno (B) nos extratos supercríticos de semente de Pitanga.

Tabela 14 - Coeficientes de regressão para modelos linear e quadrático que simulam a concentração dos sesquiterpenos (Germacrone e γ -elemeno) nos extratos de semente de Pitanga obtidos com CO₂ supercrítico.

Resposta	Coeficientes de regressão	
Concentração de Germacrone (ppm EqLim)		
Linear	$R = 18,673 - 5,615P - 7,960PT$	[8]
Quadrático	$R = 14,363 - 2,660P + 3,475P^2 - 7,960PT$	[9]
Concentração de γ -elemeno (ppm EqLim)		
Linear	$R = 21,457 - 7,185PT$	[10]
Quadrático	$R = 18,072 - 7,185PT$	[11]

Em concordância com o diagrama de Pareto e os modelos apresentados, as análises de variância (Tabelas 15 e 16) demonstram, através da comparação dos valores de F calculado (F_{calc}) e o F tabelado com 5% de probabilidade (F_{tab}), que há pelo menos uma das variáveis influenciando a concentração destes sesquiterpenos no extrato supercrítico das sementes de Pitanga já que o F_{calc} foi consideravelmente maior que o F_{tab} para os dois componentes.

Similar ao que ocorre com o germacrone, embora não se tenha modelos que consigam prever adequadamente os valores experimentais para o γ -elemeno, a análise de variância mostrou significância ao nível de 95% para os modelos linear e quadrático, como apresenta a Tabela 16.

Tabela 15 - ANOVA para os modelos de primeira e segunda ordem do DCCR com dois fatores para a concentração de germacrone (ppm EqLim) dos extratos.

Modelo linear ou de primeira ordem					
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado médio QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	509,452	2	180,241	98,762	6,94
Resíduo (r)	5,182	4	1,825		
Total (T)	514,634	6			
Modelo quadrático ou de segunda ordem					
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado médio QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	534,547	3	178,183	240,78	4,35
Resíduo (r)	5,182	7	0,740		
Total (T)	539,729	10			

F_{tabelado} com 95% de confiançaO F_{calc.} (QM_R/QM_r) maior que o F_{tab.} no nível de 95% de confiança**Tabela 16** - ANOVA para os modelos de primeira e segunda ordem do DCCR com dois fatores para a concentração de γ -elemeno (ppm EqLim) dos extratos.

Modelo linear ou de primeira ordem					
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado médio QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	410,917	1	410,917	140,87	6,61
Resíduo (r)	14,584	5	2,9168		
Total (T)	425,501	6			
Modelo quadrático ou de segunda ordem					
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado médio QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão (R)	505,239	1	505,239	311,68	5,12
Resíduo (r)	14,585	9	1,621		
Total (T)	519,824	10			

F_{tabelado} com 95% de confiançaO F_{calc.} (QM_R/QM_r) maior que o F_{tab.} no nível de 95% de confiança

Na avaliação das variáveis operacionais dos modelos de segunda ordem para a concentração dos dois sesquiterpenos, a análise da superfície de resposta indicou que, dentro da faixa estudada, altas temperaturas e baixas pressões proporcionam uma maior concentração destes voláteis nos extratos (Figura 21). Estas condições são inversas ao rendimento do extrato. Valores de alta temperatura favorecem a extração de componentes

voláteis demonstrando que, para estas situações, a influência desta variável na pressão de vapor dos componentes pode ser o fator mais importante a ser considerado na extração supercrítica, tal como pode ser visualizado na Tabela 9.

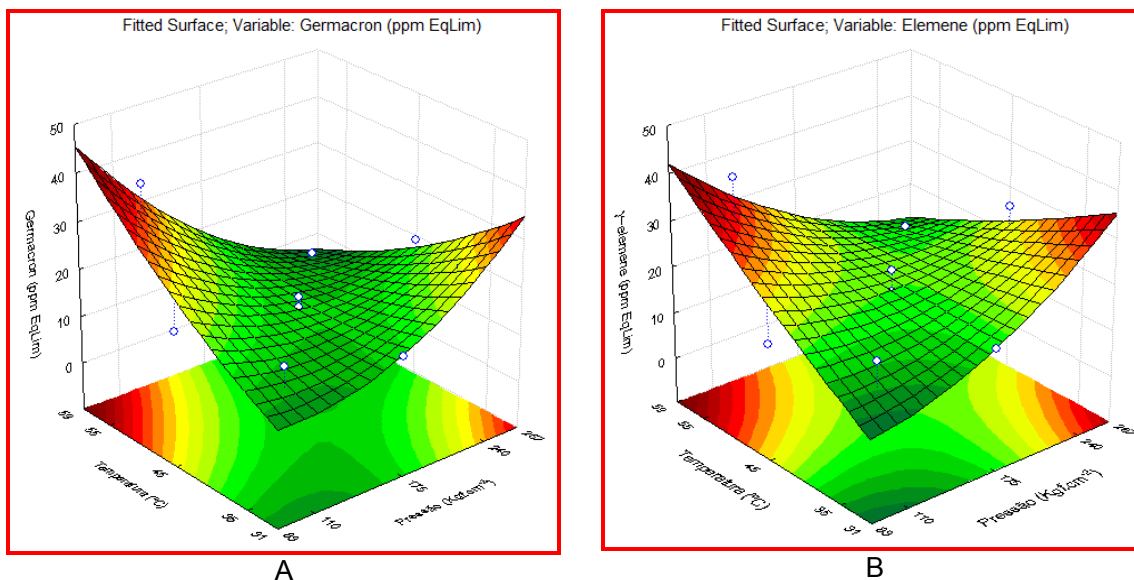


Figura 21 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que mostra os efeitos das variáveis independentes na concentração de germacrone (21.A) e γ -elemeno (21.B) nos extratos.

