

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
DOUTORADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

GRACIANE FABIOLA DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E POTENCIAL USO DE EXTRATOS DAS FLORES DE *ACACIA MEARNSII* OBTIDOS POR ARRASTE A VAPOR E EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



**INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E POTENCIAL USO
DE EXTRATOS DAS FLORES DE *ACACIA MEARNsii* OBTIDOS POR
ARRASTE A VAPOR E EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO**

GRACIANE FABIOLA DA SILVA

ENGENHEIRA QUÍMICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Março, 2018

**INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E POTENCIAL USO
DE EXTRATOS DAS FLORES DE *ACACIA MEARNsii* OBTIDOS POR
ARRASTE A VAPOR E EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO**

GRACIANE FABIELA DA SILVA

ENGENHEIRA QUÍMICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ORIENTADOR: PROF. DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Cassel

Tese realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Porto Alegre

Março, 2018

Ficha Catalográfica

S586i Silva, Graciane Fabiela da

Investigação de atividades biológicas e potencial uso de extratos das flores de *Acacia mearnsii* obtidos por arraste a vapor e extração com fluido supercrítico / Graciane Fabiela da Silva . – 2018.

107 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas.

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel.

1. Extratos naturais. 2. *Acacia mearnsii*. 3. Arraste a vapor. 4. Extração com fluido supercrítico. 5. Compostos fenólicos. I. Vargas, Rubem Mário Figueiró. II. Cassel, Eduardo.



**INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
POTENCIAL USO DE EXTRATOS DAS FLORES DE ACACIA
MEARNSII OBTIDOS POR ARRASTE A VAPOR E EXTRAÇÃO
COM FLUIDO SUPERCRÍTICO**

CANDIDATA: GRACIANE FABIELA DA SILVA

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Rubem Mário F. Vargas

DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - ORIENTADOR

Eduardo Cassel

DR. EDUARDO CASSEL - CO-ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

Eduardo Santiago Dellacassa

DR. EDUARDO SANTIAGO DELLACASSA BELTRAME - UDELAR

Gilsane Lino von Poser

DRA. GILSANE LINO VON POSER - DA FACULDADE DE FARMÁCIA - UFRGS

Nara Regina de Souza Basso

DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA - PUCRS

Após eliminarmos o impossível, o que restar, mesmo que improvável, faz parte da solução e da verdade. (Arthur Conan Doyle)

AGRADECIMENTOS

Aos professores Rubem Vargas e Eduardo Cassel, meus orientadores, agradeço todo o apoio e confiança. Agradeço todo o conhecimento técnico-científico que me transmitiram. Em especial ao Rubem, agradeço por nos momentos mais difíceis dessa jornada usar a motivação ao invés da cobrança.

À minha família agradeço o inventivo e apoio incondicional. Ao meu amor, Maicon A.P. Marques, agradeço pelo companheirismo, paciência e amparo.

Sou grata a toda equipe do LOPE, pois sem ela não seria possível o desenvolvimento do trabalho. Agradeço em especial à colaboração, disposição e solicitude da prof^a Aline Lucas, cuja participação foi fundamental nas análises executadas, Alexandre Timm, Ana Luisa Fianco, Caroline Finkler.

Aos colegas do LANAGRO-RS, em especial à Louise Janke e ao Fabiano Barreto, por possibilitarem as análises por LC-qTOF-MS e LC-MS/MS. Ao Lucas S. Barnett pelo apoio e amizade e ao Diego Fontana de Andrade e à Ana Laura Bemvenuti por serem um exemplo e inspiração frente às dificuldades da dupla jornada trabalho x doutorado.

A todos meus amigos (que perguntavam “e o doutorado?”) pela compreensão.

A todos que de alguma maneira contribuíram com meu aprendizado e com a realização desse trabalho.

À Tanac S.A. pelo fornecimento das flores utilizadas nesse trabalho e à CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	7
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE SÍMBOLOS	15
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1. <i>Acacia</i>	22
3.2. Compostos fenólicos	25
3.2.1. Flavonoides	25
3.3. Atividade antioxidante	26
3.4. Processos de extração de produtos naturais	27
3.4.1. Destilação por arraste a vapor	27
3.4.2. Extração com fluido supercrítico	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Planta	34
4.2. Testes preliminares: identificação e caracterização de flavonoides na planta	34
4.3. Obtenção dos extratos	35
4.3.1. Destilação por arraste a vapor	35
4.3.2. Extração com fluido supercrítico	36
4.3.3. Modelagem matemática	38
4.3.3.1. Modelo 1	38
4.3.3.2. Modelo 2	39
4.4. Determinação da atividade antioxidante do extrato aquoso	42
4.4.1. Determinação da EC50 - método do DPPH	42

4.4.2. Capacidade Antioxidante Total (CAT)	42
4.5. Determinação de compostos fenólicos totais no extrato aquoso	43
4.6. Determinação de flavonoides totais no extrato aquoso	43
4.7. Análise de compostos fenólicos no extrato aquoso por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	44
4.8. GC-MS do óleo essencial	45
4.9. Avaliação olfatométrica do óleo essencial	46
4.10. Separação cromatográfica de compostos do extrato obtido com fluido supercrítico	48
4.10.1. Cromatografia líquida de alta eficiência	48
4.10.2. Cromatografia em coluna	48
4.10.3. Cromatografia em camada delgada.....	51
4.11. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato obtido com fluido supercrítico	51
5. RESULTADOS	53
5.1. Testes preliminares – reações para a identificação de flavonoides.....	53
5.2. Atividade Antioxidante do extrato aquoso.....	55
5.2.1. Determinação da EC50 - método do DPPH.....	55
5.2.2. Capacidade antioxidante Total (CAT).....	56
5.3. Determinação de compostos fenólicos totais no extrato aquoso	57
5.4. Determinação de flavonoides totais no extrato aquoso	58
5.5. Análise de compostos fenólicos no extrato aquoso por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	58
5.6. GC-MS do óleo essencial	63
5.7. Avaliação olfatométrica do óleo essencial	65
5.8. Otimização do rendimento da extração com fluido supercrítico	68
5.9. Modelagem matemática do processo de extração com fluido supercrítico	72
5.9.1. Curva de extração - modelo 1	72
5.9.2. Curva de extração - modelo 2	72
5.10. Separação de constituintes do extrato obtido com fluido supercrítico	73
5.10.1. Separação cromatográfica de compostos do extrato obtido com fluido supercrítico.....	78
5.11. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato obtido com fluido supercrítico	81

6. CONCLUSÃO	85
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	87
8. REFERÊNCIAS	88
ANEXOS.....	100
ANEXO A: LISTA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO ACACIA RELATADOS NA LITERATURA.	101
ANEXO B: TESTES PRELIMINARES - EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO 103	
ANEXO C: RODA DE AROMAS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. a) Estrutura química geral dos flavonoides; b) estrutura química dos principais tipos de flavonoides.....	26
Figura 3.2. Diagrama de fases de uma substância pura. (Adaptado de TAYLOR, 1996).....	29
Figura 3.3. Diagrama da densidade do CO ₂ (kg.m ⁻³) em função da pressão e temperatura (MUKHOPADHYAY, 2000).	31
Figura 4.1. Diagrama do processo de destilação por arraste a vapor (SILVA, 2016).35	
Figura 4.2. Fluxograma do processo de extração supercrítica (CASSEL <i>et al.</i> , 2010).36	
Figura 5.1. Reação de Shinoda.	53
Figura 5.2. Reação com cloreto de alumínio: à esquerda, com cloreto de alumínio, à direita, o extrato bruto.....	54
Figura 5.3. Reação com cloreto férrico: à esquerda, o extrato bruto; à direita, o extrato com cloreto férrico 2 %.	54
Figura 5.4. Reação com hidróxido de sódio.	55
Figura 5.5. Curva concentração da solução de DPPH x absorvância.....	56
Figura 5.6. Concentração do extrato aquoso x absorvância após consumo do DPPH.56	
Figura 5.7. Concentração de rutina x absorvância.....	57
Figura 5.8. Concentração de ácido tânico x absorvância.....	58
Figura 5.9. Concentração de quercetina x absorvância.	58
Figura 5.10. a) TIC do extrato aquoso das flores de <i>A. mearnsii</i> onde: (1) rutina, (2) quercetina; b) TIC do padrão rutina.....	62
Figura 5.11. Gráfico aranha para os odores com FM > 50% no óleo essencial das flores de <i>A. mearnsii</i>	66
Figura 5.12. Superfície de resposta para o rendimento da extração em função das variáveis (codificadas) pressão e cossolvente (% EtOH).....	70

Figura 5.13. Curvas de nível para o rendimento da extração em função das variáveis (codificadas) pressão e cossolvente (% EtOH).	71
Figura 5.14. Curva de rendimento da extração – modelo de Crank.	72
Figura 5.15. Curva de rendimento da extração – modelo de Sovová.	73
Figura 5.16. Cromatograma do extrato 1 (P= 120 bar, cossolvente: água).	74
Figura 5.17. Cromatograma do extrato 2 (P= 120 bar, cossolvente: etanol).	75
Figura 5.18. Cromatograma do extrato 3 (P= 240 bar, cossolvente: água).	75
Figura 5.19. Cromatograma do extrato 4 (P= 240 bar, cossolvente: etanol).	76
Figura 5.20. Cromatograma do extrato 5 (P= 180 bar, cossolvente: etanol:água).	76
Figura 5.21. Cromatograma do extrato 6 (P= 180 bar, cossolvente: etanol:água).	77
Figura 5.22. Cromatograma do extrato 7 (P= 180 bar, cossolvente: etanol:água).	77
Figura 5.23. CCD após fracionamento em coluna do extrato 5 (revelador: vanilina sulfúrica).	78
Figura 5.24. Cromatograma da fração acetato de etila.	79
Figura 5.25. CCD após fracionamento da fração extraída com acetato de etila (revelador: vanilina sulfúrica).	80
Figura 5.26. Cromatograma da fração 4 (fase móvel 40% hexano : 60% acetato de etila).	80
Figura 5.27. Cromatograma da fração 5 (fase móvel 20% hexano : 80% acetato de etila).	81
Figura 5.28. CCD das frações após separação em coluna com gradiente de Hexano/Acetato de etila (revelador: vanilina sulfúrica).	81
Figura 5.29. Teste de CIM com a fração acetato de etila.	82
Figura 5.30. Teste de CIM com a fração 2.	83
Figura 5.31. Teste de CIM com a fração 4.	83

- Figura A.1. CCD de extratos supercríticos obtidos a diferentes pressões: 90 = extrato a 90 bar; 1 = 120 bar; 2= 150 bar; 3 = 200 bar; 4 = 250 bar (todos sem cossolvente); revelador: FeCl_3 ; as marcações à lápis indicam as “manchas” observadas sob luz U.V..... 103
- Figura A.2. CCD extratos supercríticos obtidos a diferentes pressões: 90 = extrato a 90 bar; 1 = 120 bar; 2= 150 bar; 3 = 200 bar; 4 = 250 bar (todos sem cossolvente); revelador: Anisaldeído..... 104
- Figura A.3. Roda de aromas para chás*. 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Delineamento experimental das extrações supercríticas.	38
Tabela 4.2. Relação das fases móveis e suas respectivas proporções utilizadas na cromatografia em coluna – etapa 2.	50
Tabela 4.3. Relação das fases móveis e suas respectivas proporções utilizadas na cromatografia em coluna – etapa 3.	50
Tabela 5.1. Compostos fenólicos prováveis no extrato aquoso das flores de <i>A. mearnsii</i> correspondentes às massas determinadas por LC-qTOF-MS.	59
Tabela 5.2. Análise Cromatográfica GC-MS do óleo essencial.....	64
Tabela 5.3. Compostos do óleo essencial identificados por GC-MS e olfatométrica.	66
Tabela 5.4. Análise de variância para o rendimento (% m/m).....	68
Tabela 5.5. Efeitos e coeficientes estimados para o rendimento (% m/m).....	69
Tabela 5.6. Rendimento experimental e calculado das extrações com fluido supercrítico.	70
Tabela 5.7. Áreas percentuais cromatográficas do composto eluído em 10,6 min... ..	79
Tabela 5.8. Concentrações inibitórias mínimas dos extratos supercríticos e de suas frações.	82
Tabela A.1. Compostos relatados na literatura para extratos de <i>Acacia</i> não identificados no extrato aquoso da <i>A. mearnsii</i>	101
Tabela A.2. Condições de extração e atividade antioxidante dos extratos supercríticos.	104

LISTA DE SÍMBOLOS

a_0	Área superficial	m^{-1}
CO	Cossolvente	
C_s	Concentração de soluto na fluido adjacente à partícula	$kg.m^{-3}$
C_∞	Concentração de soluto na fase fluida	$kg.m^{-3}$
D	Coeficiente de difusão	$m^2.s^{-1}$
E	Erro aleatório	
e	Massa de extrato relativa a N	
F	Frequência de detecção de um aroma	%
FM	Frequência modificada	%
h	Altura do leito	m
h	Coordenada axial	m
I	Intensidade média aromática	%
J	Taxa de transferência de massa	$kg.s^{-1}.m^{-3}$
K	Massa de soluto inacessível contido no interior das partículas sólidas	kg
k	Coeficiente de proporcionalidade – modelo de Crank	$m.s^{-1}$
k_f	Coeficiente de transferência de massa da fase fluida	$m.s^{-1}$
k_s	Coeficiente de transferência de massa da fase sólida	$m.s^{-1}$
L	Parâmetro do modelo de Crank	
l	Semi-espessura da folha	m
M_t	Massa acumulada	g
M_∞	Massa extraída em um tempo infinito	g
N	Massa da fase sólida isenta de soluto	kg
n	Número de átomos de carbono de cada alcano normal da mistura	
O	Massa inicial de soluto na fase sólida	kg
P	Massa de soluto de fácil acesso	kg
P	Pressão	bar
p	Nível descritivo p-valor	
Q	Vazão de solvente	$g.s^{-1}$
q	Quantidade específica de solvente	
q_m	Quantidade específica de solvente no início da extração do interior das partículas	

q_n	Quantidade específica de solvente ao final da extração de soluto de fácil acesso	
q_0	Concentração inicial de extrato na fase sólida	kg.kg^{-1}
\dot{q}	Taxa de massa de solvente em relação a N	s^{-1}
RE	Rendimento da extração supercrítica	% m/m
RI	Índice de retenção	
t	Tempo de extração	s
tR_x	Tempo de retenção ajustado do composto x	min
tR_z	Tempo de retenção ajustado de alcanos de cadeia normal	min
u	Velocidade superficial do solvente	m.s^{-1}
x	Fração de soluto na fase sólida (base livre de soluto)	
x_0	Concentração inicial de soluto livre na fase sólida (fração mássica)	
X_k	Variáveis independentes (fatores)	
x_k	Concentração inicial de extrato no interior das partículas sólidas (fração mássica)	
x_p	Concentração de soluto facilmente acessível (fração mássica)	
Y	Resposta observada	
y	Fração de soluto na fase fluida (base livre de soluto)	
y_r	Solubilidade do extrato no solvente	
W	Parâmetro do modelo de Sovová para o período de extração lenta	
Z	Parâmetro do modelo de Sovová para o período de extração rápida	
z_w	Coordenada de contorno entre a extração rápida e lenta	
α	Nível de significância	
β_k	Parâmetros ajustáveis do modelo de regressão linear	
β_n	Parâmetro do modelo de Crank	
ε	Porosidade do leito	
ρ	Densidade do solvente	kg.m^{-3}
ρ_s	Densidade da fase sólida	kg.m^{-3}

RESUMO

SILVA, Graciane Fabiela. **Investigação de atividades biológicas e potencial uso de extratos das flores de *Acacia mearnsii* obtidos por arraste a vapor e extração com fluido supercrítico**. Porto Alegre. 2018. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A *Acacia mearnsii*, apesar de ser amplamente cultivada e utilizada industrialmente, não tem o potencial de suas flores explorado. Considerando a disponibilidade de flores da *A. mearnsii* e o crescente interesse por produtos naturais, esse trabalho consistiu na obtenção de extratos destas flores e na investigação de suas composições e ações bioquímicas. A pesquisa compreendeu a extração do óleo essencial e a obtenção do extrato aquoso de flores da planta via destilação por arraste a vapor, além da extração com fluido supercrítico. O óleo essencial foi analisado por GC-MS e apresentou, entre os 31 compostos identificados, 8-heptadeceno, heptadecano, nonadecano e caureno como compostos majoritários. Na análise olfatométrica (GC-O), os principais aromas detectados no óleo essencial foram café, doce, floral, vegetal e refrescante, com destaque para “castanha/defumado”. O extrato aquoso das flores da *A. mearnsii* apresentou atividade antioxidante superior à da rutina. Utilizando cromatografia de alta resolução (LC-qTOF/MS), foram verificados 42 prováveis compostos fenólicos, entre eles, quercitrina, naringenina, miricetina, rutina, robinetina. Os extratos obtidos via extração supercrítica e frações isoladas apresentaram atividade frente a *S. aureus*. O rendimento da extração supercrítica foi otimizado utilizando planejamento fatorial e parâmetros da transferência de massa foram obtidos através de modelos matemáticos que representam a curva de extração. Assim, concluiu-se que as flores de *A. mearnsii* podem ser exploradas pelos processos extrativos empregados nesse estudo a fim de gerar um co-produto da cadeia produtiva da planta, uma vez que o óleo essencial e o extrato aquoso, obtidos pela extração por arraste a vapor a 2,0 bar, possuem, respectivamente, potencial aromático e poder antioxidante, enquanto o extrato obtido com fluido supercrítico apresenta ação antibacteriana.

Palavras-Chaves: *Acacia mearnsii*, extratos naturais, compostos fenólicos, antioxidante, antibacteriano.

ABSTRACT

SILVA, Graciane Fabiela. **Potential use and biological activities investigation of *Acacia mearnsii* flowers extracts obtaining by steam distillation and supercritical fluid extraction.** Porto Alegre. 2018. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Although the *Acacia mearnsii* tree is widely cultivated and used in the industry, its flowers are seldom researched. Considering the extensive availability of *A. mearnsii* flowers and the growing interest in natural products, this work aimed at the obtainment of extracts from these flowers and investigation of their composition and biochemistry properties. In this work, essential oil and aqueous extract by steam distillation and extracts were obtained with supercritical fluid. The essential oil was characterized by CG-MS and olfactometry. The main compounds identified in the essential oil were 8-heptadecene, heptadecane, nonadecane e kaurene. The main aroma detected by olfactometric analysis was roast nutty, as well as coffee, sweet, floral, vegetal and spicy. Antioxidant activity was determined and the aqueous extract showed an activity superior to rutin standard. LC-qTOF-MS identified 42 likely phenolic compounds, such as quercitrin, naringenin, myricetin, rutin, and robinetin. The extracts obtained by supercritical extraction and isolated fractions presented activity against *S. aureus*. The yield of the supercritical extraction was optimized using factorial planning and mass transfer parameters were obtained through mathematical models that represent the extraction curve. Thus, it was concluded that the flowers of *A. mearnsii* can be exploited by extractive processes used in this study to generate a plant by-product. The results indicate the aromatic and antioxidant potential of the essential oil and aqueous extract, respectively, obtained with 2.0 bar steam distillation, while the supercritical extract has antibacterial action.