Embora não se possa avaliar pontualmente a influência de altos valores da temperatura e baixas densidades, já que a faixa de temperatura estudada nestes ensaios são relativamente baixas, de 30 a 60°C aproximadamente, nota-se que o experimento cuja menor densidade do CO₂ foi aplicada, foi aquela que resultou na maior concentração dos dois principais sesquiterpenos para um valor de temperatura de 55°C. Essa temperatura dentro do delineamento experimental aplicado nesse estudo é elevada, mas comparado a outros métodos de extração, como o arraste a vapor, ainda pode ser considerada branda.

Na verdade, hidrocarbonetos monoterpênicos como compostos não-polares de peso molecular relativamente baixo são muito solúveis em SC-CO₂ e, portanto, é altamente provável que eles possam ser completamente extraídos da matriz. Devido à sua alta volatilidade, no entanto, eles se separam apenas parcialmente do CO₂ gasoso e se precipitam no coletor; e uma outra parte escapa dissolvida no gás. Assim, no caso de monoterpênicos é mais correto medir a eficiência da coleta do extrato do que o rendimento de extração (BOCEVSKA; SOVOVÁ, 2007).

5.5 Análise da Bioatividade do extrato Supercrítico de Semente de Pitanga

5.5.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais

Compostos fenólicos são substâncias ativas provenientes do metabolismo secundário encontrados em muitas plantas, mas suas propriedades antioxidantes e várias outras ações biológicas específicas ainda não são bem conhecidas. Eles são empregados com frequência como antioxidantes naturais em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (PIANTINO *et al.*, 2008).

A Tabela 9 mostra os resultados da concentração de compostos fenólicos totais dos extratos supercríticos para cada ensaio baseado no DCCR. Os compostos fenólicos totais variaram de 18,08 a 73,48 ppm de GAE nos extratos. Verifica-se que os extratos obtidos têm uma quantidade considerável de compostos fenólicos totais devido a baixa polaridade que não se apresenta favorável a extração desta classe, mas quando é feita a equivalência para a massa da semente, devido ao rendimento baixo das extrações em geral, a concentração final diminui (0,010 a 0,034 mg GAE×100⁻¹ g sementes).

Neste estudo, o comportamento das variáveis estudadas (P e T) na quantidade de compostos fenólicos totais, mostra que nenhum destes fatores influenciou na extração de mais ou menos compostos fenólicos quando estas variáveis foram modificadas no processo. A não significância de cada uma destas variáveis no processo ou mesmo da interação entre elas pode ser visualizada através do diagrama de Pareto (Figura 22).

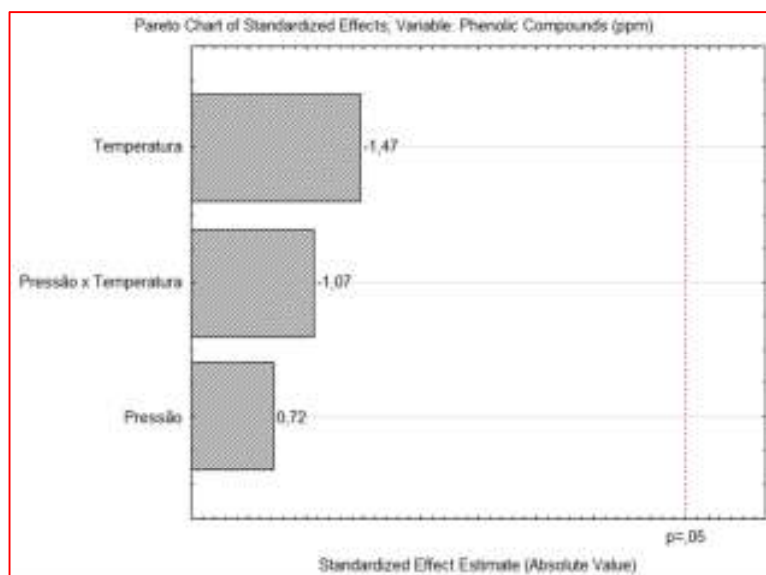


Figura 22 - Diagrama de Pareto das variáveis (P e T) estudadas na quantidade de compostos fenólicos dos extratos de semente de Pitanga.

Como era esperada, a análise de variância mostrou que não houve significância dos fatores estudados no processo ao nível de 95% do limite de confiança para ambos os modelos (dados não mostrados). Os coeficientes de determinação (R^2) calculados foram 0,50 para o modelo linear e 0,71 para o modelo quadrático e este fato indica também que os modelos gerados não possuem boa capacidade preditiva quanto ao comportamento da concentração de fenólicos totais nos extratos quando diferentes condições de T e P são empregadas no processo.

Muito do interesse dos compostos fenólicos das plantas são em flavonóides. Os flavonóides são alguns dos compostos antioxidantes mais poderosos e eficazes disponíveis para os seres humanos que são incapazes de produzi-los, por isso devem ser ingeridas a partir dos alimentos e suplementos. Vários estudos têm mostrado que a ingestão normal de flavonóides através da ingestão de uma variedade de frutas e legumes não é suficiente para manter os níveis recomendados de radicais livres sob controle (PALANISAMY *et al.*, 2008).

5.5.2 Quantificação da atividade antioxidante

O método DPPH é baseado na medição espectrofotométrica da variação da concentração de DPPH resultante da reação do DPPH• com um composto antioxidante. Durante a reação, a molécula de DPPH• com um elétron de valência desemparelhado no átomo de nitrogênio é reduzido por um átomo de hidrogênio a partir do antioxidante. A atividade antioxidante dos compostos analisados é determinada a partir da cinética desta reação (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012).

A Tabela 17 apresenta o percentual de inibição do radical DPPH• pelos diferentes extratos de semente de Pitanga. A atividade antioxidante dos extratos obtidos por EFS é baixa se comparado aos demais, pois nesse estudo utilizou-se concentrações dos extratos em até 10.000 ppm e não se chegou a 50% de atividade redutora do radical DPPH•. Os extratos supercríticos de rambutam, planta nativa do sudeste asiático, também não exibiram qualquer atividade antioxidante frente ao radical DPPH (PALANISAMY *et al.*, 2008), porém os seus resíduos quando extraídos com etanol apresentaram potencial similar aos extratos etanólicos obtidos neste trabalho. O extrato supercrítico das folhas de Pitanga também exibem uma atividade bastante reduzida frente ao radical DPPH (MARTINEZ-CORREA *et al.*, 2011). O método que avalia a atividade antioxidante pelo uso de DPPH• não é o mais adequado para os extratos obtidos por EFS, pois este radical interage mais especificamente com compostos hidrofílicos e os extratos provenientes da extração supercrítica sem modificadores são de maneira geral hidrofóbicos.

O uso do co-solvente (SC-EtOH) de fato aumentou a capacidade antioxidante deste extrato, destacando a atividade de 94,20% para a concentração de 5.000 ppm. Diferente do que seria esperado, as concentrações maiores de extrato exibem uma atividade antioxidante menor. Esse comportamento é típico de atividade pró-oxidante e faz parte do mecanismo de ação das substâncias antioxidantes. Uma vez ultrapassado a concentração antioxidante máxima, o excesso assume uma característica oposta e induz mecanismos de oxidação. Dai e Mumper (2010) afirmam que antioxidantes fenólicos se comportam como pró-oxidantes nas condições que favoreçam sua auto-oxidação, por exemplo, em pH elevado, com altas concentrações de íons de metal de transição e em presença de molécula de oxigênio. Fenólicos de cadeia curta que são facilmente oxidados, como a quercetina, ácido gálico, possuem atividade pró-oxidantes, enquanto alto peso molecular de compostos fenólicos, como taninos condensados hidrolisáveis, têm atividade pró-oxidante pouca ou nenhuma.

Tabela 17 – Atividade antioxidante dos extratos de semente de Pitanga pelo percentual de inibição do radical DPPH· em três concentrações e pelo método de varredura do radical ABTS.

Extratos	DPPH			ABTS (μM Trolox \times ppm ⁻¹ extrato)
	10.000 ppm	7.500 ppm	5.000 ppm	
SC (ensaio 1 – E1)	12,99	7,56	6,07	0,089
SC (ensaio 2 – E2)	16,99	8,17	5,94	0,074
SC (ensaio 3 – E3)	10,67	5,59	4,99	0,073
SC (ensaio 4 – E4)	21,4	17,06	5,38	0,102
SC (ensaio 5 – E5)	17,58	10,35	5,37	0,021
SC (ensaio 6 – E6)	22,29	15,23	6,68	0,117
SC (ensaio 7 – E7)	12,62	15,43	6,68	0,040
SC (ensaio 8 – E8)	11,83	13,25	6,53	0,079
SC (ensaio 9 – E9)	13,02	14,1	6,33	0,070
SC (ensaio 10 – E10)	14,45	9,99	6,71	0,073
SC (ensaio 11 – E11)	13,80	7,60	7,89	0,141
Soxhlet	35,51	34,79	14,60	0,040
SC-EtOH	19,85	24,94	94,20	0,611
SC-EtOH Purificado	13,05	11,60	34,52	0,136

Médias de três repetições; Extrato supercrítico (SC); Extrato supercrítico com etanol como co-solvente (SFE-EtOH), fração purificada do extrato supercrítico com etanol como co-solvente (SFE-EtOH Purificado).

Ultimamente, tem sido proposto que a ação pró-oxidante poderia ser um mecanismo de ação importante para as propriedades anticâncer e indução de apoptose do resveratrol.

Além disso, foi demonstrado que há uma correlação interessante entre as atividades antioxidante e pró-oxidante e citotoxicidade de polifenóis na dieta. Cada antioxidante é na verdade um agente redox (redução-oxidação) e, portanto, pode se tornar um pró-oxidante para acelerar a peroxidação lipídica e/ou induzir danos ao DNA em condições especiais. Estudos têm revelado efeitos pró-oxidantes das vitaminas antioxidantes e várias classes de polifenóis derivados de plantas, tais como flavonóides, taninos e curcumina (LASTRA; VILLEGAS, 2007).