Key-words: *Acacia mearnsii*, natural extracts, phenolics compounds, antioxidant, antibacterial.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Acacia* pertence à família *Mimosaceae*, a qual compreende mais de mil espécies, dentre elas *Acacia mearnsii* De Wild. A espécie é cultivada nos 5 continentes (WEBB *et al.*, 1980), sendo estimada uma plantação superior a 500 mil hectares, destacando-se como maiores produtores Brasil e África do Sul (TURNBULL *et al.*, 1998).

O interesse pela *A. mearnsii* deve-se principalmente ao uso de sua casca do caule pela indústria de taninos vegetais (BOLAND *et al.*, 1984). Além do aproveitamento dos extratos da casca, a madeira é utilizada em diversos fins (GONZAGA *et al.*, 1982), inclusive pelas indústrias de celulose (MARTINS *et al.*, 1983), e a planta também é indicada para a recuperação de solos, pois promove a fixação de nitrogênio (CARPANEZZI, 1998).

Outras espécies de *Acacia* também são cultivadas com diferentes propósitos. Entre eles, pode-se citar a extração de diversos metabólitos secundários, tais como cumarinas, taninos, glicosídeos cianogênicos, alcaloides e esteroides (ANDRADE, 2003). Devido à ação biológica desses compostos, diferentes espécies de *Acacia* são tradicionalmente utilizadas no tratamento de patologias, como, por exemplo, asma, diarreias e hemorroidas.

Devido à ação dos metabólitos secundários, os primeiros medicamentos usados pelo ser humano foram à base de plantas. Ainda hoje, elas são uma fonte de grande importância para a descoberta de novos fármacos candidatos ao tratamento de uma variedade de doenças que ameaçam a saúde humana (ORHAN *et al.*, 2006). Em função disso, e devido à ampliação do interesse farmacêutico por moléculas bioativas de plantas e popularização de medicamentos fitoterápicos, a necessidade do estudo de compostos naturais e métodos para sua obtenção é crescente (DINIZ *et al.*, 2007).

Dessa forma, considerando a disponibilidade local e mundial da *A. mearnsii*, o interesse por produtos naturais, bem como as atividades biológicas de outras

espécies já exploradas do gênero *Acacia*, esse trabalho consistiu na obtenção e na investigação da composição e das propriedades de extratos das flores de *A. mearnsii*. Assim, para contribuir com a minimização de rejeitos oriundos do plantio da acácia, a pesquisa compreendeu a extração do óleo essencial e extrato aquoso das flores através da destilação por arraste a vapor. O óleo foi investigado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e por cromatografia olfatométrica (GC-O). O extrato aquoso, por sua vez, foi submetido a testes de atividade antioxidante, além de ter sua composição química investigada através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-qTOF-MS e LC-MS/MS). Sabendo que diferentes técnicas de extração, seja devido às suas condições operacionais ou devido aos diferentes solventes utilizados, produzem extratos com características distintas, foi estudada também a extração com fluido supercrítico. Essa etapa consistiu no estudo da modelagem matemática da cinética do processo extrativo e testes da ação antimicrobiana do extrato. Além disso, foi empregado planejamento fatorial para a avaliação da interferência de variáveis de processo a fim de otimizar a extração supercrítica.

2. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo identificar compostos e propriedades de extratos das flores de *Acacia mearnsii*. Espera-se que os resultados deste trabalho possam ser o ponto de partida para que esse material, até então pouco estudado, possa futuramente se transformar em um co-produto das cadeias produtivas que utilizam as demais partes da planta *A. mearnsii* como matéria-prima.

2.1. Objetivos específicos

- Obtenção e caracterização de compostos extraídos por meio de destilação por arraste a vapor. Essa etapa envolveu a obtenção de dois diferentes extratos: óleo essencial e extrato aquoso. O óleo foi submetido a análises cromatográficas para investigação de sua composição e avaliação olfatométrica. O extrato aquoso, por sua vez, foi submetido a testes de atividade antioxidante e foi investigada sua composição química através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

- Extração com fluido supercrítico, otimização do rendimento da extração por planejamento de experimentos e modelagem matemática do processo, seguida da avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Acacia*

O gênero *Acacia* (família *Mimosaceae*) compreende cerca de 1200 – 1300 espécies (TURNBULL *et al.*, 1998), sendo as principais espécies utilizadas *A. mangium*, *A. saligna*, *A. senegal* e *A. mearnsii*. Entre os usos dessas espécies, pode-se citar a extração de polpa de celulose, a madeira para movelaria e construção, matéria-prima para compensados, combustível, controle de erosão, etc. A *Acacia mearnsii* De Wild é uma espécie conhecida no Brasil como acácia-negra ou mimosa. A espécie é de origem australiana, onde é denominada *black wattle*, e é cultivada na Nova Zelândia, sul, centro e leste da África, Índia, América Central, América do Sul, Europa e Indonésia (WEBB *et al.*, 1980). Os principais países plantadores são a África do Sul e o Brasil, sendo que Turnbull e colaboradores (1998) estimaram a existência mundial de 500 mil hectares de plantações.

O interesse pela *A. mearnsii*, surgiu, inicialmente, pela sua madeira, a qual era utilizada como material para construções leves e como combustível. Devido às suas propriedades, sua casca passou a servir como matéria-prima para o curtimento de peles e, então, *A. mearnsii* tornou-se, mundialmente, a principal fonte de casca para a indústria de taninos vegetais (BOLAND *et al.*, 1984). A Tanac S.A. é maior unidade de produção de extratos vegetais tanantes do mundo e está localizada no Rio Grande do Sul, Brasil. Com isso, a área total de *Acacia* no país era de 148,311 mil ha em 2012, segundo dados do Anuário Estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, sendo a terceira espécie florestal mais plantada no Brasil, atrás apenas das espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* (ABRAF, 2013). Segundo dados da Tanac (201-), no Rio Grande do Sul já são plantados 170 mil hectares de florestas de acácia.

Diferentemente da maioria das espécies florestais utilizadas em plantações comerciais, *A. mearnsii* é historicamente reconhecida pela qualidade de sua casca e é uma das melhores espécies em termos de rendimento por árvore e de qualidade do tanino extraído (composição e coloração). A partir da casca, são obtidos os extratos vegetais, ricos em taninos, largamente utilizados no curtimento de peles e que representam o mais conhecido grupo de produtos obtidos a partir da casca. Também são obtidos os floculantes, utilizados em processos de tratamento de águas; os dispersantes, usados como aditivos nos processos onde é necessária a aspersão de líquidos; os adesivos e resinas, a base fenólica, destinadas principalmente às indústrias que utilizam madeiras e os componentes destinados à produção de agentes anti-corrosivos. Os resíduos da extração dos taninos, cinzas da caldeira e cascas esgotadas, por sua vez, podem ser misturados com outros materiais orgânicos e compostados, sendo posteriormente utilizados na agricultura.

No Brasil, a plantação de acácia-negra tem uma característica multifuncional, pois tem uma ação recuperadora nos solos de baixa fertilidade, através da fixação de nitrogênio; ela permite a agricultura e a criação de gado no seu interior, além do uso da casca e da madeira para fins industriais (MEDRADO; CARVALHO, 1998). Carpanezi (1998) comparou oito espécies com potencial de recuperação ambiental e destacou a acácia-negra. Considerou como sendo uma espécie que apresenta o perfil ideal, pois é uma espécie pioneira de vida curta, que cobre rapidamente o terreno. Não é invasora agressiva nem rebrota de cepa ou raiz e não inibe a sucessão local. Além disso, enriquece o solo devido à elevada deposição de folhas ricas em nitrogênio e sua madeira é utilizada em diferentes finalidades (GONZAGA *et al.*, 1982). Tonietto & Stein (1997) mencionam que a madeira é utilizada na indústria de celulose, madeira aglomerada e como lenha na secagem de grãos e fumo, padarias e olarias, além do uso doméstico. Martins *et al.* (1983) concluíram que a madeira de acácia-negra é matéria-prima de boa qualidade para a produção de celulose kraft, com rendimentos, propriedades óticas e físico-mecânicas adequadas. Dunlop e colaboradores (2000) citam que no processo kraft, para cada metro cúbico de madeira, *A. mearnsii* produz 323 quilos de celulose, enquanto que, o *Eucalyptus grandis* produz 224 quilos. Com relação à composição química da madeira, a acácia-negra apresenta cavacos que são deslignificados mais facilmente, resultando em rendimentos levemente superiores em polpa celulósica.

Apesar dos diversos usos da *A. mearnsii*, ainda não foi explorado o potencial de suas flores, as quais se encontram disponíveis em grandes quantidades devido ao plantio extenso da espécie. Diversos metabólitos secundários como as cumarinas, taninos, glicosídeos cianogênicos, alcaloides e esteroides foram verificados no gênero *Acacia*, sendo os flavonoides o grupo químico predominante neste gênero (ANDRADE, 2003). Sendo assim, é possível que as flores contenham metabólitos secundários de interesse. Até a execução desse trabalho, não foram encontrados dados na literatura sobre extratos obtidos das flores da *A. mearnsii*, apesar de diversas espécies de *Acacia* serem tradicionalmente utilizadas para o tratamento de várias patologias.

Na Somália utiliza-se a goma da *A. tortilis* como medicamento contra a asma, conhecido como Qurac, os ativos foram encontrados como sendo quracol A, quracol B e fisetinidol (HAGOS; SAMUELSSON, 1988). A *Acacia nilotica* é utilizada para tratamentos de enfermidades do trato respiratório, diarreias e hemorroidas, devido às suas propriedades tônicas, adstringentes e estimulantes (NABI *et al.*, 1992). *Acacia mellifera* e *A. kirkii* são utilizadas no tratamento do câncer. Na amenorreia é empregada a *A. pentagona*. Em crises asmáticas é utilizada *A. polyantha*. Na esquistossomose é empregada a raiz da *A. robusta* (CHHABRA *et al.*, 1990). As sementes da *A. concinna* são utilizadas para o tratamento de doenças da pele (SEKINE *et al.*, 1997). Efeito antimicrobiano foi verificado com extratos de diversas espécies de *Acacia*. Extratos de *A. koa* demonstraram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (BUSHNELL *et al.*, 1950) e da *A. robusta* contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (KHAN, *et al.*, 1980). Extratos da *A. angustifolia* inibiram o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans* (HOFFMANN *et al.*, 1993). O extrato metanólico das cascas da *A. senegal* inibiu o desenvolvimento de *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* e da *Candida albicans* (KHAN *et al.*, 2000).

Atividades anti-helmínticas foram verificadas com o extrato metanólico da *A. auriculiformis* (GHOSH *et al.*, 1993, 1996; BABU *et al.*, 1997; SARKAR *et al.*, 1998). A fração butanólica do extrato desta planta, testada em camundongos, apresentou potencial efeito antidepressivo (SAHAI *et al.*, 1980). Inibição de proteínas quinase C em cérebros de ratos foi verificada com os derivados da catequina extraídos da *A. melanoxylon* (POLYA & FOO, 1994).

Propriedades anti-inflamatórias, pela inibição da ciclooxigenase, foram observadas com a *A. rehmanniana* (GRAW *et al.*, 1997). Atividade antitumoral foi observada com extratos aquosos da *A. decurrens* (OLIVEIRA, 1972), com a *A. pennatuia* (POPOCCA *et al.*, 1998) e com a *A. laeta* (NASSAR, 1999). Forte efeito antioxidante para variados ensaios foram demonstrados com as cascas da *A. confusa* (TZEN *et al.*, 2001). Forte efeito alelopático foi verificado para a *A. confusa* com estudos realizados por Chou (1980). Além desses exemplos, há uma vasta gama de atividades biológicas relacionadas a compostos oriundos de espécies do gênero *Acacia*, muitos exemplos são listados no trabalho de Andrade (2010).

Entre os compostos já relatados em espécies de *Acacia*, são citados aminas, aminoácidos não-proteicos, alcaloides, glicosídeos cianogenéticos, óleos essenciais, esteroides, terpenoides, saponinas, quinonas, gomas, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis. Segundo os trabalhos de revisão realizados por Andrade *et al.* (2003), Seigler (2003) e Meera *et al.* (2005), as principais substâncias identificadas em espécies de *Acacia* contêm núcleo fenólico.

3.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas (KING, 1999). Destacam-se entre os metabólitos secundários das plantas, sendo amplamente variados e distribuídos no reino vegetal, e sua importância está relacionada a inúmeras atividades biológicas, tais como antibacteriana, antioxidante, citotóxica e alelopática (DUROUX *et al.*, 1998; JUSTESEN & KNUTHESE, 2001; SEIGLER, 2003). Entre os compostos fenólicos, os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis são os principais antioxidantes de fonte natural (ANGELO & JORGE, 2007).

3.2.1. Flavonoides

Os flavonoides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídios ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular,

consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆ (HARBORNE, 1999).

A estrutura química dos flavonoides, apresentada na Figura 3.1-a, consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C. Substituições no anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanois (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas (Figura 3.1-b). Já as substituições nos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada uma dessas classes de flavonoides (HOLLMAN, 1999).

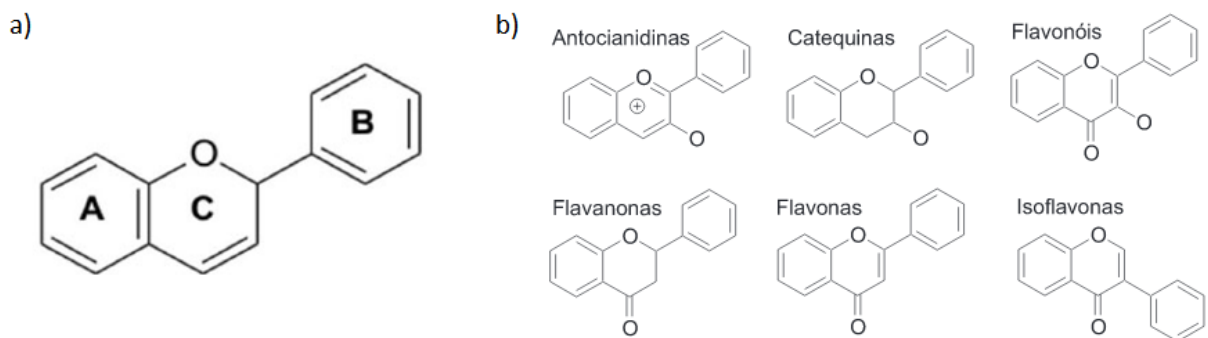


Figura 3.1. a) Estrutura química geral dos flavonoides; b) estrutura química dos principais tipos de flavonoides.

Os flavonoides, assim como outros compostos fenólicos, têm propriedades benéficas que podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres (DECKER, 1997).

Os flavonoides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, dessa forma, inibem as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (HARTMAN & SHANKEL, 1990; ARORA *et al.*, 1998).

3.3. Atividade antioxidante

Segundo Sies & Stahl (1995), antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz.

Os mecanismos de defesa baseados na ação antioxidante ocorrem para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos decorrentes da produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos (SIES, 1993).

Os radicais livres podem causar um grande número de desordens celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Dessa forma, influenciam tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, desordens respiratórias, doenças neurodegenerativas, diabetes melitus, aterosclerose, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas, carcinogênese e mutagênese (ANDERSON & PHILLIPS, 1999; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2000; AL-MAMARY *et al.*, 2002; YORBIK *et al.*, 2002, GÜLCIN *et al.*, 2003; CHANWITHEESUK *et al.*, 2005).

Assim, devido às suas ações benéficas, é crescente o interesse e a procura por antioxidantes naturais, obtidos a partir das plantas. Seu uso ocorre tanto pelas indústrias farmacêuticas, como também alimentícias e cosméticas (DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005; BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

3.4. Processos de extração de produtos naturais

3.4.1. Destilação por arraste a vapor

A destilação por arraste a vapor é o principal método de extração na obtenção de óleos essenciais a partir de plantas aromáticas (CASSEL *et al.*, 2009; ÖZEK, 2012). Esse é o processo tradicionalmente utilizado pela indústria, pois é barato quando comparado a outras tecnologias e é simples, sendo facilmente colocado em operação para baixas capacidades (CASSEL & VARGAS, 2006; MATEUS *et al.*, 2006).

A destilação por arraste a vapor consiste na vaporização a temperaturas inferiores das de ebulição de cada um dos componentes voláteis dos óleos essenciais de plantas aromáticas através do efeito de uma corrente direta de vapor da água. Por apresentarem pressão de vapor superior à pressão de vapor da água, as substâncias voláteis acabam arrastadas (SIMÕES & SPITZER, 2003). Esse processo se baseia no fato de que o óleo e a água formam uma mistura de líquidos imiscíveis e então, segundo a Lei de Dalton, a pressão de vapor da mistura a qualquer temperatura é maior que a pressão de vapor de qualquer componente

puro. Assim, o ponto de ebulição da mistura é a temperatura na qual a soma das pressões parciais dos vapores dos componentes da mistura equivale à pressão atmosférica. Em decorrência disso, no processo com vapor d'água, a temperatura de ebulição da mistura é menor que a temperatura de ebulição da água, ou seja, é possível extrair componentes de elevado ponto de ebulição em temperatura inferior a 100 °C em operação à pressão atmosférica (WANKAT, 1998).

Devido à imiscibilidade entre a água e os óleos essenciais, a destilação por arraste a vapor pode ser considerada um tipo de destilação azeotrópica, onde o solvente é a água e a separação ocorre entre voláteis e não voláteis. Dessa forma, atingido o estado de mistura azeotrópica, o ponto de ebulição da mistura permanece constante durante a extração dos componentes. Desse modo, apenas um estágio é suficiente, sendo o processo geralmente operado em batelada (WANKAT, 1998).

O equipamento para o processo é constituído basicamente por uma caldeira, um vaso de extração, um condensador e um separador líquido-líquido, conhecido como vaso florentino. A caldeira gera o vapor, o qual permeia o leito formado pelo material vegetal contido no vaso de extração. Ao entrar em contato com a planta, o vapor a aquece, e entra em contato com os órgãos secretores que contêm o óleo essencial. Com isso, os compostos voláteis são vaporizados e solubilizados no vapor circundante, sendo arrastados para o topo do vaso extrator. Em seguida, a mistura óleo essencial e vapor de água passa à forma líquida em um condensador, geralmente do tipo casco e tubo ou serpentina. Por fim, no vaso florentino, ocorre a separação da fase óleo e da fase água, devido à diferença de densidade e à imiscibilidade das fases (CASSEL & VARGAS, 2006).

3.4.2. Extração com fluido supercrítico

A extração supercrítica é definida como a utilização de fluido supercrítico para remover analitos seletivamente a partir de matrizes sólidas, semi-sólidas e líquidas. As principais propriedades dos fluidos supercríticos relacionadas aos processos de extração são oriundas da combinação de propriedades semelhantes aos líquidos e outras semelhantes aos gases. Entre elas destacam-se o poder de solvatação, a difusividade relativamente alta, a baixa viscosidade, além de tensão superficial mínima. Em comparação com a extração líquida, a extração supercrítica apresenta as vantagens de ser, geralmente, mais rápida; o solvente é mais fácil de

ser removido; a pressão, bem como a temperatura e a natureza do solvente, podem ser utilizadas para selecionar, até certo ponto, os compostos a serem extraídos, tornando-a mais seletiva. Com isso, a extração com fluido supercrítico é uma alternativa para reduzir o tempo de trabalho e o uso de produtos nocivos envolvidos na extração, como, por exemplo, metanol, diclorometano, hexano, entre outros (CASTRO, 2004; TAYLOR, 1996).