Provavelmente, as concentrações do extrato supercrítico com co-solvente nas análises de atividade antioxidante encontravam-se na faixa de transição antioxidante/pró-oxidante já que a atividade foi menor para as maiores concentrações (Tabela 17). O extrato SC-EtOH purificado, também conservou essa característica, porém com uma capacidade antioxidante menor, 34,52%. A purificação do extrato aplicada neste trabalho foi direcionada para eliminação de taninos com alto grau de polimerização. O procedimento adotado pode, se as proporções de solvente não forem mantidas, extrair também outros compostos fenólicos. Pelo fato dos extratos obtidos com SC-EtOH certamente não possuírem elevada quantidade de polímeros com alto grau de polimerização, possivelmente outros componentes foram eliminados no processo de purificação.

A Tabela 17 apresenta os resultados dos ensaios de atividade antioxidante pelo método de varredura do radical ABTS. Os resultados expressam a quantidade, em μM , de Trolox equivalente em 1 ppm de extrato. Como pode ser observado, os extratos possuíram diferentes respostas, que variaram no extrato de 0,021 a 0,611 $\mu\text{M Trolox.ppm}^{-1}$ de extrato. Esses valores são considerados baixos quando comparados com polpas de frutas, que em estudo de Kuskoski *et al.* (2005), reportou valores de 2,0 (polpa de cupuaçu) a 67,6 (polpa de acerola) μM de Trolox equivalente para diversas polpas de frutas estudadas. Mais uma vez, o extrato obtido pela extração supercrítica com o co-solvente obteve a maior concentração de Trolox equivalente. O extrato supercrítico E5, proveniente da extração em condições brandas e com a menor densidade do fluido, foi o que apresentou a menor capacidade antioxidante.

De acordo com Wootton-Beard, Moran e Ryan (2011), pode-se identificar diferenças entre os resultados que podem ser atribuídos aos mecanismos dos próprios métodos. Em primeiro lugar, o ensaio ABTS^{•+} é uma transferência de elétrons, em que compostos antioxidantes diferentes doam um ou dois elétrons para reduzir o radical catiônico. Independentemente do potencial de doação de antioxidantes individuais, todos eles têm tempo para reagir completamente dando uma medição precisa da atividade antioxidante total no ponto final do ensaio. O ensaio de inibição do radical DPPH• é baseada na reação normal de transferência de átomo de hidrogênio que ocorre entre os antioxidantes e os radicais peroxila. Em vez de radicais peroxila, radicais de nitrogênio mais estáveis e menos

transitórios são criados, com a qual alguns antioxidantes reagem mais lentamente do que seria com o radical peroxila em um sistema biológico.

5.5.3 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato supercrítico, daquele obtido por Soxhlet, do extrato obtido pelo SC-EtOH e da sua respectiva fração purificada foi testada para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. As diluições empregadas e a metodologia seguida estão descritas no item 4.4.7 deste trabalho. Os testes aplicados tiveram por objetivo a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e sua relação com a composição dos diferentes extratos ricos em compostos terpênicos extraídos via Soxhlet ou utilizando CO₂ supercrítico ou em compostos com maior polaridade, como aqueles dos extratos provenientes da extração com co-solvente e a sua fração purificada.

A Figura 23 mostra a diluição seriada das amostras submetidas à análise da CIM, segundos após a incubação e depois de 24h. A interpretação dos resultados foi feita pela análise visual dos tubos contendo o caldo e os microrganismos comparando-os com o controle negativo, sem crescimento bacteriano.

A concentração inibitória mínima ou a mais baixa concentração onde não ocorre desenvolvimento microbiano foi de 125 ppm para todos os extratos (Tabela 18). Embora se conheça que as bactérias Gram (-) são mais resistentes à agressão de substâncias antibióticas oriundas de plantas pela complexidade maior da sua parede celular do que as bactérias Gram (+), neste trabalho não houve diferenças na atividade dos extratos aplicados entre as cepas utilizadas. Assim como no estudo realizado por Bouzada *et al.* (2009), os resultados não evidenciam a maior sensibilidade das bactérias Gram (+).



Tubos logo após a inoculação dos extratos com os micro-organismos



Tubos 24 horas após a inoculação dos extratos

Figura 23 - Diluição seriada do extrato supercrítico de semente de Pitanga para determinação da concentração inibitória mínima.

Os resultados apontaram que uma concentração dos diferentes extratos de 125 ppm é capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos testados. Alguns estudos indicam que os óleos essenciais têm uma maior atividade antibacteriana do que uma mistura de seus principais componentes. Isso porque os componentes minoritários presentes no óleo essencial são importantes para a atividade dos componentes principais, e a combinação entre eles pode produzir um efeito sinérgico. Exemplificando, cânfora e eucaliptol, componentes gerais dos óleos essenciais de muitas plantas, possuem grupos oxigenados em sua estrutura e estes grupos são responsáveis por aumentar a atividade antimicrobiana de terpenóides. Desse modo, pela composição dos óleos essenciais, as combinações de diferentes componentes bioquímicos podem aumentar a eficácia antimicrobiana distintamente (LV *et al.*, 2011).