Os fluidos supercríticos foram observados pela primeira vez em 1822, quando Baron Cagniard de La Tour descobriu o chamado ponto crítico. Em seus experimentos, ele verificou que para cada substância existe uma temperatura abaixo da qual a condensação para líquido (ou evaporação até um gás) é possível através de uma variação de pressão. Porém, acima dela estes processos não ocorrem; essa é a temperatura crítica. Já a pressão crítica é a pressão mais elevada na qual um líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido ou um gás transformado em líquido através de diminuição da temperatura. Uma substância acima da temperatura crítica (T_c) e da pressão crítica (P_c), ou seja, que ultrapassa o ponto crítico, só pode existir na forma de fluido, não sendo possível diferenciar as fases líquido e gás, conforme está representado no diagrama de fases da Figura 3.2. (CLIFFORD, 1999; TAYLOR, 1996).

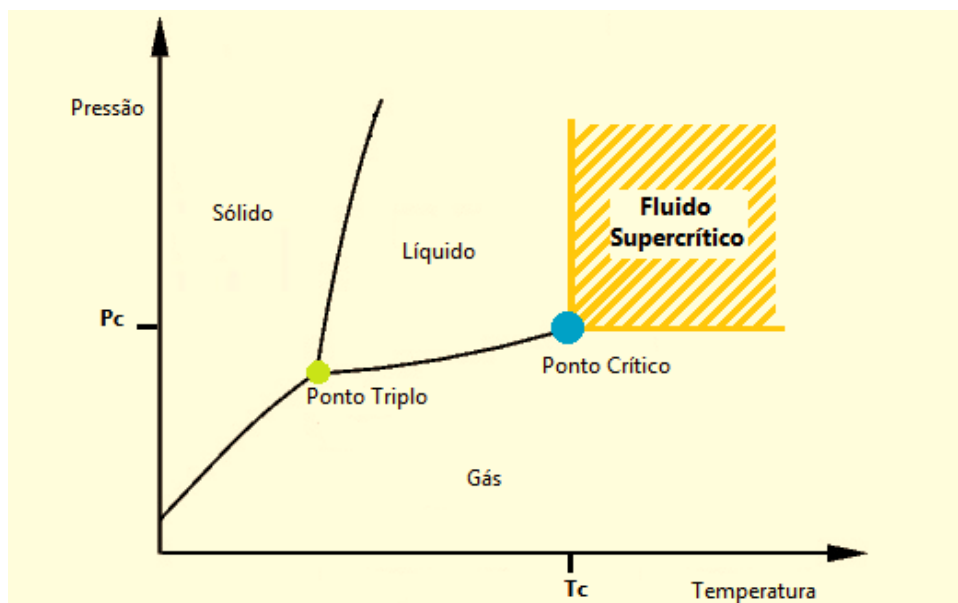


Figura 3.2. Diagrama de fases de uma substância pura. (Adaptado de TAYLOR, 1996).

Em função da preocupação existente com a toxicidade do meio de extração, com o solvente residual e com a estabilidade térmica de materiais, o CO₂ supercrítico destaca-se como uma importante ferramenta na indústria de alimentos e farmacêutica. Nas extrações com fluido supercrítico, o dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais utilizado, o qual apresenta baixos valores de temperatura crítica (31,1°C) e pressão crítica (73,8 bar). Também apresenta as vantagens de não ser tóxico e ser mais seguro do que solventes comuns utilizados em procedimentos de extração clássicos; não é inflamável, é menos dispendioso do que os solventes líquidos, é encontrado disponível em estado de elevada pureza e pode ser reciclado. Além disso, embora o CO₂ seja apolar, quando utilizado em extração supercrítica sua polaridade pode ser manipulada pela adição de pequenas quantidades de um cossolvente, tal como o metanol (CASTRO, 2004; TAYLOR, 1996).

O processo de extração supercrítica tem como equipamentos básicos um compressor ou bomba de alta pressão, dois trocadores de calor, vaso de extração, válvula de expansão e vaso separador. Para a extração, o solvente pode estar inicialmente no estado gasoso ou líquido, sendo pressurizado por compressor ou bomba de alta pressão, respectivamente. Em seguida, sua temperatura é aumentada através de um pré-aquecedor e, assim, o fluido atinge o estado supercrítico e é alimentado no vaso extrator. Quando se soma ao processo o uso de cossolvente, ele é bombeado de um reservatório para um vaso de mistura localizado antes do pré-aquecedor. Nesse vaso ocorre a homogeneização com o solvente. Após a extração, a mistura solvente (e cossolvente) e extrato passam pela válvula de expansão; a pressão é reduzida bruscamente e o solvente passa para o estado gasoso, separando-se do extrato, que precipita no vaso separador (CASSEL *et al.*, 2008).

Nesse processo, a seletividade e o rendimento da extração dependem do ajuste adequado de parâmetros, entre os quais se destacam pressão, temperatura, cossolvente, e, o de maior efeito, a vazão de solvente. O aumento da capacidade de extração por incremento da vazão é maior do que o incremento obtido pela variação dos demais parâmetros do processo (MUKHOPADHYAY, 2000). O poder de solvência do fluido supercrítico está diretamente relacionado à densidade, a qual varia em função da pressão e da temperatura, cuja relação pode ser visualizada na Figura 3.3.

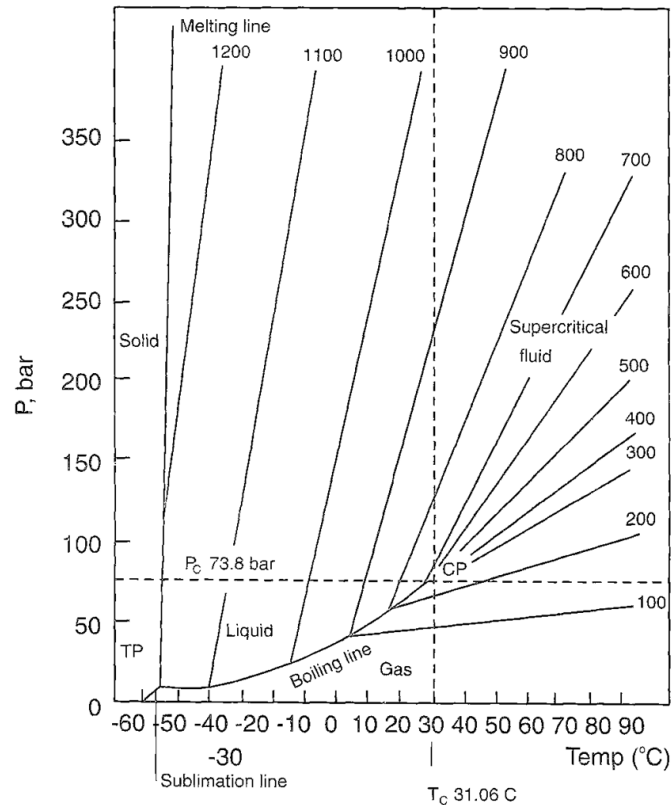


Figura 3.3. Diagrama da densidade do CO₂ (kg.m⁻³) em função da pressão e temperatura (MUKHOPADHYAY, 2000).

À temperatura constante, a taxa de extração aumenta com o aumento da densidade. Maiores temperaturas também promovem maiores taxas de extração, exceto se a pressão estiver próxima do ponto crítico, caso em que ocorre um comportamento retrógrado da solubilidade. De uma forma geral, o aumento da pressão (à temperatura constante) aumenta a capacidade de solubilização do fluido supercrítico (CASSEL *et al.*, 2008; MUKHOPADHYAY, 2000).

Já a adição de cossolvente, está relacionada à ideia da interação com um ou mais componentes resultando maior solubilidade de determinado composto no fluido supercrítico, ou seja, contribuindo para uma melhor seletividade. Geralmente o cossolvente aumenta a polaridade e poder de solubilização do solvente em determinada condição de temperatura e pressão. Além do efeito no poder de solvatação, os cossolventes também têm importante ação nas matrizes, em que o analito se liga fortemente através de quimissorção e fisissorção. No caso de utilização de um modificador polar, uma vantagem é o inchaço da matriz, pois assim há aumento do volume interno, o que, por sua vez, aumenta a área de superfície acessível aos solventes supercríticos (MUKHOPADHYAY, 2000).

Em função dos diferentes efeitos das variáveis relacionadas a extração com fluido supercrítico, diversos autores utilizam o planejamento de experimentos para a avaliação desses efeitos e otimização do processo. O planejamento de experimentos é uma ferramenta que se destaca pela avaliação do efeito das interações de fatores, pois, diferentemente do método tentativa e erro, um conjunto de fatores tem seus níveis variados simultaneamente (SHARIF *et al.*, 2014).

Os efeitos da pressão e temperatura do fluido supercrítico na extração do óleo de canola foi investigado por um planejamento fatorial 2^2 por Pederssetti (2008) em dois cenários: utilizando CO_2 supercrítico e propano pressurizado. Nos dois casos, o planejamento fatorial foi utilizado para avaliar a influência da pressão e da temperatura do fluido no rendimento da extração (razão entre massa de óleo extraído e massa de CO_2 ou propano). O estudo verificou que para a extração com CO_2 a pressão e a interação temperatura-pressão tinham um efeito significativo. Já para a extração com propano, apenas a temperatura apresentou incremento significativo sobre a resposta, ao tempo que a pressão e a interação, entre temperatura e pressão, não foram significativas. Isso demonstra como os mesmos parâmetros do processo podem gerar efeitos variados. A otimização da extração supercrítica de um cloridrato de amina também foi investigada com relação aos parâmetros pressão e temperatura (BICKING, 1992). Nesse estudo, a temperatura foi avaliada de 55 a 125°C e a pressão de 130 a 290 atm, o melhor rendimento foi obtido para baixa temperatura e alta pressão.

Outro aspecto relevante no estudo da cinética da extração com fluido supercrítico é a aplicação de modelos matemáticos consistentes com a operação. A modelagem matemática das curvas de extração tem sido investigada por vários autores (SOVOVÁ, 2005; REIS-VASCO, 2000; REVERCHON, 1996; SOVOVÁ, 1994) e é uma ferramenta que permite determinar parâmetros do processo, sendo importante na predição, otimização e *scale-up* da extração. Em função disso, muitos modelos são propostos na literatura. De um modo geral, há modelos empíricos, modelos baseados na transferência de massa em uma única fase do processo (fase fluida ou partícula sólida), modelos que consideram a transferência em ambas as fases, modelos estabelecidos por analogia ao transporte de calor e combinações entre eles. Entretanto, como a curva de extração pode variar conforme as condições de extração, tipo de produto obtido, tipo de matéria-prima, solvente utilizado, forma geométrica do extrator e estrutura vegetal do material usado na extração, não há um

modelo que possa ser considerado aplicável a qualquer fenômeno de transferência de massa, cada modelo considera diferentes características de um determinado processo (GASPAR *et al.*, 2003; CASSEL *et al.*, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

As flores de *A. mearnsii* foram fornecidas pela empresa Tanac S.A., sendo coletadas no município de Piratini – RS (31°17'51”S, 53°13'29”W) em setembro (primavera) de 2016. Todas as flores foram secas em estufa.

4.2. Testes preliminares: identificação e caracterização de flavonóides na planta

Para os testes de reações para identificação de flavonóides, 2 g de flores secas foram submersos em 30 mL de etanol a 75% e aquecidos em banho-maria por 5 minutos (COSTA, 2001). Em seguida, o extrato foi filtrado com papel filtro e submetido aos testes descritos a seguir:

- **Reação de Shinoda** – em um tubo de ensaio, foi adicionada uma pitada de magnésio metálico em pó e, então, foram adicionados 5 mL do extrato. Após, foi acrescentado 1 mL de ácido clorídrico e observada a mudança de coloração (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).
- **Reação de cloreto de alumínio** – sobre um papel filtro, foram demarcadas duas áreas A e B. Em cada uma delas, foi depositada uma gota do extrato. Após a secagem, foi adicionada 1 gota de solução de cloreto de alumínio 5% em etanol e aguardou-se a eliminação do etanol. Então, o comportamento das substâncias foi analisado mediante sua exposição à luz ultravioleta (COSTA, 2001).
- **Reação com cloreto férrico** - o extrato foi diluído em 2 tubos de ensaio com água na proporção 1:5. Em seguida, em apenas um dos tubos foram adicionadas gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 2% e então,

após a reação, comparou-se com o extrato bruto (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

- **Reação com hidróxido de sódio** - o extrato foi diluído com água, em um tubo de ensaio, na proporção 1:5. Posteriormente, foram adicionadas gotas de NaOH 5% e observada a mudança de coloração (COSTA, 2001).

4.3. Obtenção dos extratos

4.3.1. Destilação por arraste a vapor

Os extratos foram obtidos através do processo de destilação por arraste a vapor utilizando a unidade piloto do equipamento existente no Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da Faculdade de Engenharia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. O equipamento (Figura 4.1) é constituído basicamente por uma caldeira, um vaso de extração, um condensador e um separador líquido-líquido, conhecido como vaso florentino.

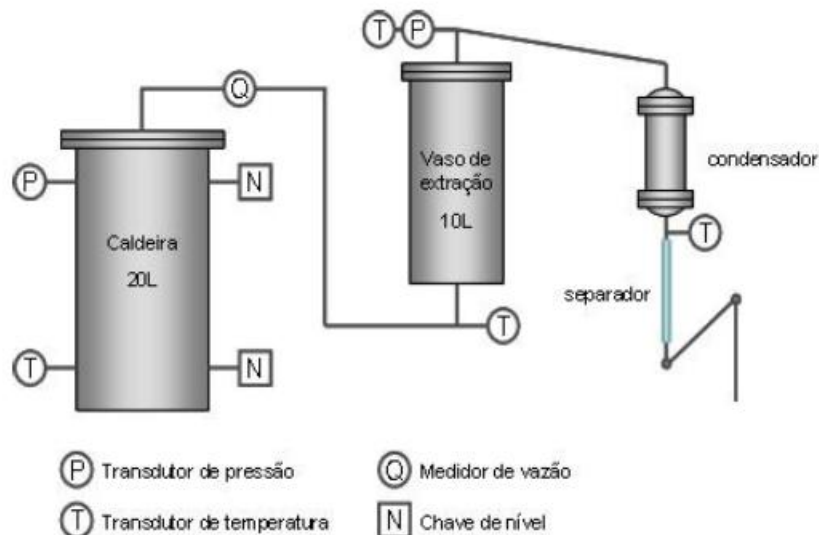


Figura 4.1. Diagrama do processo de destilação por arraste a vapor (SILVA, 2016).

As flores (400g) foram depositadas no vaso de extração e o óleo essencial foi extraído por vapor de água, sendo o processo conduzido a uma pressão de 2 bar, por 1 hora, tempo suficiente para o esgotamento da planta. Após a

extração, foi recolhido também o resíduo de vapor condensado no interior do vaso de extração, o qual foi denominado extrato aquoso. O teor de sólidos contidos no extrato aquoso era $22,8 \text{ mg.mL}^{-1}$, o qual foi determinado gravimetricamente, evaporando todo o líquido.

4.3.2. Extração com fluido supercrítico

As extrações com fluido supercrítico foram realizadas na unidade piloto do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da PUCRS (CASSEL *et al.*, 2011). O equipamento, representado pelo fluxograma da Figura 4.2, é constituído por dois cilindros com CO_2 , o qual, no estado líquido, passa por um condensador (C1) para evitar sua vaporização devido a diferença de temperatura entre o ambiente e a tubulação e é pressurizado através de uma bomba de alta pressão Maximator[®] G35 (P1). Após, o CO_2 segue por um pré-aquecedor (W1) para que atinja o estado supercrítico e, então, o fluido supercrítico é alimentado no vaso de extração (B1) que contém a matriz vegetal. O equipamento conta com vasos de 100 mL, 500 mL e 1000 mL. O CO_2 no estado supercrítico solubiliza os extratos presentes na matriz vegetal e, em seguida, a mistura CO_2 -extrato passa por uma válvula micrométrica Hoke[®]-Micromite[®] 1600 (VC1) onde o CO_2 se expande e tem sua vazão mássica determinada por um sensor Siemens[®] Sitrans F C Massflo[®] Mass 6000. A válvula micrométrica é aquecida por resistências elétricas para que assim seja evitado o congelamento do solvente na etapa de despressurização devido ao efeito Joule-Thomson. O extrato, já separado do solvente que passa para a fase gasosa durante a expansão, é coletado no vaso separador (B2). O equipamento conta ainda com uma bomba para cossolvente, *software* de monitoramento e controle automatizado.

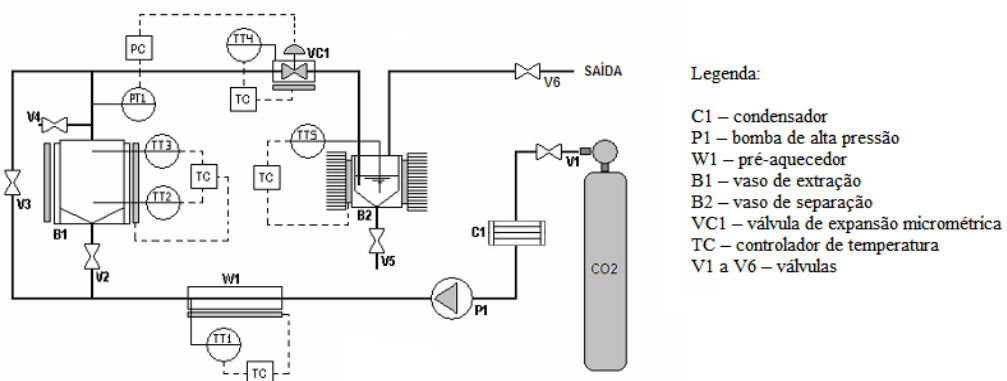


Figura 4.2. Fluxograma do processo de extração supercrítica (CASSEL *et al.*, 2010).

As extrações foram realizadas em vaso de 500 mL utilizando CO₂ com vazão de 800 g.h⁻¹. Em cada procedimento foram utilizados 80 g de flores secas de *A. mearnsii*. Testes preliminares, nos quais variaram-se pressão, temperatura e cossolvente e avaliou-se a atividade antioxidante são apresentados no Anexo B.

A fim de promover a extração de compostos polares, tais como compostos fenólicos, utilizou-se como cossolvente água, etanol e uma mistura etanol:água (50% v/v). Para avaliar o efeitos desses cossolventes e da pressão do CO₂ no rendimento da extração, optou-se por um planejamento fatorial 2² para o delineamento experimental, no qual duas variáveis são testadas em dois níveis. A Tabela 4.1 apresenta os níveis das variáveis codificadas e os valores experimentais.

Como, geralmente, a relação entre variáveis independentes e resposta é desconhecida, o primeiro passo para investigar essa relação é o uso de uma regressão linear de primeira ordem (SHARIF *et al.*, 2014). O modelo de primeira ordem segue a equação abaixo:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + E \quad (4.1)$$

Onde Y é a resposta observada, β_0 , β_1 , ..., β_k , são parâmetros desconhecidos, X_1 , X_2 , .. X_k , são variáveis independentes (fatores) e E representa o erro aleatório. O planejamento fatorial é um dos possíveis delineamentos para o ajuste desses modelos de primeira ordem. A partir da equação do modelo, é possível gerar uma superfície de resposta. A avaliação dos efeitos das variáveis e de suas interações é feita por meio da análise de variância (ANOVA) (MONTGOMERY & RUNGER, 2003).

No planejamento adotado, em todas as extrações foram adicionados 3% de cossolvente água ou etanol, correspondendo às extremidades -1 e 1 do planejamento, respectivamente, sendo o ponto central a mistura composta por 50% etanol : 50% água (v/v). A pressão do CO₂ foi avaliada a 120, 180 e 240 bar; a temperatura da extração foi fixada em 40°C para todas as extrações. As repetições no ponto central foram definidas para serem executas em triplicata, sendo importantes para estimar o erro experimental e para verificar o ajuste do modelo de primeira ordem.

Tabela 4.1. Delineamento experimental das extrações supercríticas.

Extração	Variáveis codificadas		Valores das variáveis	
	Pressão	Cossolvente	Pressão	Cossolvente
1	-1	-1	120	H ₂ O
2	-1	1	120	Etanol
3	1	-1	240	H ₂ O
4	1	1	240	Etanol
5	0	0	180	Solução (50% H ₂ O : 50% etanol)
6	0	0	180	Solução (50% H ₂ O : 50% etanol)
7	0	0	180	Solução (50% H ₂ O : 50% etanol)

4.3.3. Modelagem matemática

A modelagem da curva de extração supercrítica, para a obtenção dos parâmetros do fenômeno de transferência de massa, foi realizada utilizando-se dois modelos, aqui denominados modelo 1 (Crank, 1975) e modelo 2 (Sovová, 1994), os quais são apresentados a seguir.

4.3.3.1. Modelo 1

O modelo 1, desenvolvido a partir da Segunda Lei de Fick, admite a difusão em uma única partícula na forma de placa plana, e considera que o transporte do soluto para a vizinhança ocorre junto à superfície externa da partícula. Esse modelo descreve o comportamento do leito como um todo através da transferência de massa em uma única partícula, o que é uma hipótese simplificada do processo. Com isso, o modelo considera a transferência de massa junto ao contorno da partícula escrita como:

$$-D \frac{\partial C}{\partial x} = k(C_0 - C_s) \quad (4.2)$$

Na expressão acima, D é a difusividade do soluto através da matriz vegetal, k é coeficiente de proporcionalidade, C_s é a concentração real do soluto no interior da partícula e C_0 é a concentração do soluto necessária para estabelecer o equilíbrio

com o ambiente vizinho. Sendo a espessura da placa limitada por $-l \leq x \leq l$ e com concentração inicial uniforme, a solução da Segunda Lei de Fick para a condição de contorno da equação 4.2, para transferência em ambas as superfícies da placa, é dada por (Crank, 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2 L^2 \exp\left(-\beta_n^2 D \frac{t}{l^2}\right)}{\beta_n^2 (\beta_n^2 + L^2 + L)} \quad (4.3)$$

Onde β_n são as raízes positivas de:

$$\beta_n \tan \beta_n = L \quad (4.4)$$

e

$$L = \frac{l k}{D} \quad (4.5)$$

Assim, a equação 4.3 expressa a quantidade de soluto (M_t) extraída da folha até o tempo t como uma fração em relação à quantidade total extraída (M_∞) em um intervalo de tempo infinito.

4.3.3.2. Modelo 2

O modelo 2 foi proposto por Sovová (1994) e considera que a extração do soluto com CO_2 supercrítico pode ser dividida em períodos. O modelo considera que o soluto contido nos vegetais é protegido pelas paredes das células, as quais, em parte, são rompidas no processo de moagem, ficando o soluto disponível na superfície das partículas. Assim, em um primeiro período da extração, Sovová considera que é extraído apenas o soluto de fácil acesso, o qual tem contato direto com o solvente. Em uma segunda etapa, é extraído tanto soluto de fácil acesso oriundo das células rompidas como o soluto de difícil acesso, dependendo da região do leito considerada. Por fim, na terceira etapa, há apenas soluto de difícil acesso, contido no interior das partículas. Assim, a massa de óleo inicialmente presente na fase sólida (O) é composta pela massa de soluto facilmente acessível (P) e massa de soluto inacessível contido no interior das partículas sólidas (K). A massa relativa à

fase sólida isenta de soluto (N) é constante durante a extração e relaciona as concentrações iniciais de soluto:

$$x(t = 0) = x_0 = \frac{O}{N} = x_p + x_k = \frac{P}{N} + \frac{K}{N}$$

O modelo considera ainda que o solvente é isento de soluto e que escoar axialmente em um extrator cilíndrico contendo um leito constituído por planta moída. O tamanho das partículas e sua concentração inicial de soluto são considerados homogêneos. Outra hipótese é de que a pressão e a temperatura no leito são constantes.

O balanço de massa na fase sólida e na fase fluida, para um elemento do leito, é descrito pelas equações 4.7 e 4.8, respectivamente.

$$-\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (4.7)$$

$$\rho \varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + \rho u \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y) \quad (4.8)$$

Onde ρ_s é a densidade da fase sólida, ε é a porosidade do leito, x é a fração de soluto na fase sólida, expressa em base livre de soluto, y é fração de soluto na fase fluida, em base livre, J é a taxa de transferência de massa, ρ é a densidade da fase fluida, u é a velocidade superficial do solvente, t é o tempo de extração e h é a coordenada na direção axial.

As equações são resolvidas negligenciando o primeiro termo da equação 4.8 e considerando as condições:

$$x(h, t = 0) = x_0 \quad (4.9)$$

$$y(h = 0, t) = 0 \quad (4.10)$$

Além disso, Sovová considera também que $J(x, y)$ é função da diferença de concentração e utiliza um coeficiente local de transferência de massa para cada fase. Em razão da suposição de soluto de fácil e de difícil acesso, a massa de

extrato (e) relativa à N varia dependendo do período da extração e tem a solução de acordo com a equação 4.11.

$$e = \begin{cases} qy_r[1 - \exp(-Z)] & q < q_m \\ y_r[q - q_m \exp(z_w - Z)] & q_m \leq q < q_n \\ x_0 - \frac{y_r}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(W \frac{x_0}{y_r} - 1 \right) \exp[W(q_m - q)] \frac{x_k}{x_0} \right] \right\} & q \geq q_n \end{cases} \quad (4.11)$$

Onde:

$$q = \frac{Q t}{N} \quad (4.12)$$

$$q_m = \frac{(x_0 - x_k)}{y_r Z} \quad (4.13)$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(W x_0 / y_r)}{x_0} \quad (4.14)$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{y_r}{W x_0} \ln \frac{x_0 \exp[W(q - q_m)] - x_k}{x_0 - x_k} \quad (4.15)$$

$$Z = \frac{k_f a_0 \rho}{\dot{q}(1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (4.16)$$

$$W = \frac{k_s a_0}{\dot{q}(1 - \varepsilon)} \quad (4.17)$$

Nas equações acima, y_r é a solubilidade, Z e W são parâmetros ajustáveis para o período rápido e para o lento, respectivamente, e são diretamente proporcionais aos coeficientes de transferência de massa de cada fase. q é a quantidade específica de solvente, e os subscritos m e n correspondem ao início da extração do interior das partículas e fim da extração de soluto de fácil acesso, respectivamente, enquanto \dot{q} representa a taxa de massa de solvente em relação a N. O termo z_w corresponde à coordenada de contorno entre a extração rápida e lenta (obtido pela relação $z = k_f a_0 h / u$); a área específica é representada por a_0 ; k_f

e k_s são os coeficientes de transferência de massa das fases fluida e sólida, respectivamente.

4.4. Determinação da atividade antioxidante do extrato aquoso

4.4.1. Determinação da EC50 - método do DPPH

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) foi utilizado na avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso, o qual se baseia na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (RUFINO *et al.*, 2007). A partir de uma solução padrão de DPPH $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi preparada uma curva de calibração contendo 0, 10, 20, 30, 40, 50 e $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do radical DPPH. Para a determinação da atividade antioxidante, 0,1 mL de diferentes diluições do extrato aquoso, resultando concentrações finais, no volume de reação, equivalentes a 6, 11, 29 e 57mg.L^{-1} de sólidos totais contidos no extrato aquoso, foram adicionados a 3,9 mL da solução padrão de DPPH $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Como controle foi utilizado 0,1 mL de etanol em vez de extrato aquoso. Também foram testados 0,1 mL de soluções padrão de rutina e ácido gálico, cujas concentrações finais, no volume de reação, foram de 12,5 e 50g.L^{-1} , respectivamente.

Após o tempo de reação de 1 hora, foram lidas as absorvâncias a 515 nm em espectrofotômetro Shimadzu 1601. A função entre absorvância e concentração foi obtida por regressão linear e, através dessa equação, foi possível obter a concentração de extrato necessária para se reduzir à metade a concentração inicial de DPPH (EC50).

4.4.2. Capacidade Antioxidante Total (CAT)

A determinação da capacidade antioxidante total (CAT) foi realizada através do método de complexação pelo fosfomolibdênio (PRIETO *ET AL.*, 1999; FERRARI, 2002). Em um tubo de ensaio foram adicionadas alíquotas de 0,3 mL do extrato aquoso ou de solução padrão de rutina, 3,0 mL de uma mistura compreendida de ácido sulfúrico ($0,6 \text{mol.L}^{-1}$), fosfato monobásico de sódio ($0,028 \text{mol.L}^{-1}$) e molibdato de sódio ($0,004 \text{mol.L}^{-1}$). Os tubos foram cobertos com papel alumínio e aquecidos em banho-maria a 95°C por 90 min. Após a etapa de

aquecimento, as amostras foram deixadas em repouso até atingirem a temperatura ambiente e, então, a absorvância foi lida a 695 nm em espectrofotômetro Shimadzu 1601. A curva de calibração foi preparada com rutina nas concentrações de 300 a 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e a capacidade antioxidante total foi expressa em equivalentes de rutina (μg de rutina por μg de sólidos totais contidos no extrato aquoso).

4.5. Determinação de compostos fenólicos totais no extrato aquoso

O método escolhido para a análise da concentração de compostos fenólicos totais foi o método de Folin-Ciocalteu (FOLIN & CIOCALTEU, 1927), utilizando como padrão o ácido tânico. Em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 75 mL de água destilada, 0,1 mL do extrato aquoso ou de soluções padrão de diferentes concentrações de ácido tânico, 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu, 5,0 mL de uma solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v). O volume do balão volumétrico foi completado com água destilada e a solução agitada. Os balões permaneceram em repouso em local protegido da luz por 30 min. A quantificação foi realizada comparando as leituras do extrato aquoso, em comprimento de onda de 658 nm, com uma curva de ácido tânico com concentrações variando de 0 a 4,0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalentes de ácido tânico (mg de ácido tânico por g de sólidos totais contidos no extrato aquoso).

4.6. Determinação de flavonoides totais no extrato aquoso

Para a determinação dos flavonoides totais foi utilizado o método de reação com cloreto de alumínio, adaptado de Funari & Ferro (2006). Em balões volumétricos de 25 mL foram adicionados 1,0 mL de uma solução aquosa de AlCl_3 a 2,5% (m/v), 1 mL do extrato aquoso ou volumes variados da solução padrão de quercetina 400 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e 5 mL de etanol. Então, o volume do balão foi completado e, após 30 minutos de reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a $\lambda = 425$ nm. Para o ensaio em branco foi utilizado o mesmo procedimento, porém sem a amostra. O teor de flavonoides totais total foi expresso em equivalentes de quercetina (mg de quercetina por g de sólidos totais contidos no extrato aquoso). A curva padrão de quercetina foi preparada utilizando concentrações finais de 0 a 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

4.7. Análise de compostos fenólicos no extrato aquoso por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A investigação de compostos fenólicos consistiu inicialmente na análise do perfil de massas dos compostos presentes no extrato aquoso através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de tempo de voo (LC-qTOF-MS). Para isso, foi elaborada uma listagem de flavonoides e outros compostos fenólicos já relatados na literatura para outras partes da planta *A. mearnsii*, como casca e folhas, por exemplo, assim como para compostos já estudados em outras espécies de Acácia.

O extrato aquoso foi diluído a uma concentração de 1 mg.mL^{-1} para todas as análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, as quais foram realizadas pelo Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM - LANAGRO – RS).

A etapa de investigação de massas descrita acima foi conduzida utilizando-se sistema de cromatografia líquida (Agilent 1260) acoplado a espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-tempo de voo (ABSciex 5600) - LC-QTOF com ionização por *electrospray* em modo negativo. Os parâmetros de ionização foram: CUR: 20 psi; GS1 e GS2: ambos 55 V; temperatura da fonte de íons: 700°C ; ISVF: -4500 V. Foi realizada a busca no modo TOF MS, sendo monitoradas massas de 100 a 2000 Da, com um tempo de acumulação de 250 ms; os parâmetros adotados foram DP: -60 eV e CE: -10 eV. Cada busca foi realizada com uma janela de massa exata de $\pm 30 \text{ mDa}$ para cada massa exata dos compostos ionizados. A análise foi realizada em 30 minutos, com 4 minutos de equilíbrio entre as análises. Todos os dados foram processados por *software* Analyst TF version 1.6.1 (Sciex).

Para a cromatografia líquida, empregou-se coluna DuraShell RP (Agela Technologies, $100 \times 2.1 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, 150 \AA) e pré-coluna Phenomenex SecurityGuard Cartridge C18 ($4 \times 3.0 \text{ mm ID}$), mantida a 40°C durante a análise. As fases móveis utilizadas eram água (A) e acetonitrila (B), ambas com 2% de ácido acético, em modo gradiente, com um fluxo de $300 \mu\text{L.min}^{-1}$. A análise cromatográfica iniciava com 95% de A, que diminuía até 80% aos 2 minutos. Nos quatro minutos seguintes, a proporção de A diminuía para 50%, atingindo 10% aos 10 minutos de análise. Esta condição era mantida por 15 minutos. A proporção inicial, 95% de A, era atingida

aos 28 minutos e mantida até o final da análise, aos 30 minutos. O volume injetado era de 2 μL .

Posteriormente, alguns dos compostos identificados através da determinação da massa exata, foram confirmados e quantificados através da análise com padrões em análise LC-MS/MS. Nessa etapa foi utilizado sistema de cromatografia líquida (Agilent 1100) acoplado a espectrômetro triplo quadrupolo (Sciex, API 5000); o tempo total de análise era 13 minutos, com 4 minutos de equilíbrio entre as análises. A aquisição foi realizada no modo de monitoração de reação múltipla (MRM) para obter pontos de quantificação suficientes para a confirmação de cada analito. Após a identificação dos íons de fragmentos mais abundantes para todos os compostos, bem como os parâmetros de ionização para cada transição particular, foram obtidos cromatogramas de MRM, indicando a ordem de retenção para os compostos selecionados. A análise de injeção de fluxo (FIA) foi então realizada para todos os compostos com as seguintes condições de fonte de íons no espectrômetro de massa: temperatura da fonte 600°C, gás de cortina (CUR) 20 psi, voltagem do *spray* eletrônico (IS) -4500 V, gás de nebulização (GS1) 55 V e gás auxiliar (GS2) 55 V, gás de colisão 4 V, potencial de entrada (EP) 10 V e o tempo de permanência foi de 25 ms. Todos os dados foram processados com *software* Analyst version 1.4.2 (Sciex).

A coluna e a pré-coluna eram as mesmas utilizadas na análise por LC-QTOF-MS. O volume injetado era 10 μL e o fluxo era de 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. As fases móveis utilizadas eram água (A) e acetonitrila (B), ambas com 2% de ácido acético. O modo gradiente foi utilizado para a separação cromatográfica, o qual iniciava com 95% de A, que diminuía até 80% em 2 minutos e até 50% em 6 minutos. O gradiente atingia 10% aos 10 minutos e esta condição foi mantida até 12 minutos de análise. Depois, a condição inicial (95% de A) era alcançada em 12,5 minutos e mantida até 13 minutos, tempo final da análise.

4.8. GC-MS do óleo essencial

Para a identificação dos compostos presentes no óleo essencial das flores da *A. mearnsii*, foram realizadas análises em um cromatógrafo a gás da marca Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) da marca Agilent

5975C. Para as análises, o óleo essencial foi diluído com ciclohexano, em proporção 2:1 (ciclohexano: óleo).

O cromatógrafo, equipado com coluna capilar de sílica HP-5MS, teve as seguintes condições nas análises (XAVIER *et al.*, 2013): temperatura da coluna no forno 60°C durante 4 minutos, aumentando a 5°C/min até 180°C e a 20°C/min até 250°C, mantido a 250°C por 5 min; temperatura do injetor 250°C; modo de injeção *split*, razão de *split* 1:55; o gás de arraste foi hélio com vazão 0,8 mL/min; temperatura da interface 250°C; modo MS EI; tensão de EI, 70 eV; intervalo de massas de aquisição, m/z 40-450.

Os compostos foram identificados por comparação de seus índices de retenção (IR), determinados a partir de uma série de n-alcenos (C₈-C₂₀), com os reportados na literatura (ADAMS, 2007). A comparação dos espectros de massas também foi utilizada na identificação dos compostos. A equação 4.18 (ADAMS, 2007) foi utilizada para o cálculo do índice de retenção (RI).

$$RI = 100n + 100 \frac{t_{Rx} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} \quad (4.18)$$

onde:

- RI = índice de retenção;
- n = número de átomos de carbono de cada alcano normal da mistura;
- t_{Rx} = tempo de retenção ajustado do composto x;
- t_{Rz} e t_{R(z+1)} = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal, sendo que t_{Rx} é intermediário a t_{Rz} e t_{R(z+1)}.

4.9. Avaliação olfatométrica do óleo essencial

A análise do perfil olfatométrico do óleo essencial das flores da *A. mearnsii* foi realizada utilizando-se o cromatógrafo a gás equipado com um sistema de detecção por ionização de chama (FID) da Perkin Elmer Auto System com olfatômetro acoplado. O método foi citado por Garcez *et al.* (2017) e foi baseado na metodologia de Van Baren (2008). A linha de transferência foi mantida a 250°C. No equipamento foi utilizada a mesma coluna utilizada para as análises por GC-MS, com as mesmas especificações e o mesmo programa de temperatura. Desse modo,

foram relacionados os resultados da análise sensorial com os da composição química dos voláteis do óleo essencial.

A análise olfatométrica foi conduzida com cinco avaliadores, todos do sexo feminino, com idades entre 20 e 30 anos. Os avaliadores foram selecionados aleatoriamente, pois assim a diferença entre os critérios individuais e anosmias (incapacidade de sentir odores) específicas é minimizada, conforme apresentado por Goodner & Rouseff (2011).

O olfatômetro consiste basicamente em uma saída da coluna de separação do cromatógrafo com um sistema de umidificação. Desse modo, é possível relacionar os compostos separados na cromatografia com os aromas percebidos pelos avaliadores. Para tanto, cada um dos avaliadores deveria relatar a cada vez que sentisse um odor durante a análise o tempo, em relação ao início da análise; a descrição do odor; e a intensidade do odor, considerando uma escala de números inteiros de 1 a 5 (sendo 1 a menor intensidade e 5 a maior intensidade). Para facilitar a descrição dos odores percebidos pelos avaliadores, foi fornecida a eles uma roda com aromas característicos de chás. A roda de aromas, apresentada no Anexo C, era apenas orientativa, sendo a descrição dos avaliadores totalmente livre.

Com essas informações, após as análises, é possível uma comparação entre os resultados obtidos individualmente e a geração de uma nova grandeza, que relaciona intensidade e frequência de detecção, a qual é denominada Frequência Modificada (FM) (Dravnieks, 1985) e é apresentada a seguir na equação 4.19.

$$FM(\%) = \sqrt{F(\%) \cdot I(\%)} \quad (4.19)$$

Onde:

- F(%) é a frequência, em termos percentuais, de detecção de um aroma entre o universo de avaliadores;
- I(%) é a intensidade média de um atributo aromático em relação à escala, sendo 100% correspondente à média 5. Se um aroma possui 100% de FM quer dizer que o mesmo foi detectado por todos os avaliadores e com máxima intensidade.