A literatura científica divulga a CIM de alguns extratos obtidos por extração com fluido supercrítico, por exemplo, Oliveira (2010) analisou extratos supercríticos de bagaço de uva obtidos em diferentes condições de P e T e apresentou valores de CIM superiores a 500 ppm para *S. aureus* e acima de 1.000 ppm para *E. coli*. Extratos supercríticos de cogumelo

shiitake foram testados por Kitzberger (2005), em *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus*. e para os seus diferentes extratos, a menor CIM foi de 250 ppm. Outro estudo, realizado por Busatta (2006), com extrato supercrítico de orégano e manjerona não indicou atividade antibacteriana logo no teste de formação do halo de inibição. Em comparação com todos esses estudos, nota-se que os resultados encontrados com os extratos de semente de Pitanga são promissores, indicando uma alta inibição do crescimento de micro-organismos, visto que a concentração inibitória encontrada foi menor que todos os estudos referenciados.

Tabela 18 - Concentração inibitória mínima (ppm) dos diferentes extratos de semente de Pitanga.

Micro-organismos	Gram	Extratos			
		Extrato-9	Soxhlet	SC-EtOH	Purificado
<i>Escherichia coli</i>	-	125	125	125	125
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	125	125	125	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	125	125	125	125
<i>Bacillus subtilis</i>	+	125	125	125	125

Médias de 3 repetições.

Em estudo realizado por Bouzada *et al.* (2009), que utilizou extrato metanólico de folhas de Pitanga, chegou-se a altos valores de atividade antimicrobiana, com zonas de inibição de 1,9 e 2,2 cm contra *Salmonella typhimurium* e *Shigella sonnei*, respectivamente. Ao contrário do que era esperado, o extrato etanólico das folhas de Pitanga não exibiu qualquer efeito antimicrobiano contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (COUTINHO *et al.*, 2010). A divergência entre resultados oriundos de uma mesma matriz reforça a ideia de que a escolha do método de extração é crucial para a visualização de diversas atividades biológicas.

5.5.4 Determinação da inibição da enzima arginase

Na *Leishmania*, a arginase é responsável pela produção da ornitina, um aminoácido precursor de poliaminas requeridas na proliferação do parasita, desta forma a ação inibitória desta enzima age no controle desta doença.

Os extratos utilizados nestes experimentos foram: o extrato supercrítico (SC) obtido nas condições de 175 Kgf.cm⁻² e 45°C, ponto central do DCCR (Tabela 9), extrato obtido pelo método Soxhlet, extrato supercrítico em que se utilizou etanol como co-solvente (SC-

EtOH) e a fração purificada do extrato supercrítico com etanol como co-solvente (SC-EtOH Purificado) todos diluídos a 1.000 ppm em metanol. Na Tabela 19 visualiza-se a porcentagem de inibição da arginase isolada de fígado de rato e produzida da própria *Leishmania* para estes diferentes extratos determinada por ensaio espectrofotométrico.

Tabela 19 - Porcentagem (%) da atividade de inibição da arginase isolada de fígado de rato e da *Leishmania*

Arginase de fígado de rato				
Extrato	SC	SC-EtOH	SC-EtOH Purificado	Soxhlet
	14,99	42,37	23,66	33,65
Arginase de <i>Leishmania</i>				
	SC	SC-EtOH	SC-EtOH Purificado	Soxhlet
	21,01	48,48	17,93	37,59

Médias de 3 repetições.

Os resultados mostram que o extrato obtido quando etanol foi usado como co-solvente na extração supercrítica (SC-EtOH) foi o que apresentou maior atividade inibitória da arginase. Este comportamento indica que os compostos com maior polaridade, que são extraídos devido à alteração da solubilidade do CO₂ pelo etanol (solvente polar) agem com maior eficiência na inibição desta enzima. Nada se pode inferir sobre o modo de inibição da enzima, mas sabe-se que algumas substâncias conseguem se ligar ao complexo arginase-L-arginina e desse modo deslocar o íon hidróxido que é ligado ao sítio de manganês presente na enzima. O deslocamento desse íon hidróxido faz a enzima perder a sua função e dessa forma ela não consegue metabolizar a arginina (TORMANEN, 2003).

A importância da inibição da arginase pode ser vista “por dois prismas”. O primeiro é que quando esta enzima é inativada, prejudica o metabolismo vital do protozoário *Leishmania*, atividade com enfoque neste trabalho e, desse modo pode contribuir no controle da patologia causada por ele (SILVA *et al.*, 2002). Por outro lado, estudos têm mostrado que a inibição da arginase aumenta a função endotelial e diminui a pressão sanguínea em mamíferos, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas drogas que combateriam a hipertensão arterial (BAGNOST *et al.*, 2009).

Com os resultados obtidos, constata-se que o extrato supercrítico de sementes de Pitanga, principalmente aqueles obtidos quando etanol foi usado como co-solvente pode ser objeto de estudos no desenvolvimento de medicamentos que possam atuar na inibição da arginase no controle da leishmaniose e como medicamento para hipertensão.

6 CONCLUSÕES

Os extratos supercríticos de sementes de Pitanga foram caracterizados com relação a presença de alguns componentes e foram realizados testes de bioatividade cujos resultados mostram possíveis aplicações em campos diversificados. O rendimento da extração mostrou ser maior quando realizado sob altas pressões, e a não influência da temperatura indica que baixos valores desta variável podem ser usados no processo, o que não agride os componentes termolábeis, além de economizar no consumo de energia. Os compostos fenólicos apresentaram uma concentração elevada nestes extratos. Mesmo o CO₂ supercrítico não tendo afinidade pela extração de compostos polares tanto que nenhum dos fatores estudados influenciaram positiva ou negativamente na sua obtenção.