4.10. Separação cromatográfica de compostos do extrato obtido com fluido supercrítico

A fim de investigar a composição química dos extratos obtidos com o uso do fluido supercrítico, os mesmos foram submetidos à separação por cromatografia em coluna e foram empregadas cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*).

4.10.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

Todos os 7 extratos obtidos utilizando a extração com fluido supercrítico, conforme o planejamento fatorial, foram analisados por HPLC. As análises realizadas neste estudo foram apenas qualitativas para que se pudesse avaliar a presença de compostos majoritários nos extratos. As frações obtidas na cromatografia em coluna também foram analisadas por HPLC para que assim fosse avaliada a eficiência da separação pelo método de fracionamento.

As análises de cromatografia líquida foram realizadas em um sistema da marca Agilent, modelo 1200 Series, com detector U.V. O método de análise utilizado tinha como fase móvel água ultrapura (A) e acetonitrila (B), ambos com 2% de ácido acético glacial, com um gradiente de 80-20% de B em 30 minutos, com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A coluna utilizada foi uma C18 (4,6 x 250 mm x 5 µm). O comprimento de onda utilizado no detector foi $\lambda = 258$ nm. O volume injetado foi de 5 µL (LUCAS, 2015).

4.10.2. Cromatografia em coluna

A separação por cromatografia em coluna é considerada um método preparativo que tem por objetivo isolar compostos majoritários e/ou diminuir a quantidade de compostos para posteriores análises, separando o extrato em diversas frações. A cromatografia em coluna é composta por uma coluna de vidro com a extremidade superior aberta e uma torneira na extremidade inferior para controle de vazão das frações a serem recolhidas. Esta coluna é recheada com um adsorvente (fase estacionária), sendo a sílica gel o mais utilizado. A eluição do

interior da coluna ocorrerá em ordem de polaridade das substâncias. Utilizando adsorventes polares, como a sílica gel, compostos polares terão mais afinidade e ficarão retidos por mais tempo na coluna. Sendo assim, a polaridade da fase móvel na separação se torna fundamental na eluição das moléculas. O objetivo é remover ou dessorver seletivamente os componentes da mistura retidos do adsorvente (SKOOG *et al.*, 2008).

A cromatografia em coluna foi realizada em colunas de 30 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro, utilizando como adsorvente sílica gel 60 (0,063-0,200 mm). Todos os experimentos foram padronizados com uma altura de sílica dentro da coluna de 15 cm.

Em uma primeira etapa, foi utilizado vácuo para auxiliar na eluição dos compostos e os solventes utilizados, em ordem crescente de polaridade, foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Foi utilizado um volume de 250 mL de cada solvente e todo o volume de cada solvente foi recolhido como uma fração.

Para os refrações das etapas 2 e 3, as frações foram selecionadas com base nos resultados das análises por CCD e HPLC.

Na segunda etapa de separação, a fração obtida com solvente acetato de etila foi refraída, também utilizando vácuo, empregando como fase móvel os gradientes apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Relação das fases móveis e suas respectivas proporções utilizadas na cromatografia em coluna – etapa 2.

Solvente	Proporção de mistura (% em volume)	Fração recolhida
Hexano	100	1
Hexano : Acetato de etila	80:20	2
Hexano : Acetato de etila	60:40	3
Hexano : Acetato de etila	40:60	4
Hexano : Acetato de etila	20:80	5
Acetato de etila	100	6
Acetato de etila : Diclorometano	50:50	7
Diclorometano	100	8
Diclorometano : Metanol	50:50	9
Metanol	100	10

Em uma terceira etapa, a fração obtida utilizando como eluente a mistura hexano : acetato de etila (80:20), fração 2, foi submetida à separação por ação da gravidade, sendo utilizadas as fases móveis indicadas na Tabela 4.3. Para essa separação, a amostra foi colocada na extremidade superior da coluna com a ajuda do solvente (fase móvel). Utilizou-se um volume de 150 mL de cada solvente e foram recolhidas frações a cada 10 mL eluídos, sendo a última fase móvel recolhida em todo seu volume como uma única fase. Assim, foram recolhidas 80 frações.

Tabela 4.3. Relação das fases móveis e suas respectivas proporções utilizadas na cromatografia em coluna – etapa 3.

Solvente	Proporção de mistura (% em volume)
Hexano	100
Hexano : Acetato de etila	90:10
Hexano : Acetato de etila	80:20
Hexano : Acetato de etila	70:30
Hexano : Acetato de etila	60:40
Hexano : Acetato de etila	50:50
Acetato de etila	100

4.10.3. Cromatografia em camada delgada

Para auxiliar na verificação da eficiência da separação após as etapas de cromatografia em coluna, as frações obtidas foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD).

A análise por CCD foi realizada em placas de sílica gel GF₂₅₄, usando como fase móvel diclorometano. As amostras foram aplicadas a um centímetro da borda inferior com o auxílio de tubos capilares. Após a aplicação, as placas foram colocadas dentro de uma cuba de vidro fechada, onde permaneceram tempo suficiente até que a fase móvel atingisse a borda superior (altura = 10 cm). Completada a eluição, as placas foram visualizadas sob luz U.V. com comprimento de onda de 264 e 365 nm. Em seguida, as placas foram reveladas com vanilina sulfúrica.

4.11. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato obtido com fluido supercrítico

A atividade antimicrobiana das amostras obtidas por extração com fluido supercrítico foi avaliada pelos métodos da bioautografia indireta e a da concentração inibitória mínima (CIM). A bioautografia indireta é um método qualitativo de avaliação da atividade antimicrobiana, no qual uma placa de cromatografia em camada delgada (CCD) da amostra é aplicada sob um meio de cultura inoculado com os microorganismos de interesse. Já a concentração inibitória mínima, é um método quantitativo e determina a quantidade mínima de amostra necessária para a inibição do crescimento do microorganismo. Nesse método, a ação de diferentes concentrações da amostra, segundo diluições seriadas, é avaliada frente a uma concentração constante de microorganismo (FALCÃO *et al.*, 2012).

Para o método de bioautografia indireta, os extratos foram diluídos em diclorometano P.A. e aplicados (1,5 µL) em placas de CCD de sílica gel GF₂₅₄. Em seguida, os compostos foram separados através da técnica de CCD, utilizando como eluente o diclorometano. Após a efetiva eliminação do solvente por evaporação, foram aplicados 1,5 µL da amostra em um ponto abaixo da primeira aplicação para observar a presença ou não de atividade antimicrobiana do extrato total (ação

sinérgica de seus compostos). O inóculo foi feito através de uma suspensão de microrganismos ajustada a $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e adicionada em ágar Mueller-Hinton. Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Por fim, as placas de CCD, já eluídas e após a evaporação do solvente, foram submersas no meio de cultura inoculado com os microrganismos e incubadas por 24 horas a 37°C. Após o tempo de crescimento dos microrganismos, foi adicionado sal de tetrazólio INT (p-iodonitrotetrazolium violet) para visualização dos halos de inibição (VALGAS *et al.*, 2007; PEREIRA, 2010). As zonas sem coloração avermelhada são as faixas de inibição de crescimento microbiano (FALCÃO *et al.*, 2012). Como controle positivo, foram aplicados às placas amoxicilina na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹. Enquanto como controle negativo foi utilizado o meio de cultura inoculado com o microorganismo, sem adição dos extratos.

A CIM foi determinada utilizando a metodologia de diluição em microplaca (microdiluição). Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL do inóculo de microrganismo com concentração final de $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ em caldo Mueller-Hinton e então foram adicionados 100 µL do extrato, solubilizado em Tween 20 diluído a 10% em água, nas concentrações finais de 0,75; 1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 mg.mL⁻¹. Outras concentrações foram utilizadas para as frações obtidas por separação cromatográfica, definidas conforme as massas de cada fração. A fração obtida com acetato de etila teve concentrações finais de 59,2; 29,5; 14,7; 7,3; 3,6 e 1,8 mg.mL⁻¹; a fração obtida com hexano : acetato de etila (80:20), denominada fração 2, 71,3; 35,9; 17,9; 8,9; 4,4 e 2,2 mg.mL⁻¹; e a fração obtida com hexano : acetato de etila (60:40), fração 4, foi testada nas concentrações de 23,6; 11,8; 5,9; 2,9; 1,4 e 0,73 mg.mL⁻¹. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C e, após o tempo de crescimento, foi possível visualizar se houve crescimento dos microrganismos nos poços, o qual foi evidenciado pela adição da solução de INT. Novamente como controle negativo foi incubado o meio de cultura com o inóculo e amoxicilina foi utilizada como controle positivo, cuja concentração inibitória mínima é de 0,1 mg.mL⁻¹.

5. RESULTADOS

5.1. Testes preliminares – reações para a identificação de flavonoides

Na etapa inicial do trabalho, foi utilizado extrato metanólico para a investigação da presença de flavonoides nas flores, o qual foi submetido a 4 testes de identificação por reação:

- **Reação de Shinoda** – nesse teste, o desenvolvimento de coloração rósea-avermelhada indica a presença de flavonóis; coloração violeta indica a presença de flavanonas e coloração laranja indica presença de flavonas. Conforme Figura 5.1, ficou evidenciada a presença de flavonóis.



Figura 5.1. Reação de Shinoda.

- **Reação de cloreto de alumínio** – Sob luz ultravioleta, o cloreto de alumínio intensifica a fluorescência de flavonoides, conforme foi evidenciado e é apresentado na Figura 5.2.

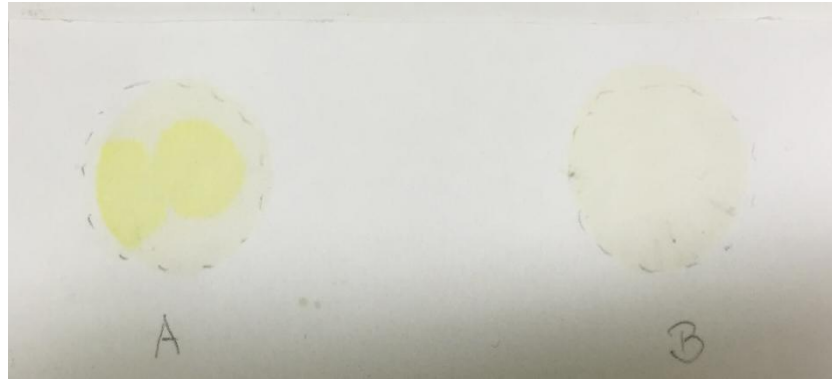


Figura 5.2. Reação com cloreto de alumínio: à esquerda, com cloreto de alumínio, à direita, o extrato bruto

- **Reação com cloreto férrico** – O desenvolvimento de cor, que pode variar entre verde, amarelo-castanho e violeta, demonstra a presença de flavonoides, sendo a cor dependente da classe do composto flavonoidico. Esse resultado também foi positivo, conforme Figura 5.3.



Figura 5.3. Reação com cloreto férrico: à esquerda, o extrato bruto; à direita, o extrato com cloreto férrico 2%.

- **Reação com hidróxido de sódio** – A formação de coloração amarela indica resultado positivo para a presença de flavonoides e varia de intensidade conforme o composto presente na amostra. No resultado mostrado na Figura 5.4, o tom amarelo-esverdeado reforça os resultados

anteriores, confirmando a presença de flavonoides na composição do extrato.

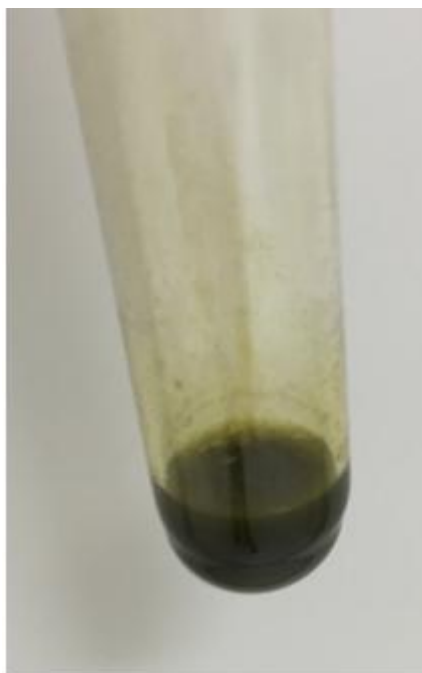


Figura 5.4. Reação com hidróxido de sódio.

5.2. Atividade Antioxidante do extrato aquoso

5.2.1. Determinação da EC50 - método do DPPH

A relação entre a concentração do radical DPPH e absorvância foi estabelecida através de uma curva de calibração (Figura 5.5). Em seguida, foi determinada, em triplicata, a absorvância relacionada à diminuição pela metade da concentração de DPPH, o que corresponde à metade da absorvância determinada para o controle. Relacionando esse valor de absorvância com os valores lineares para diferentes concentrações do extrato aquoso (Figura 5.6), foi calculada a concentração do extrato aquoso para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC50). Assim, foi obtida $EC_{50} = 39,13 \pm 3,69 \text{ mg.L}^{-1}$, valor correspondente a $3,44 \pm 0,33 \text{ g}$ de sólidos do extrato aquoso para a captura de 1 g de DPPH.

Para a concentração de extrato aquoso máxima testada, equivalente a 57 mg.L^{-1} , o consumo do radical DPPH, também denominada atividade antioxidante total, foi de $69,13 \pm 5,32\%$. O padrão rutina, testado em simplicata com

concentração de $12,5 \text{ g.L}^{-1}$, apresentou atividade antioxidante total de 68,83%, enquanto o ácido gálico, também testado em simplicata, teve atividade de 94,43%, em uma concentração de 50 g.L^{-1} . Segundo Andrade *et al.* (2007), as plantas do gênero acácia tendem a apresentar boa atividade antioxidante devido à presença de compostos fenólicos. Em seu trabalho, Andrade *et al.* (2007), relataram $EC_{50} = 10,48 \text{ mg.L}^{-1}$ para o extrato etanólico bruto das flores de *Acacia podalyriifolia*; $36,65 \text{ mg.L}^{-1}$ para uma fração extraída com diclorometano e $3,22 \text{ mg.L}^{-1}$ para uma fração extraída com acetato de etila. A maior atividade antioxidante da fração acetato de etila foi atribuída a uma maior concentração de compostos fenólicos.

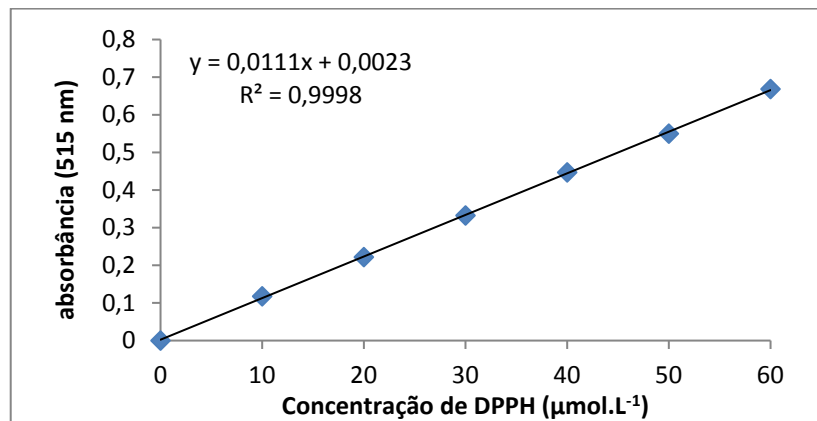


Figura 5.5. Curva concentração da solução de DPPH x absorbância.

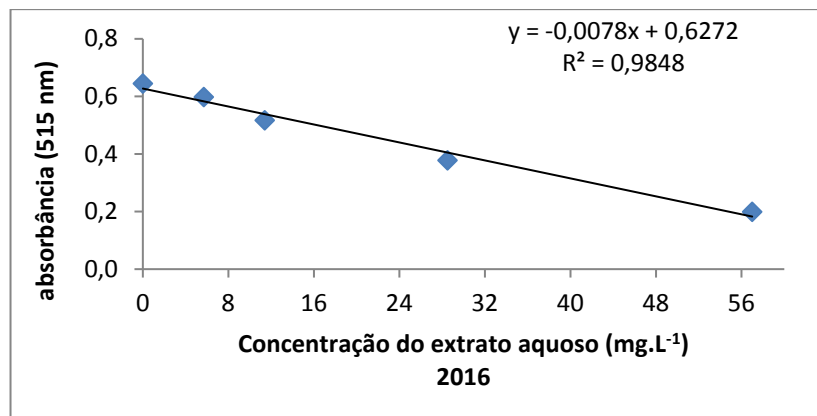


Figura 5.6. Concentração do extrato aquoso x absorbância após consumo do DPPH.

5.2.2. Capacidade antioxidante Total (CAT)

A capacidade antioxidante total, determinada através de complexação pelo fosfomolibdênio, foi avaliada, em triplicata, frente ao padrão rotina. A relação

entre absorvância e concentração de rutina é apresentada na Figura 5.7. O extrato aquoso, com concentração de $28,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, teve ação equivalente a $615,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rutina. Portanto, $1 \mu\text{g}$ de sólidos do extrato aquoso tem atividade antioxidante equivalente a $21,6 \pm 0,8 \mu\text{g}$ de rutina. Assim, esse resultado corrobora com o observado no teste com o radical DPPH, pois em ambos o extrato aquoso das flores da *A. mearnsii* teve desempenho superior ao flavonoide rutina, utilizado como padrão.

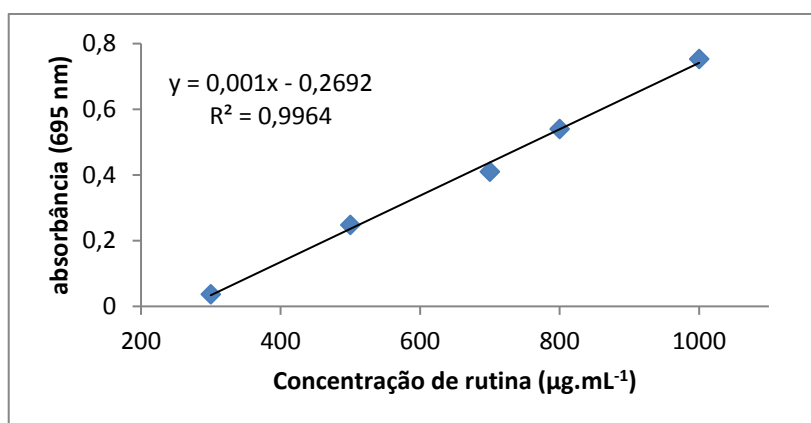


Figura 5.7. Concentração de rutina x absorvância.

5.3. Determinação de compostos fenólicos totais no extrato aquoso

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada através do método espectrofotométrico, utilizando ácido tânico como padrão. Inicialmente foi verificada a relação entre absorvância e concentração de ácido tânico (Figura 5.8) e, então, as absorvâncias obtidas para o extrato aquoso, em triplicata, foram correlacionadas ao ácido tânico. Desse modo, o teor de compostos fenólicos totais, após análise em triplicata, foi equivalente à $61,9 \pm 2,1 \text{ mg}$ de ácido tânico por g de sólidos do extrato aquoso.

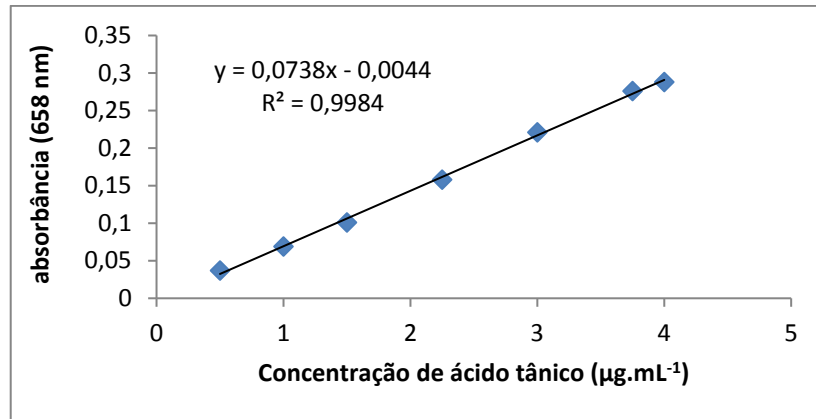


Figura 5.8. Concentração de ácido tânico x absorbância.

5.4. Determinação de flavonoides totais no extrato aquoso

Os flavonoides totais foram determinados em triplicata frente ao padrão quercetina. As absorbâncias para diferentes concentrações de quercetina são apresentadas na Figura 5.9. De forma similar à determinação de fenólicos totais, a quantificação dos flavonoides ocorreu através da comparação da absorbância do extrato aquoso com a curva de quercetina. Assim, a concentração de flavonoides totais foi equivalente a $9,5 \pm 0,4 \text{ mg.g}^{-1}$ de sólidos contidos no extrato aquoso.

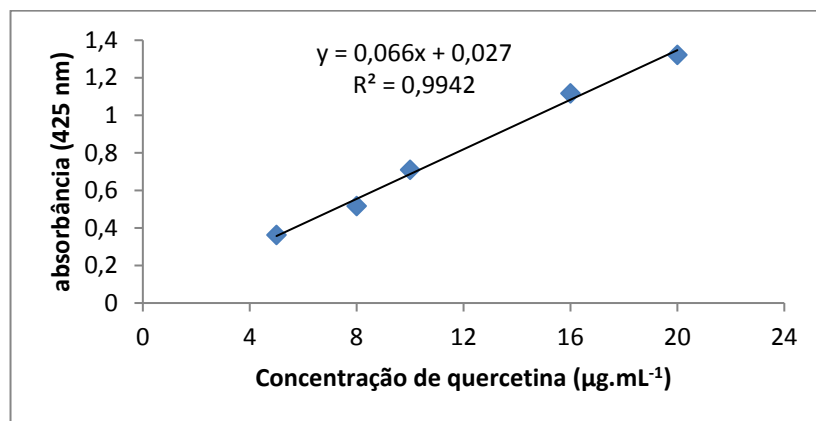


Figura 5.9. Concentração de quercetina x absorbância.

5.5. Análise de compostos fenólicos no extrato aquoso por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Inicialmente, foi realizada uma análise de busca no modo TOF MS, através da análise de massa exata dos compostos ionizados. Desse modo, foi

possível verificar uma provável presença de 42 compostos fenólicos, os quais correspondem aos listados na Tabela 5.1 ou a isômeros destes. Existindo a disponibilidade de padrões, pode ser realizada a distinção dos isômeros por separação cromatográfica. Os demais compostos relatados na literatura para extratos de *Acacia*, mas que não foram identificados no extrato aquoso da *A. mearnsii*, são apresentados no Anexo A. Os compostos com menor erro entre a massa calculada e a massa determinada experimentalmente possuem maior probabilidade de estarem corretamente identificados. Tal probabilidade é considerada plenamente satisfatória para erros inferiores a 5 ppm (BLOM, 2001), o que foi verificado para os primeiros 27 compostos apresentados a seguir (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Compostos fenólicos prováveis no extrato aquoso das flores de *A. mearnsii* correspondentes às massas determinadas por LC-qTOF-MS.

Composto	m/z [M-H] ⁻ (valor calculado)	m/z [M-H] ⁻ (valor experimental)	Erro (ppm)	Fórmula
Auriculosídeo ⁴	449,1448	449,1447	0,22	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₀
Isosalipurposídeo ²	431,0978	431,0980	-0,46	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀
Quercetina 3-O-gentiobiosídeo ²	625,1405	625,1401	0,64	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇
Quercetina 3-O-glucosilgalactosídeo ²				
Quercetina diglucosídeo ²				
Miricetina-3glucosídeo ^{1,2}	479,0826	479,0822	0,83	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃
8-O-Metoxi-epioritin-4α-ol ²	303,0869	303,0866	0,99	C ₁₆ H ₁₆ O ₆
Quercetina ²	301,0348	301,0351	-1,00	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Robinetina ⁴				
Rutina (quercetina 3-O-rutinosídeo) ²	609,1456	609,1448	1,31	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Ramnetina 3-α-L-ramnosídeo ²	461,1084	461,1093	-1,95	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
(+)-Catequina ¹	289,0712	289,0718	-2,08	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
(-)-Teracacidina ²				
(-)-Epicatequina ²				
(+)-Leucofisetinidina ²				
(-)-Robinetinidol ²				
Fisetinidol-4α-ol ³				
Miricetina ¹	317,0297	317,0290	2,21	C ₁₅ H ₁₀ O ₈

Vicenina ²	593,1506	593,1522	-2,70	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
Naringenina ⁴	271,0606	271,0614	-2,95	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
Miricitrina ¹	463,0877	463,0863	3,02	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Isoquercitrina ¹				
Quercetina 3-O-galactosídeo ²				
Hiperosídeo ⁴				
Mearnsitrina ¹				
4,2',4',6'-Tetrahidroxichalcona 4-glucosídeo ²	433,1135	433,1120	3,46	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀
Quercitrina ¹	447,0927	447,0908	4,25	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
2',4'-Dihidroxi-3'-metoxichalcona ²	269,0814	269,0759	20,44	C ₁₆ H ₁₄ O ₄
Apigenina 7,4-dimetil éter ²	297,0763	297,0836	-24,57	C ₁₇ H ₁₄ O ₅
2',4'-Dihroxichalcona ²	239,0708	239,0780	-30,12	C ₁₅ H ₁₂ O ₃
(+)-Galocatequina ^{1,2}	305,0661	305,0785	-40,65	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
Melacacidina ⁴	305,0661	305,0785	-40,65	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
Fasciculiferina ²	311,0919	311,1120	-64,61	C ₁₈ H ₁₆ O ₅
(+)-2,3-trans-Crombeone ²	315,0505	315,0726	-70,15	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
Ramnetina ²				
Isoramnetina ⁴				
3-Metil-kaempferol ²	299,0556	299,0769	-71,22	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
Diosmetina ⁴				
Luteolina ⁴	285,0399	285,0189	73,67	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Kaempferol ²				
Isoliquiritigenina ²	255,0657	255,2334	-657,48	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
Pinocembrina ²				

Os compostos da tabela foram relatados em *Acacia* nas seguintes referências: ¹ Mackenzie (1969); ² Seigler (2003); ³ Venter *et al.* (2012); ⁴ Andrade *et al.* (2003).

Entre os compostos identificados, alguns têm propriedades já conhecidas, por exemplo, os estereoisômeros (+)-catequina e (-)-epicatequina são dois flavonoides com alta atividade antioxidante em sistemas vivos (MENDOZA-WILSON & GLOSSMAN-MITNIK, 2006; IACOPINI *et al.*, 2008). Além disso, epicatequina apresenta também alta atividade antimutagênica (GEETHA *et al.*, 2004). A flavanona naringenina é considerada como tendo um efeito bioativo na saúde humana como antioxidante, eliminando radicais livres, como anti-inflamatório, promotor do

metabolismo de carboidratos e como modulador do sistema de imunidade (MIR & TIKU, 2014). A isoquercitrina, por sua vez, exibe uma série de efeitos quimioprotetores tanto *in vitro* como *in vivo*, contra o estresse oxidativo, câncer, distúrbios cardiovasculares, diabetes e reações alérgicas (VALENTOVÁ *et al.*, 2014).

Na segunda etapa de investigação de compostos fenólicos, através de comparação com a análise de padrões, realizando as análises em cromatógrafo de fase líquida acoplado a espectrômetro triplo quadrupolo, foi possível identificar quercetina (íons monitorados: 300,9 → 151,1; 309,9 → 178,8) no extrato aquoso. Além disso, foi identificado e quantificado rutina (íons monitorados 609,2 → 299,9; 609,2 → 271,1). O composto rutina contido no extrato aquoso foi equivalente a $200,67 \pm 30,40$ µg por g de sólidos do extrato aquoso, o que corresponde a apenas 2,1% dos flavonoides do extrato, aproximadamente. O baixo teor pode estar relacionado a grande diversidade de compostos, conforme resultados da análise por qTOF-MS. O cromatograma (*Total ion chromatogram* – TIC) com os compostos assinalados são apresentados na Figura 5.10-a. O primeiro pico visualizado no cromatograma não foi identificado com nenhum dos padrões utilizados (ácido cafeico; epicatequina; miricetina; ácido elágico; apigenina; daidzeína; equol; genesteína; canferol; quercetina; rutina), sendo possivelmente algum isômero da rutina, cujo cromatograma é apresentado na Figura 5.10-b.

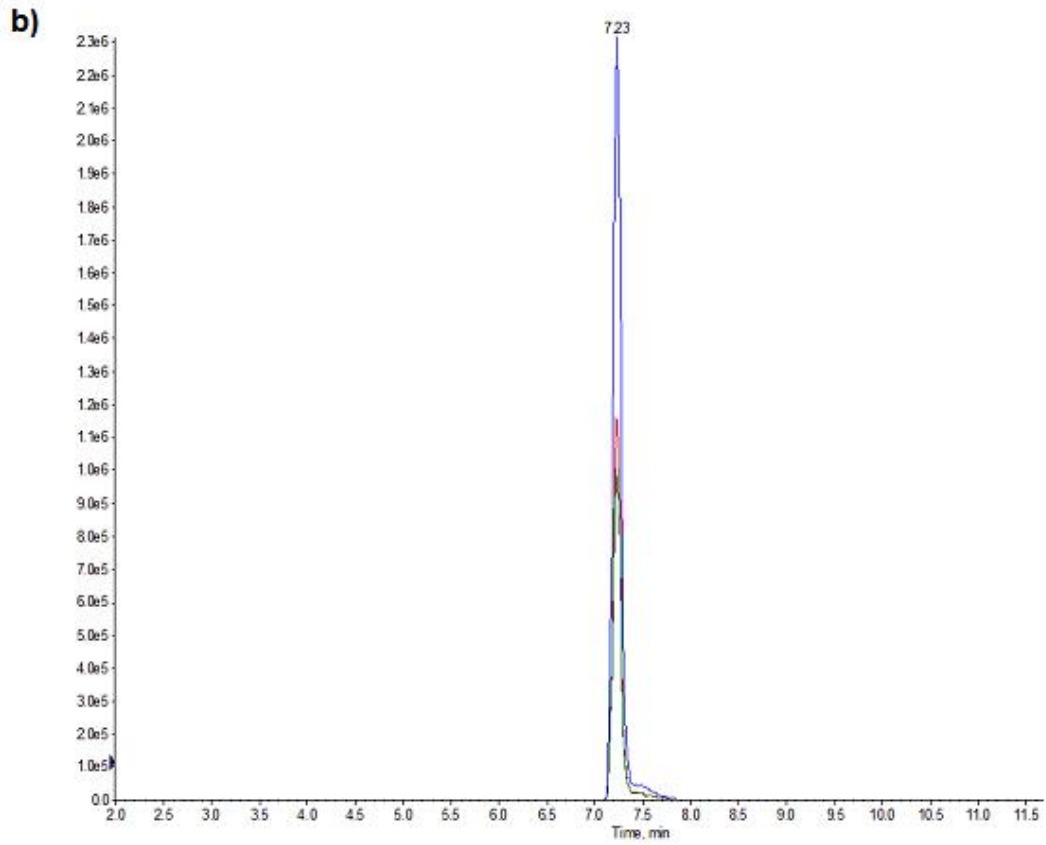
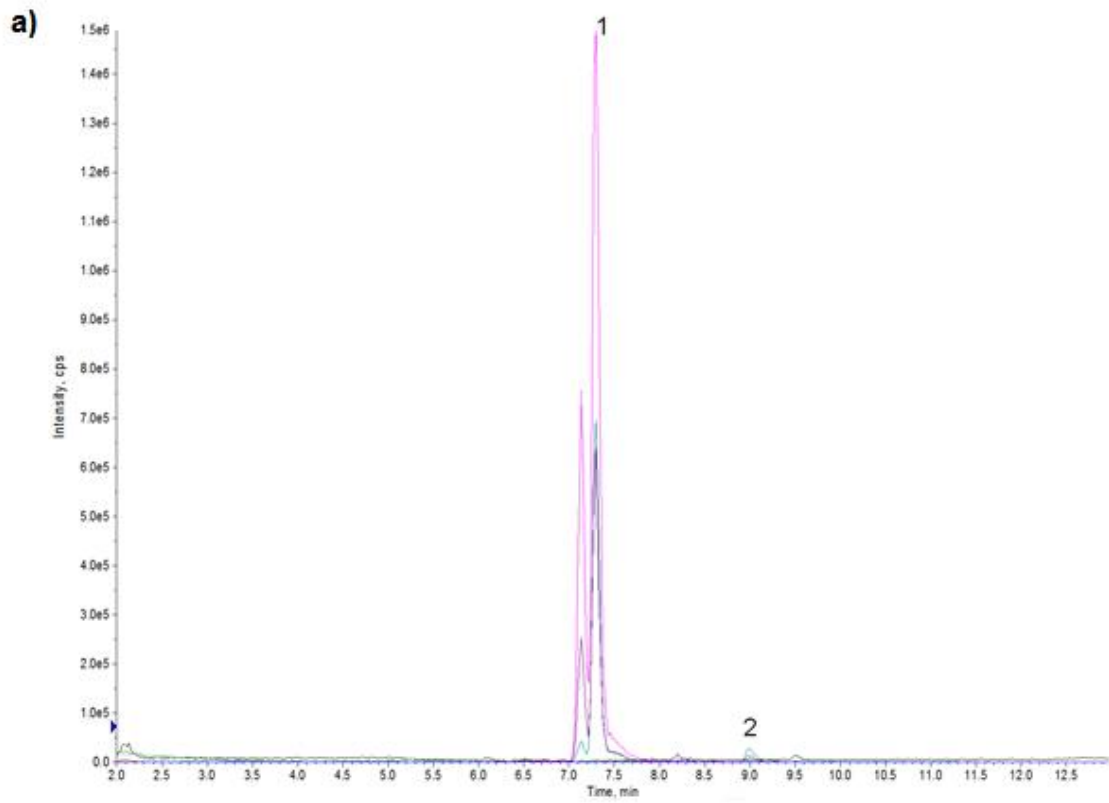


Figura 5.10. a) TIC do extrato aquoso das flores de *A. mearnsii* onde: (1) rutina, (2) quercetina; b) TIC do padrão rutina.

A rutina e a quercetina são importantes bioflavonoides devido às suas diversas propriedades já conhecidas (SHARMA *et al.*, 2013) como ação anti-inflamatória (GUARDIA *et al.*, 2001; ROTELLI *et al.*, 2003), atividade antioxidante (YANG *et al.*, 2008, AFANAS'EV *et al.*, 1989; MORETTI *et al.*, 2012), ação cardioprotetora (ANNAPURNA *et al.*, 2009; PARABATHINA *et al.*, 2010), antialérgica (CHEN *et al.*, 2000; MLCEK *et al.*, 2016), antitumoral (CHEN *et al.*, 2013; DESCHNER *et al.*, 1991; WEBSTER *et al.*, 1996), antimicrobiana (CUSHNIE & LAMB, 2005; NARAYANA *et al.*, 2001; AMIN *et al.*, 2015), entre outras.

A presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante verificadas no extrato aquoso indicam um possível uso para o que seria apenas um efluente. Em seu trabalho, Oliveira (2015) desmitificou o fato de que os resíduos de processos aplicados a produtos naturais não impactam o meio ambiente. No estudo foram caracterizados parâmetros físico-químicos dos efluentes (extrato aquoso) gerados na destilação por arraste a vapor dos óleos essenciais das plantas alecrim, pimenta longa e pinus, sendo que todos apresentaram potencial impacto ao meio ambiente. Entre os resultados para os parâmetros ambientais avaliados, os mais impactantes foram os que avaliaram a carga orgânica presente nos efluentes: demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e carbono orgânico total. Também foram verificados valores muito acima dos previstos na legislação para os parâmetros nitrogênio amoniacal e nitrato, oxigênio dissolvido, pH e sólidos dissolvidos.

5.6. GC-MS do óleo essencial

A identificação de compostos voláteis presentes no óleo essencial das flores de *A. mearnsii*, obtidos na extração por arraste a vapor a 2,0 bar, foi realizada por GC-MS. Foram identificados 31 compostos, o que corresponde a mais de 84,6 % dos compostos eluídos. Os compostos identificados, considerando as áreas relativas do cromatograma, consistem basicamente em hidrocarbonetos (73,12%), terpenos (7,024%), sendo 4,549% outros compostos (aldeído, éster, éter e álcool). Na Tabela 5.2 são apresentados os compostos identificados, na qual se observa em destaque como compostos majoritários os hidrocarbonetos 8-heptadeceno, heptadecano, nonadecano e o diterpeno caureno.

Tabela 5.2. Análise Cromatográfica GC-MS do óleo essencial.

Compostos identificados ^a	t _R	IR ^b	% Área ^c	Fórmula molecular
n-Octano	3,522	800	0,046	C ₈ H ₁₈
n-Nonano	5,848	900	0,021	C ₉ H ₂₀
α –Pineno	6,901	935	0,035	C ₁₀ H ₁₆
orto-Cimeno	9,709	1026	0,037	C ₁₀ H ₁₄
n-Nonanal	12,263	1107	0,954	C ₉ H ₁₈ O
(E)-2-Nonen-1-al	13,932	1162	0,037	C ₉ H ₁₆ O
Etil benzoato	14,286	1174	0,060	C ₉ H ₁₀ O ₂
Safranal	15,163	1203	0,031	C ₁₀ H ₁₄ O
n-Decanal	15,305	1208	0,402	C ₁₀ H ₂₀ O
p-Anisaldeído	16,745	1258	0,091	C ₈ H ₈ O ₂
Safrol	17,760	1294	1,325	C ₁₀ H ₁₀ O ₂
α-Copaeno	20,031	1379	0,361	C ₁₅ H ₂₄
E-Cariofileno	21,253	1426	0,082	C ₁₅ H ₂₄
α-Humuleno	21,999	1456	0,850	C ₁₅ H ₂₄
E-Etil cinamato	22,364	1471	0,086	C ₁₁ H ₁₂ O ₂
Pentadecano	23,160	1503	2,096	C ₁₅ H ₃₂
δ-Cadineno	23,837	1531	0,107	C ₁₅ H ₂₄
1-Hexadeceno	25,063	1583	3,199	C ₁₆ H ₃₂
Hexadecano	25,523	1603	0,288	C ₁₆ H ₃₄
8-Heptadeceno	27,753	1703	41,287	C ₁₇ H ₃₄
Heptadecano	28,253	1732	7,284	C ₁₇ H ₃₆
Benzoato de benzila	28,778	1763	0,123	C ₁₄ H ₁₂ O ₂
Octadecano	29,489	1808	1,777	C ₁₈ H ₃₈
n-Hexadecanol	30,304	1883	1,842	C ₁₆ H ₃₄ O
Nonadecano	30,741	1930	12,315	C ₁₉ H ₄₀
Eicosano	31,384	*	1,212	C ₂₀ H ₄₂
Caureno	31,951	*	5,150	C ₂₀ H ₃₂
Heneicosano	32,072	*	1,565	C ₂₁ H ₄₄
Tricosano	33,663	*	1,403	C ₂₃ H ₄₈
Tetracosano	34,629	*	0,124	C ₂₄ H ₅₀
Pentacosano	35,879	*	0,503	C ₂₅ H ₅₂
Total identificado			84,693	

^a = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007).