O perfil de voláteis realizado por CG/EM indicou como componentes majoritários nos extratos os sesquiterpenos γ -elemeno e germacrone, que desempenham inúmeras atividades biológicas como reporta a literatura. A presença de voláteis, terpenos, foi demonstrada previamente por CCD, que também apresentou resultados positivos para a respectiva atividade antioxidante. Assim, estes compostos apolares altamente solúveis em CO₂ supercríticos também têm esta bioatividade.

A atividade antioxidante embora presente, quantitativamente mostrou ser baixa, tanto quando analisada pelo método de inibição do radical DPPH quanto pelo ABTS. Porém, o extrato obtido quando etanol foi usado como co-solvente mostrou-se mais ativo, diferente dos demais. Ele também se destacou na inibição da arginase, com quase 50% de atividade inibidora desta enzima. Quanto ao ensaio antimicrobiano, todos os extratos, independente da polaridade do solvente de extração, obtiveram uma concentração mínima inibitória elevada, superior a muitos outros extratos supercríticos.

Frente ao exposto, nota-se que estudo da semente de Pitanga através da aplicação da tecnologia supercrítica gerou uma caracterização inovadora e que abre espaço para mais pesquisas, direcionadas a busca por resultados mais promissores.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Este grupo de pesquisa sentiu-se motivado a investigar uma matriz vegetal pouco estudada tal como é a semente de Pitanga, pertencente a uma planta com inúmeras propriedades reconhecidas pela literatura. Porém, sabe-se que numa pesquisa científica coerente, é necessário delimitar os objetivos do trabalho de modo a torná-lo executável dentro de um determinado prazo. Sendo assim, esta dissertação, que aborda o estudo dos extratos supercríticos de sementes de Pitanga apresentou resultados consistentes com os objetivos vislumbrados. Entretanto, o estudo de tais extratos será continuado, com vistas a abranger aspectos diferenciados da sua caracterização. Dessa forma, em complementação ao trabalho apresentado, ainda estão previstas análises futuras com os extratos supercríticos de sementes de Pitanga, como apontado a seguir:

- Quantificação do teor de flavonóides presentes, visto que outros estudos apontam ser este o principal grupo constituinte da fração fenólica quantificada neste estudo;
- Análise do perfil sensorial dos extratos por CG-olfatometria (*Sniffing*), onde se pretende determinar a contribuição odorífera de cada composto volátil na composição do perfil sensorial dos extratos;
- Análise de perfil de ácidos graxos, para determinar qual classe de lipídios (saturados ou polinsaturados) está presente nos extratos e
- Quantificação da atividade antioxidante pelo método do β -caroteno, que se configura como o método mais adequado para visualização desta bioatividade em extratos constituídos na grande maioria por compostos apolares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**. 4th Ed. Carol Stream: Allured books, 2009. 804p.

ADIO, A. M. Germacrenes A–E and related compounds: thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations. **Tetrahedron**, Oxford, v. 65, p. 1533–1552, 2009.

ANDRADE, C. A. *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fractions and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 715-721, 2010.

ANDRADE, C. A. S. *et al.* Comparison of the interfacial properties of *Eugenia uniflora* and *Triticum vulgare* lectins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 68, p. 7-12, 2009.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

AMORIM, A. C. L. *et al.* Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, Jena, v. 16, p. 923–928, 2009.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. AOAC International: Arlinton, 1995.

ARAUS, K.; UQUICHE, E.; del VALLE, J. M. Matrix effects in supercritical CO₂ extraction of essential oils from plant material. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 92, p. 438-447, 2009.

AURICCHIO, M. T. *et al.* Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v.26, n. 1, p. 76-81, 2007.

ASAE. **Method of Determining and Expressing Fineness of Feed. Materials by Sieving**. S319.4 American Society of Agricultural and Biological Engineers., Saint Joseph, Michigan, 2008.

BA, Z. Z. *et al.* Potential anti-cancer activity of furanodiene. **Chinese Journal of Cancer Research**, Beijing, v. 21, n. 2, p. 154-158, 2009.

BAGETTI, M. *et al.* Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2504-2510, 2009.

BAGNOST, T. *et al.* A molecular chromatographic approach to analyze the cell diffusion of arginase inhibitors. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 877, p. 1599-1602, 2009.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446–475, 2008.

BARROS, N. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização experimentos**, Campinas: Edunicamp, 1996.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Eds). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010, 948p.

BERETTA, G. *et al.* An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 55, p. 1255-1264, 2011.

BERGMEYER, H.U. ed. **Methods of enzymatic analysis**, Florida: Verlag Chemie publisher, 1985.

BERNA, A. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 18, p. 227–237, 2000.

BEZERRA, J. E. F. *et al.* Comportamento da pitangueira (*Eugenia uniflora* L) sob irrigação na região do vale do rio Moxotó, Pernambuco, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 177-179, 2004.

BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. M. Propriedades antioxidantes de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 238-241, 2010.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOCEVSKA, M.; SOVOVÁ, H. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 40, p. 360–367, 2007.

BOUSBIA, N. *et al.* Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. **Food Chemistry**, London v. 114, p. 355–362, 2009.

BOUTIN, O.; BADENS, E. Extraction from oleaginous seeds using supercritical CO₂: experimental design and products quality. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 92, p. 396–402, 2009.

BOUZADA, M. L. M. *et al.* Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil, **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 47, n. 1, p. 44–52, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRANDELLI, C. L. C. *et al.* Indigenous traditional medicine: in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, p. 1345–1349, 2009.