^bIR = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos após análise em cromatógrafo Agilent 7890A.

^c% Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma.

* Compostos identificados apenas pelo espectro de massa, pois a série de alcanos utilizada terminava em C₂₀.

Dos 31 compostos identificados no óleo essencial extraído das flores da *A. mearnsii*, 15 deles foram relatados por Avoseh *et al.* (2014) presentes nos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação das folhas frescas, folhas secas, cascas frescas e cascas secas da *A. mearnsii*. Para o óleo extraído por hidrodestilação o rendimento, para as partes da planta citadas, foi de 0,25%, 0,50%, 0,78% e 0,11% (v/m), respectivamente. Nos óleos extraídos das folhas secas e das cascas foram identificados orto-cimeno (0,7% e 1,1%, respectivamente), α -copaeno (0,3% e 0,1%, respectivamente) e δ -cadineno (0,4% e 4,2%, respectivamente). N-nonano, eicosano e 1-hexadecanol foram extraídos nos óleos das folhas frescas (0,5%, 3,9% e 8,6%, respectivamente), das cascas frescas (0,5%, 3,2% e 6,5%, respectivamente) e das cascas secas (0,5%, 1,1% e 1,2%, respectivamente). Nos óleos das folhas frescas e das cascas frescas foram identificados tetracosano (4,8% e 1,1%, respectivamente) e decanal (4,2% e 1,7%, respectivamente). N-nonanal e heneicosano estavam presentes nos óleos essenciais da casca fresca (7,2% e 1,7%, respectivamente) e seca (5,2% e 6,6%, respectivamente). Nos extratos das folhas frescas e cascas secas foram observados tricosano (0,8% e 1,0%, respectivamente) e (E)-2-nonen-1-al (8,2% e 8,6%, respectivamente). Apenas no óleo extraído da casca fresca, foram identificados n-octano (0,4%), heptadecano (0,7%) e octadecano (1,3%).

Os compostos α -humuleno e γ -cadineno (isômero do δ -cadineno presente no óleo essencial das flores da *A. mearnsii*) foram relatados por Ogunwande *et al.* (2008) entre os compostos majoritários do óleo essencial da *Acacia tortilis*. O monoterpeneo α -pineno, por sua vez, foi relatado como composto majoritário para o óleo de *Acacia albida* (OGUNBINU *et al.*, 2011) e é considerado um repelente contra insetos (NERIO *et al.*, 2010).

5.7. Avaliação olfatométrica do óleo essencial

A análise olfatométrica foi realizada por 5 avaliadores, os quais, ao perceberem um odor, deveriam anotar o tempo decorrido desde o início da cromatografia, a descrição do odor e sua intensidade, em uma escala de 1 a 5. Diversos aromas foram identificados, os que mais se destacaram em termo de frequência e intensidade, resultando frequência modificada (FM) maior que 50%, são apresentados no gráfico da Figura 5.11:

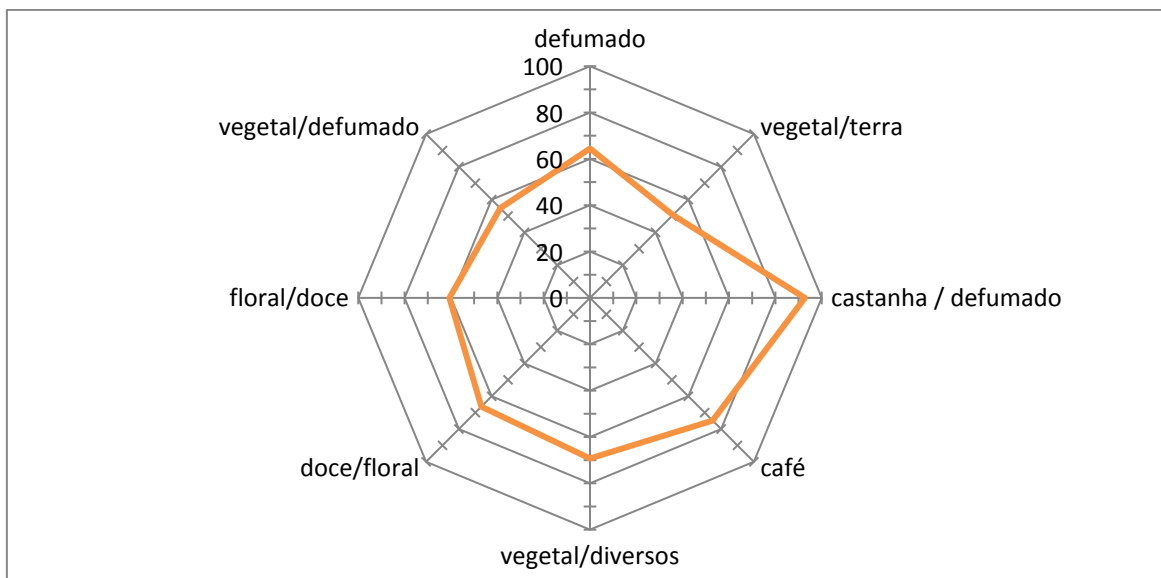


Figura 5.11. Gráfico aranha para os odores com FM > 50% no óleo essencial das flores de *A. mearnsii*.

O cruzamento entre os compostos identificados pela análise sensorial e os que foram identificados pelo índice de retenção, através de GC-MS, resultou em sete compostos identificados pelos dois métodos. Entre esses compostos, apresentados na Tabela 5.3, apenas dois tiveram frequência modificada maior que 50%: 2-nonen-1-al e δ -cadineno. Assim, os principais aromas percebidos pelos avaliadores no óleo essencial da *A. mearnsii* não tiveram sua composição química identificada.

Tabela 5.3. Compostos do óleo essencial identificados por GC-MS e olfatomia.

Composto ^a	IR ^b	Descrição	FM (%)
α -Pineno	930	vegetal/refrescante	22
orto-Cimeno	1026	pútrido	38
n-Nonanal	1108	doce/diversos	38
2-Nonen-1-al	1155	floral/doce	61
Safranal	1205	defumado/fumaça	42
α -Copaeno	1368	vegetal / refrescante	47
δ -Cadineno	1513	vegetal/defumado	55

^a = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007).

^bIR = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos após análise em cromatógrafo Perkin Elmer com detecção por chama (FID).

Entre os compostos que tiveram seu aroma e composição química identificados se destacaram os compostos alifáticos. A composição dos óleos essenciais é responsável por suas propriedades organolépticas tal como aroma intenso e agradável, característica atribuída principalmente aos mono e sesquiterpenos (WOLFFENBÜTTEL, 2011). Os aldeídos também costumam apresentar odor agradável, sendo comumente usados em perfumes; com cheiro intenso, são os responsáveis pelo odor da lima (*Citrus aurantifolia* Swingle), por exemplo (CHISHOLM *et al.*, 2003). Os aldeídos de cadeia longa normalmente apresentam um aroma agradável e suave de frutas e flores, sendo que o 2-nonenal contribui com o aroma do café solúvel, por exemplo, conferindo-lhe uma nota de madeira e de bebida fresca e, ao mesmo tempo reduzindo notas ácidas (MOREIRA *et al.*, 2000).

Os sete compostos identificados já foram relatados em outros aromas. O monoterpeneo α -pineno, caracterizado na análise olfatométrica como “refrescante” é comum em sucos de frutas, como o suco de laranja (LOPEZ-CARBALLO *et al.*, 2005). Além desse composto, o-cimeno e nonanal, presentes no óleo essencial da *A. mearnsii*, são relatados na composição do aroma da laranja (HÖGNADÓTTIR *et al.*, 2003). Nos aromas de tomilho e de cogumelos selvagens também foram identificados α -pineno e o-cimeno (BREHERET *et al.*, 1997; ÖZCAN & CHALCHAT, 2004).

O composto α -copaeno, por sua vez, foi relatado como ativo na essência da goiaba (JORDÁN *et al.*, 2003). No odor do trigo sarraceno foi identificado o do nonenal (JANES *et al.*, 2009). O δ -cadineno foi verificado no aroma do óleo de copaíba (SANT’ANNA *et al.*, 2007), enquanto o safranal é considerado o principal constituinte do aroma do óleo essencial de *Crocus sativus* (REZAEI & HOSSEINZADEH, 2013).

A maioria dos compostos identificados no aroma do óleo essencial das flores da *A. mearnsii* estava em baixa concentração, segundo as áreas relativas do cromatograma. A independência da intensidade do aroma de um composto em relação à sua concentração foi verificada também por Xavier *et al.* (2013).

Além disso, aromas com uma FM significativa não tiveram sua composição identificada o que pode ter ocorrido devido a uma concentração muito baixa desses compostos. Os principais aromas presentes, em termos de intensidade,

considerando a FM, foram descritos pelos avaliadores como castanha/defumado (FM=93%) e café (FM= 75%). Entre os aromas sem a composição química definida, também foram verificados: vegetal (FM=69%) e vegetal/terra (FM= 51%), doce/floral (FM=66%), defumado (FM=64%) e defumado/fumaça (FM=44%). Mesmo não sendo quimicamente identificados, todos esses compostos apresentaram aromas que contribuem para a caracterização do aroma global do óleo essencial das flores da *A. mearnsii*.

5.8. Otimização do rendimento da extração com fluido supercrítico

Para otimizar o rendimento da extração supercrítica, foram avaliados, por meio de planejamento fatorial 2², os efeitos das variáveis pressão do CO₂ e da composição do cossolvente (água, etanol ou mistura dos dois). Com essas variações das condições experimentais, o rendimento variou entre 1,25 e 2,49 % (m/m), sendo o menor rendimento observado para a extração a 120 bar e utilizando água como cossolvente, enquanto o maior rendimento foi obtido a 240 bar com etanol como cossolvente.

Os dados do planejamento fatorial foram processados utilizando o *software* estatístico Minitab[®], sendo realizada a análise de variância (ANOVA) e a estimativa dos coeficientes para um modelo linear que representa a relação entre as variáveis testadas e a resposta, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.4 e Tabela 5.5, respectivamente.

Tabela 5.4. Análise de variância para o rendimento (% m/m).

Fator	gl	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Efeitos principais	2	0,77171	0,771707	0,385854	348,30	0,003
P	1	0,43313	0,433129	0,433129	390,98	0,003
% EtOH	1	0,33858	0,338579	0,338579	305,63	0,003
Interação	1	0,01485	0,014854	0,014854	13,41	0,067
P *% EtOH	1	0,01485	0,014854	0,014854	13,41	0,067
Erro residual	2	0,00222	0,002216	0,001108		
Erro puro	2	0,00222	0,002216	0,001108		
Total	6	1,19358				

Tabela 5.5. Efeitos e coeficientes estimados para o rendimento (% m/m).

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	p
Constante		1,81281	0,01664	108,93	0,000
P	0,65813	0,32906	0,01664	19,77	0,003
% EtOH	0,58188	0,29094	0,01664	17,48	0,003
P *% EtOH	0,12188	0,06094	0,01664	3,66	0,067
Ponto central		0,48594	0,02542	19,12	0,003
S = 0,00665676		R ² = 99,81%	R ² (ajust.) = 99,44%		

Conforme os dados da ANOVA, a pressão e o percentual de etanol na composição do cossolvente são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) considerando um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$). Já a interação, não interferiu significativamente no rendimento do extrato, de acordo com o índice descritivo (valor p) de 0,067%.

Aplicando-se a regressão linear, foram obtidos os coeficientes apresentados na Tabela 5.5, sendo o modelo ajustado, para variáveis não codificadas, expresso pela equação 5.1:

$$RE (\% \text{ m/m}) = 1,81281 + 0,32906 \times P + 0,29094 \times CO + 0,06094 \times P \times CO \quad (5.1)$$

Na equação, RE representa o rendimento da extração e P e CO correspondem aos valores codificados das variáveis pressão e cossolvente, respectivamente.

O modelo ajustado representa bem os dados experimentais, apresentando coeficiente de determinação R^2 igual a 0,9981. O coeficiente de determinação ajustado apresenta o valor de 0,9944 e significa que apenas 0,56% das variações não são explicadas pelo modelo. O ajuste do modelo aos dados pode também ser observado na Tabela 5.6, na qual são apresentados os valores experimentais e calculados para o rendimento do produto extraído.

Tabela 5.6. Rendimento experimental e calculado dos extratos obtidos com fluido supercrítico.

Variáveis				Respostas		
Pressão P	P (variável codificada)	Cossolvente CO	CO (variável codificada)	Massa de extrato (g)	Rendimento (% m/m) experimental	Rendimento (% m/m) calculado
120 bar	-1	H ₂ O	-1	1,003	1,2537	1,2537
240 bar	1	H ₂ O	-1	1,432	1,7900	1,7900
120 bar	-1	Etanol	1	1,371	1,7137	1,7137
240 bar	1	Etanol	1	1,995	2,4938	2,4938
180 bar	0	Etanol/H ₂ O (50% v/v)	0	1,814	2,4825	2,2988
180 bar	0	Etanol/H ₂ O (50% v/v)	0	1,867	2,2675	2,2988
180 bar	0	Etanol/H ₂ O (50% v/v)	0	1,836	2,3337	2,2988

A seguir, a superfície de resposta e as curvas de nível dadas pela equação 5.1 são apresentadas na Figura 5.12 e Figura 5.13, respectivamente.

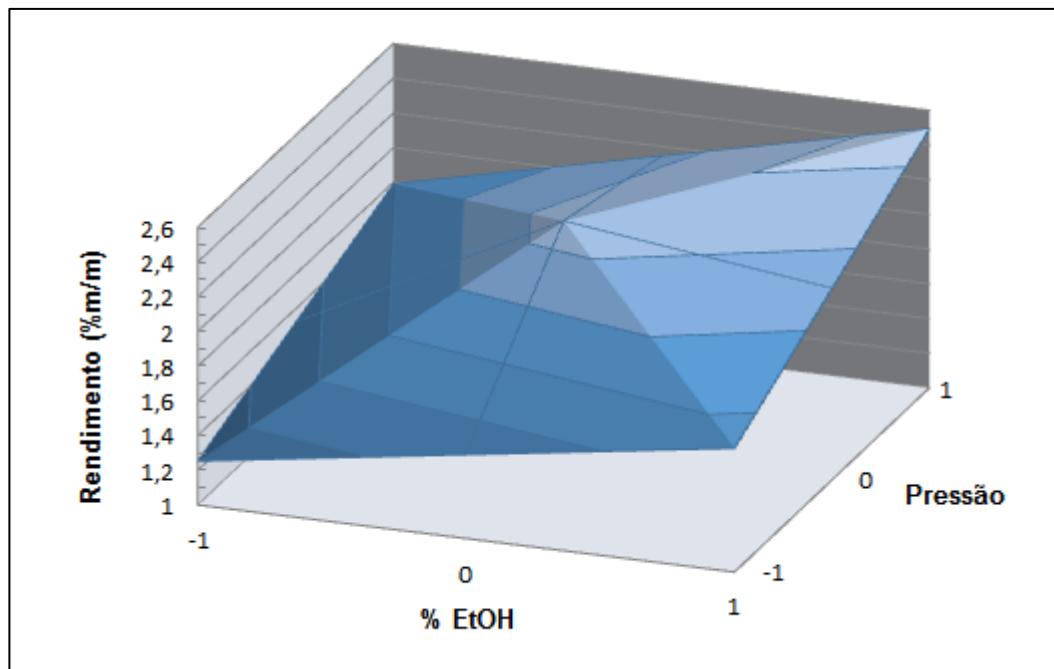


Figura 5.12. Superfície de resposta para o rendimento da extração em função das variáveis (codificadas) pressão e cossolvente (% EtOH).

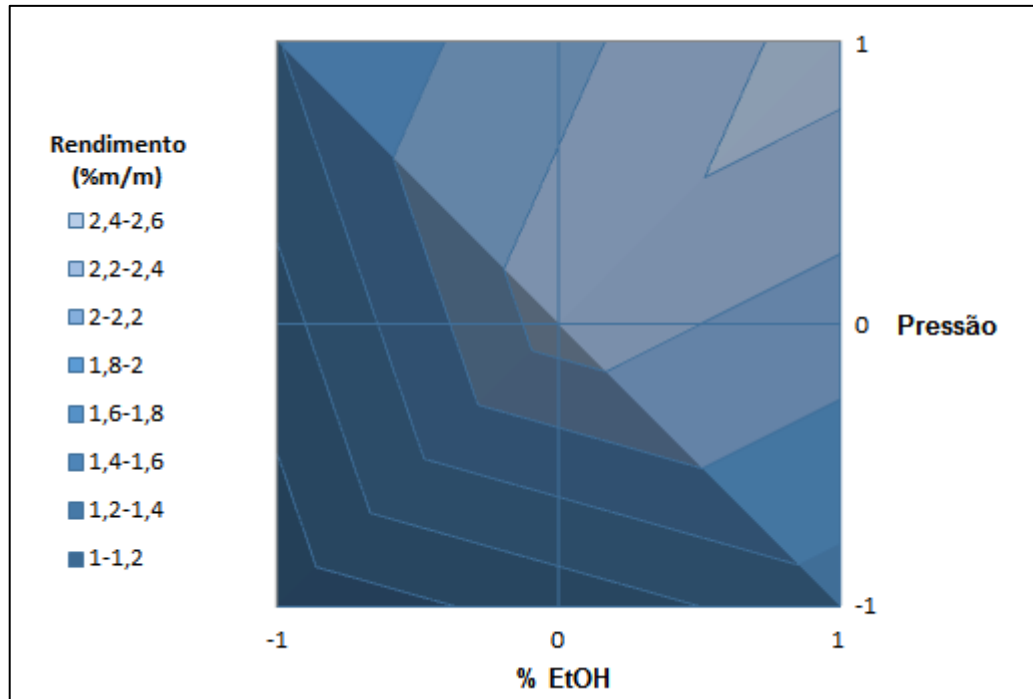


Figura 5.13. Curvas de nível para o rendimento da extração em função das variáveis (codificadas) pressão e cossolvente (% EtOH).

Os dados representados pela superfície de resposta evidenciam uma ascendência do rendimento percentual de extrato com o aumento da pressão do fluido supercrítico e utilização de etanol como cossolvente, caracterizando uma região de rendimento máximo. Assim, com base nos intervalos estudados, foi definida como melhor condição para o procedimento de extração supercrítica, a partir das flores da *A. mearnsii*, os seguintes parâmetros: pressão de 240 bar e cossolvente etanol puro. Essa condição foi então utilizada para levantamento da curva de extração (rendimento \times tempo), na qual foram aplicados modelos de transferência de massa. Foi observada pouca variação no rendimento da extração no ponto extremo com 240 bar e cossolvente etanol puro frente ao ponto central, 180 bar e cossolvente 50% etanol: 50% água, cujos rendimentos foram 2,49 e 2,30 (% m/m), respectivamente. Entretanto, foi escolhida a condição extrema do planejamento para os estudos da curva de extração, porque além do rendimento ter sido maior, o uso de etanol como cossolvente facilita a secagem do extrato, a qual é mais dispendiosa quando o cossolvente contém água.