BRUM, L. F. W. **Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus dives*) como potenciais antioxidantes em alimentos**. 2010. 135p. Dissertação (Mestrado). Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 110p. Dissertação (Mestrado), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. 2006.

CABRAL, V. F. *et al.* Correlation of dye solubility in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 40, p. 163–169, 2007.

CASTRO, H. G. *et al.* Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de menstrato. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 55–57, 2004.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, Barking, v. 44, p. 2442–2451, 2011.

CHANG, R. *et al.* A new approach for quantifying furanodiene and curzerene. A case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* (Pitangueira) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 392–396, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Coord.) **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 279p.

COSTA, D. P. *et al.* Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 851-858, 2010.

COSTA, D. P. *et al.* Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 7, p. 1287-1293, 2009.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 26, p. 343–356, 2005.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Anti-staphylococcal activity of *Eugenia Jambolana* L. against methicillin- resistant *Staphylococcus Aureus*. **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, v. 13, p. 1405–1410, 2010.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, Switzerland, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DALL'STELLA, D. S. G. **Estudo fitoquímico aplicado da fração solúvel do extrato etanólico bruto da *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae)**. 2008. 113f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DALMOLIN, I. *et al.* Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 42, p. 797–801, 2010.

DANG, Y. Y. *et al.* Preparative isolation and purification of six volatile compounds from essential oil of *Curcuma wenyujin* using high-performance centrifugal partition chromatography. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 33, p. 1658–1664, 2010.

DANH, L. T. *et al.* Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 155, p. 617-626, 2009.

DAWIDOWICZ, A. J.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH• method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, London, v. 13, p. 1037-1043, 2012.

del VALLE, J. M. *et al.* Supercritical CO₂ processing of pretreated rosehip seeds: effect of process scale on oil extraction kinetics. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 31, p. 159–174, 2004.

DIEHL, L. C. P. **Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de própolis usando o dióxido de carbono supercrítico**. 2008. 248f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2008.

EMBRAPA. ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B. (Ed.). III Simpósio nacional do morango. II Encontro sobre pequenas frutas e Frutas nativas do Mercosul. **Documentos 171**. Pelotas, 2006.

FILHO, G. L. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from Pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 46, p. 33–39, 2008.

FLOEGEL, A. *et al.* Comparison of ABTS/ DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 24, p. 1043–1048, 2011.

GAÑÁN, N.; BRIGNOLE, E. A. Fractionation of essential oils with biocidal activity using supercritical CO₂—Experiments and modeling. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 58, p. 58–67, 2011.

GARCIA-SALAS, P. *et al.* Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, Switzerland, v. 15, p. 8813–8826, 2010.

GARMS, S.; KÖLLNER, T. G.; BOLAND, W. A multiproduct terpene synthase from *Medicago truncatula* generates cadalane sesquiterpenes via two different mechanisms. **The Journal of Organic Chemistry**, Salt Lake City, v. 75, p. 5590–5600, 2010.

GELMEZ, N.; KINCAL, N. S.; YENER, M. E. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 48, p. 217–224, 2009.

GOLMAKANI, M. T.; REZAEI, K. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Food Chemistry**, London, v. 109, p. 925–930, 2008.

GOÑI, P. *et al.* Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 116, p. 982–989, 2009.

GOODARZANIA, I.; EIKANI, M. H. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils: Modeling and simulation. **Chemical Engineering Science**, New York, v. 53, n. 7, p. 1387–1395, 1998.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, London, v. 22, p. 273–292, 2005.

HUANG, F. H. *et al.* An accurate equation of state for carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, Tokyo, v. 18, n. 6, p. 490–496, 1985.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ed, 1ed digital. São Paulo, 2008. 1020p.

JORGE, N.; LOPES, M. R. V. Avaliação de óleos e gorduras de frituras coletados no comércio de São José do Rio Preto-SP. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 14, n.2, p. 149-156, 2003.

KITZBERGER, C.S.G. **Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a alta pressão**. 2005. 142p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 34, p. 209–214, 2005.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LANGA, E. Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: Optimization of the process parameters and modelling. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 49, p. 174-181, 2009.

LAROZE, L. E. *et al.* Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 231, p. 669–677, 2010.

LASTRA, C. A.; VILLEGAS, L. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1156-1160, 2007.

LEE, C.; YOON, J. UV direct photolysis of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 197, p. 232–238, 2008.

LEE, M. H. *et al.* EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 154, p. 131-136, 2000.

LHULLIER, A. *et al.* Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection–electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1160, 13–20, 2007.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 59, n.3, p.447-450, 2002.

LUZIA, D. M. M.; BERTANHA, B. J.; JORGE. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 175-180, 2010.

LV, F. *et al.* In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, Barking, v. 44, p. 3057–3064, 2011.

MALAMAN, F. S. *et al.* Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. **Food Chemistry**, London, v. 124, p. 85-92, 2011.

MARONGIU, B. *et al.* Chemical composition of the essential oil and supercritical CO₂ extract of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. and of *Acorus calamus* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 53, p. 7939-7943, 2005.

MARQUES, A. M. *et al.* Antileishmanial activity of nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 908-914, 2011.

MARSAL, A. *et al.* Supercritical CO₂ extraction as a clean degreasing process in the leather industry. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 16, p.217–223, 2000.

MARSILI, R. (Ed). **Flavor, fragrance, and odor analysis**. New York: Marcel Dekker, 2002. 429p.

MARTINEZ-CORREA, H. A. *et al.* Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 55, p. 998-1006, 2011.

MAUL; A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, Divulgação técnica, p. 185-200, 1986.

MÉLO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, P. P. Formulação e avaliação físico-química e sensorial de geléia mista de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e acerola (*Malpighia* sp). **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 33-44, 1999.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 127–130, 2001.

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

MHEMDI, H. *et al.* A supercritical tuneable process for the selective extraction of fats and essential oil from coriander seeds. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 105, p. 609–616, 2011.

MOLYNEUX, R. J.; COLEGATE, S. M. (Eds). **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination**. 2 th Ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

OGUNWANDE, I. A. *et al.* 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. *et al.* Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, London, v. 99, p. 1–5, 2006.

OLIVEIRA, A. L.; KAMIMURA, E. S.; RABI, J. A. Response surface analysis of extract yield and flavour intensity of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) obtained by supercritical carbon dioxide extraction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 10, p. 189–194, 2009.

OLIVEIRA, D. A. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades merlot e syrah**. 2010. 211p. Dissertação (Mestrado) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

OLIVEIRA, E. L. G.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Review of kinetic models for supercritical fluid extraction. **Chemical Engineering Research and Design**, Elmsford, v. 89, p. 1104-1117, 2011.

PALANISAMY, U. *et al.* Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants. **Food Chemistry**, London, v. 109, p. 54-63, 2008.

PENEDO, P. L. M. **Estudo sobre a potencialidade da extração de produtos naturais utilizando CO₂ supercrítico**. 2007. 139p. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

PIANTINO, C. R. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 47, p. 209–214, 2008.

PINO, J. A. *et al.* Fruits volatiles of Cayena Cherry (*Eugenia uniflora* L.) from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, p. 70–71, 2003.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. (Eds). **Antioxidants in food: Practical applications**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 380p.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1163, p. 2–24, 2007.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Antimicrobial activity of Basil (*Ocimum basilicum*) oil against *Salmonella enteritidis in vitro* and in food. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, n. 6, p. 1200-1204, 2010.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

REINECCIUS, G. **Flavor chemistry and technology**. 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2006. 472p.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 38, p. 146–166, 2006.

REVERCHON, E.; DONSI, G.; SESTI, O. Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 32, p. 2721-2726, 1993.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358p.

RUFINO, M. S. M. *et al.* **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS +**. Comunicado técnico da Embrapa. Fortaleza, 2007.

SAHENA, F. *et al.* Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 95, p. 240–253, 2009.

SALGIN, U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 39, p. 330–337, 2007.

SAMEDOV, F. Laser-based optical facility for determination of refractive index of liquids. **Optics & Laser Technology**, New York, v. 38, p. 28–36, 2006.

SANTOS, A. F. *et al.* Alterações fisiológicas durante a maturação de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort**, Tegucigalpa, v. 46, p. 52-54, 2002.

SANTOS, D. N. *et al.* Terpenos na composição volátil dos extratos supercríticos da semente de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS, 8, 2011, Lima. **Anais...** Lima: CIBIA, 2011, p. 1-5.

SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A. C. (Eds). **Antimicrobial susceptibility testing protocols**. Boca Raton: CRC Press, 2007, 391p.

SERRA, A. T. *et al.* Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v.55, p.184–191, 2010.

SILVA, E. R. *et al.* Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 727–737, 2002.

SILVA, E. R. *et al.* Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 159, p. 104-111, 2008.

SILVA, E. R.; FLOETER-WINTER, L. M. Activation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase at low temperature by binuclear Mn₂₊ center formation of the immobilized enzyme on a Ni²⁺ resin. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 125, p. 152–155, 2010.

SILVA, S. M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 1, p. 1, 2006.

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

SOUZA, T. J.T. *et al.* Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007.

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

StatSoft, Inc. (2004). **STATISTICA** (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.

SUN, M.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 37, p. 397–408, 2006.

TAKEUCHI, T. M. **Extração supercrítica de macela, cravo-da-índia e vetiver: aspectos tecnológicos e econômicos**. 2009. 417f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

TORMANEN, C. D. Substrate inhibition of rat liver and kidney arginase with fluoride. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 93, p. 243–246, 2003.

TZIA, C.; LIADAKIS, G. (Eds). **Extraction optimization in food engineering**. New York: Marcel Dekker, 442p.

VASAPOLLO, G. *et al.* Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 29, p. 87–96, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis – A thin layer chromatography atlas**. Springer, London, 384p., 2009.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; R. L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, Barking, v. 44, p. 217–224, 2011.

XIA, L. *et al.* Compositional and antioxidant activity analysis of *Zanthoxylum bungeanum* seed oil obtained by supercritical CO₂ fluid extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 88, p. 23–32, 2011.

YI, C. *et al.* Effects of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1088–1094, 2010.

ZHANG, S. Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) and its anti-oxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2537–2544, 2010.

ZHAO, J. Free radical scavenging activity and characterization of sesquiterpenoids in four species of *Curcuma* using a TLC bioautography assay and GC-MS analysis. **Molecules**, v. 15, p. 7547-7557, 2010a.

ZHAO, Y. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: Formulation and bioavailability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 170–177, 2010b.

ZHONG, Z. et al. Germacrone inhibits the proliferation of breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 50–55, 2011.

ZIZOVIC, I. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, p. 338–346, 2007.