5.9. Modelagem matemática do processo de extração com fluido supercrítico

5.9.1. Curva de extração - modelo 1

As equações do modelo 1 (Crank, 1975) foram inseridas no *software* Matlab[®], no qual, foram estimados os valores dos parâmetros D e L e, em seguida, foram calculados os respectivos valores de β_n . Os parâmetros foram otimizados por meio de uma função objetivo para minimização do erro entre os valores experimentais e os calculados. Assim, foi determinada a difusividade igual a $9,53 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, sendo L igual a 0,6038. Com isso, mediante o uso da equação 4.5, foi obtido o valor de $5,70 \times 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ para o coeficiente de proporcionalidade. A curva experimental, obtida em triplicata, e o ajuste pelo modelo são apresentados na Figura 5.14.

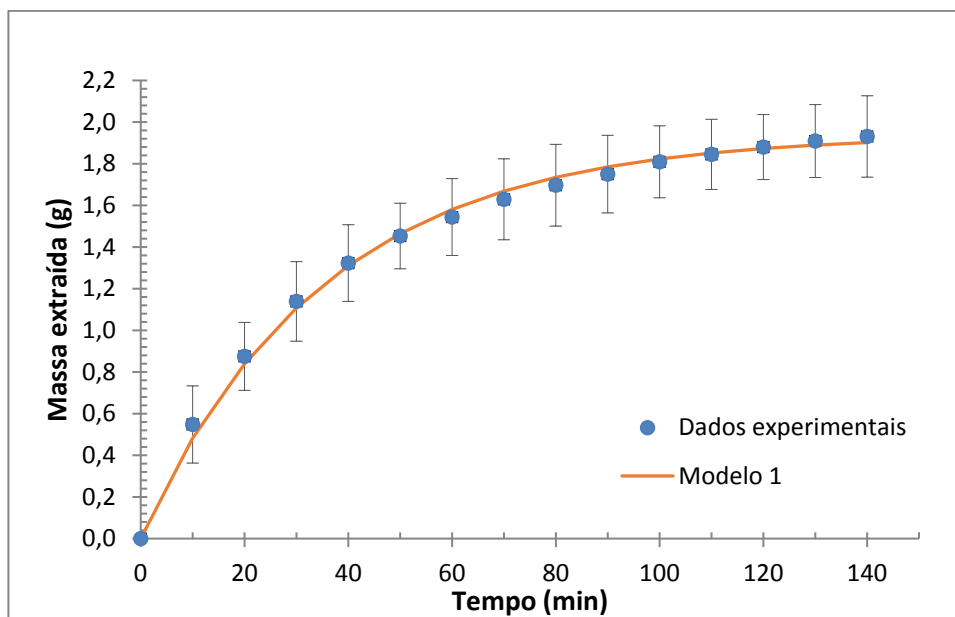


Figura 5.14. Curva de rendimento da extração – modelo de Crank.

O modelo apresentado na Figura 5.14 teve um ajuste satisfatório aos dados experimentais, apresentando um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9992.

5.9.2. Curva de extração - modelo 2

O sistema de equações do modelo 2 (Sovová, 1994) também foi resolvido utilizando a ferramenta computacional Matlab[®]. Nesse modelo são estimados quatro parâmetros: Z, W, x_k e y_r , os quais foram otimizados pela minimização da soma dos

erros quadráticos entre os dados experimentais e dados calculados, através do método Nelder-Mead simplex (Lagarias *et al.*, 1998). Assim, foram estimados $Z=0,1751$; $W=0,1171$; $x_k=0,0149$; $y_f=0,0256$. Após a determinação desses parâmetros, através das equações 4.16 e 4.17, foram determinados os coeficientes de transferência de massa para a fase sólida e a fase fluida: $k_s= 8,76 \times 10^{-9} \text{ m.s}^{-1}$ e $k_f= 1,28 \times 10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$, respectivamente. Os valores encontrados para os coeficientes de transferência de massa são coerentes, considerando a ordem de grandeza, com os valores estimados em outros trabalhos que empregaram o modelo no ajuste de dados experimentais de extração com fluido supercrítico a partir de matrizes vegetais. Por exemplo, no processo extrativo a partir de *Ilex paraguariensis* St. Hill., Silva (2016) estimou $k_s= 2,78 \times 10^{-9} \text{ m.s}^{-1}$ e $k_f= 1,31 \times 10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$ considerando dados de extração a 100 bar e 40°C; para a extração a partir de *Lycopodium clavatum*L., a 300 bar e 40°C, foram estimados $k_s= 3,15 \times 10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$ e $k_f= 1,02 \times 10^{-7} \text{ m.s}^{-1}$ (SILVA, 2014).

A curva de extração ajustada pelo modelo 2 representou muito bem os dados de rendimento reais. O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9984 e a curva modelada é apresentada na Figura 5.15.

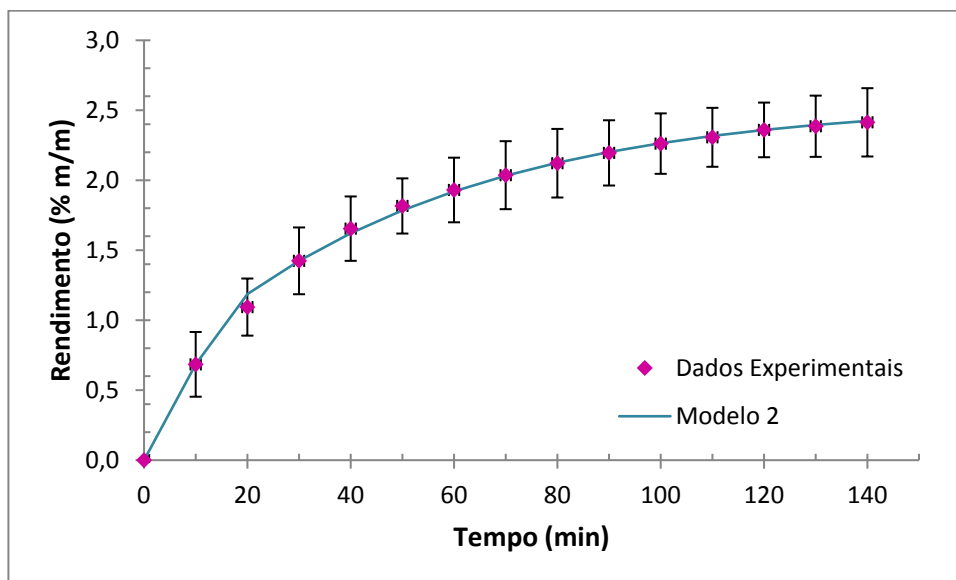


Figura 5.15. Curva de rendimento da extração – modelo de Sovová.

5.10. Separação de constituintes do extrato obtido com fluido supercrítico

As amostras obtidas por extração com fluido supercrítico, brutas e após etapas de separação por cromatografia em coluna, foram submetidas a análises por HPLC e CCD.

Inicialmente, os 7 extratos obtidos conforme delineamento do planejamento fatorial (conforme Tabela 4.1) foram analisados por HPLC com detector U.V., sendo que todos apresentaram um mesmo composto majoritário, com tempo de retenção de aproximadamente 10,6 min, conforme figuras a seguir (Figuras 5.16 – 5.22). Sob as mesmas condições também foram analisados os padrões ácido ferúlico, ácido p-cumárico, apigenina, canferol, naringenina, quercetina e rutina, porém nenhum destes foi identificado no extrato.

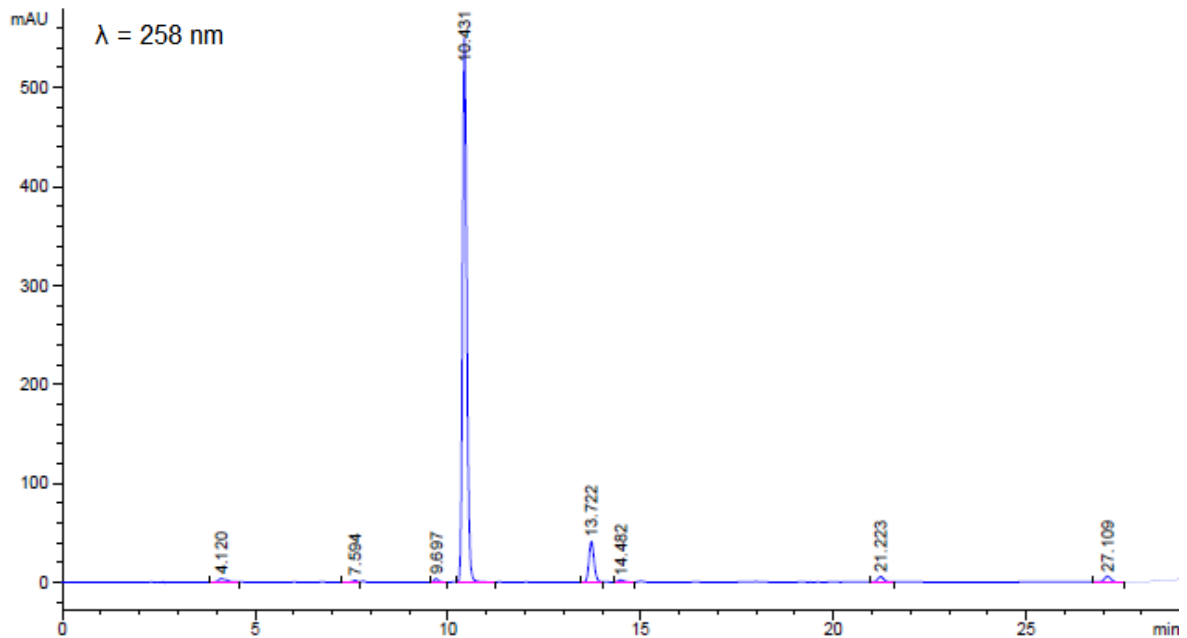


Figura 5.16. Cromatograma do extrato 1 (P= 120 bar, cossolvente: água).

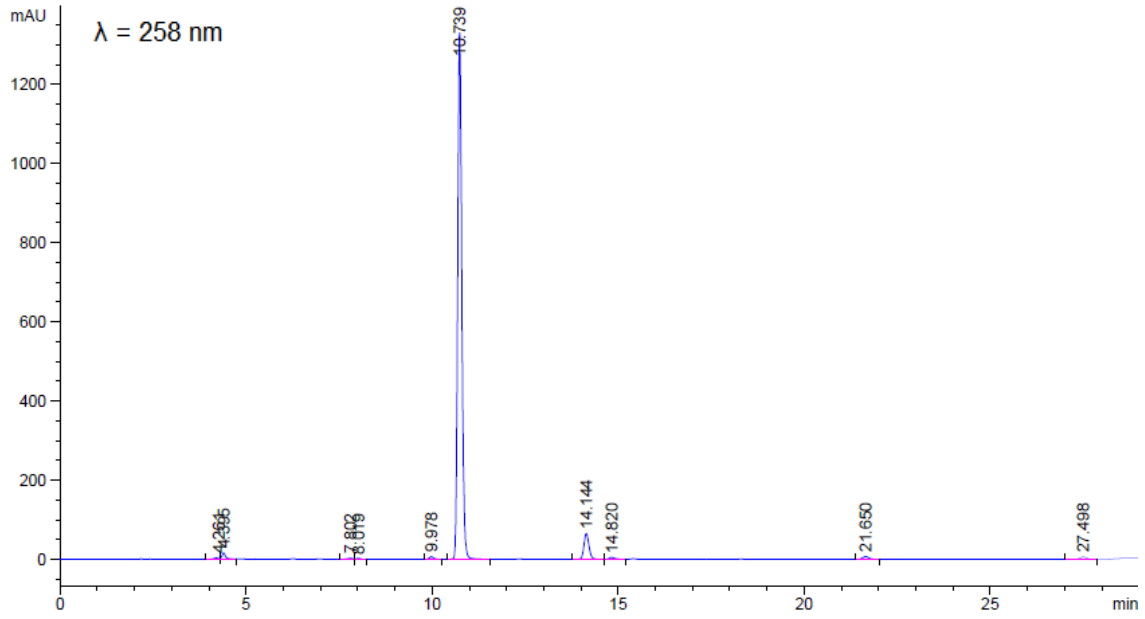


Figura 5.17. Cromatograma do extrato 2 (P= 120 bar, cossolvente: etanol).

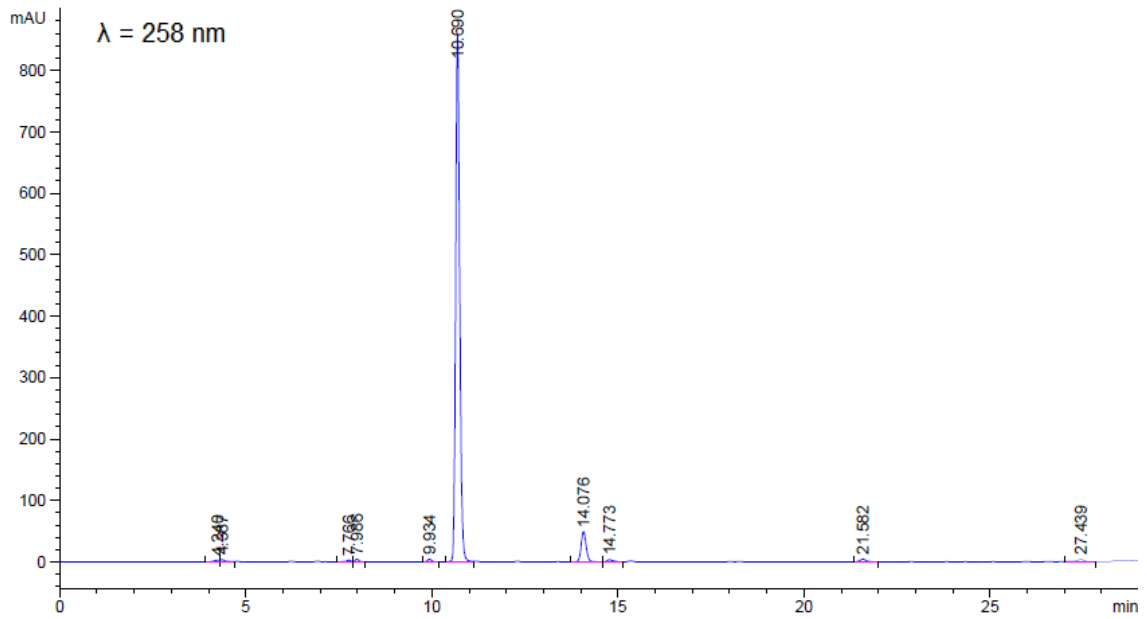


Figura 5.18. Cromatograma do extrato 3 (P= 240 bar, cossolvente: água).

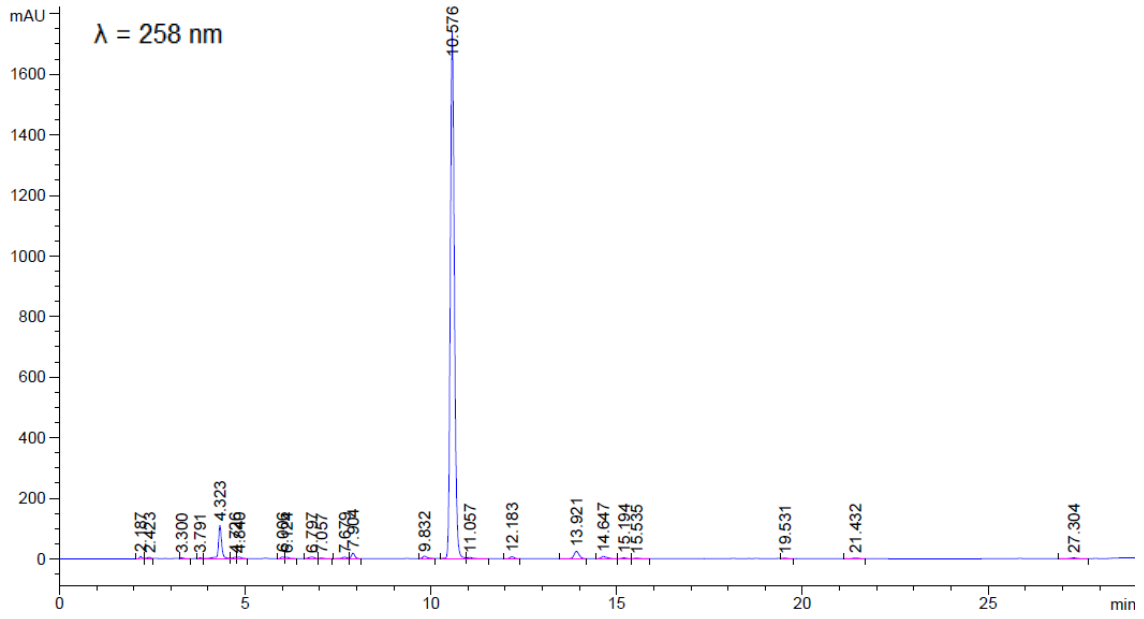


Figura 5.19. Cromatograma do extrato 4 (P= 240 bar, cossolvente: etanol).

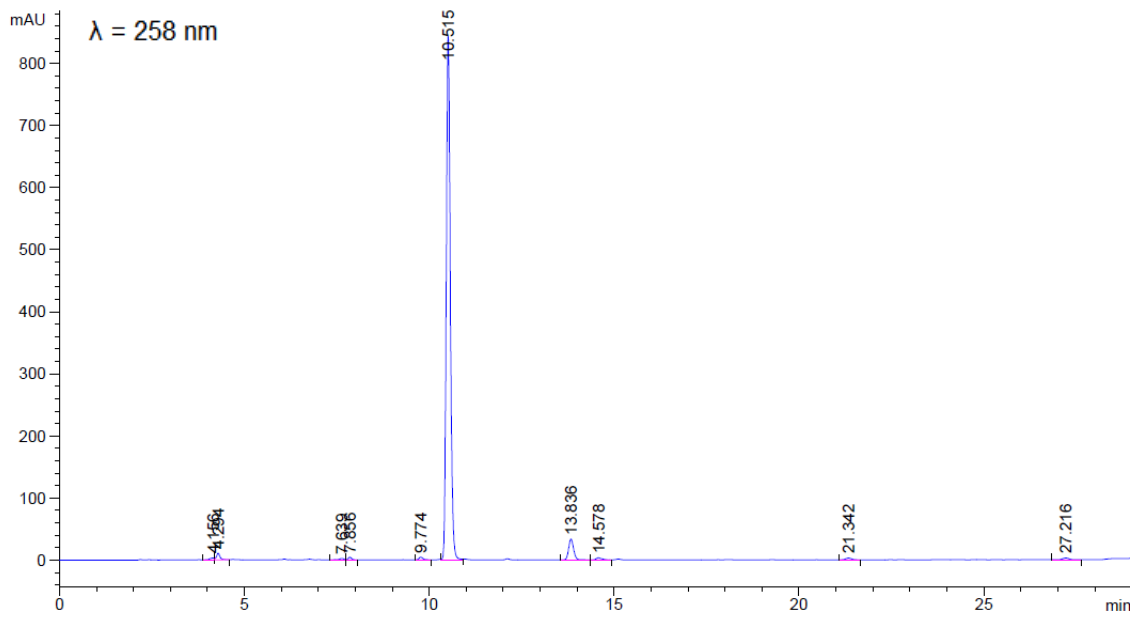


Figura 5.20. Cromatograma do extrato 5 (P= 180 bar, cossolvente: etanol:água).

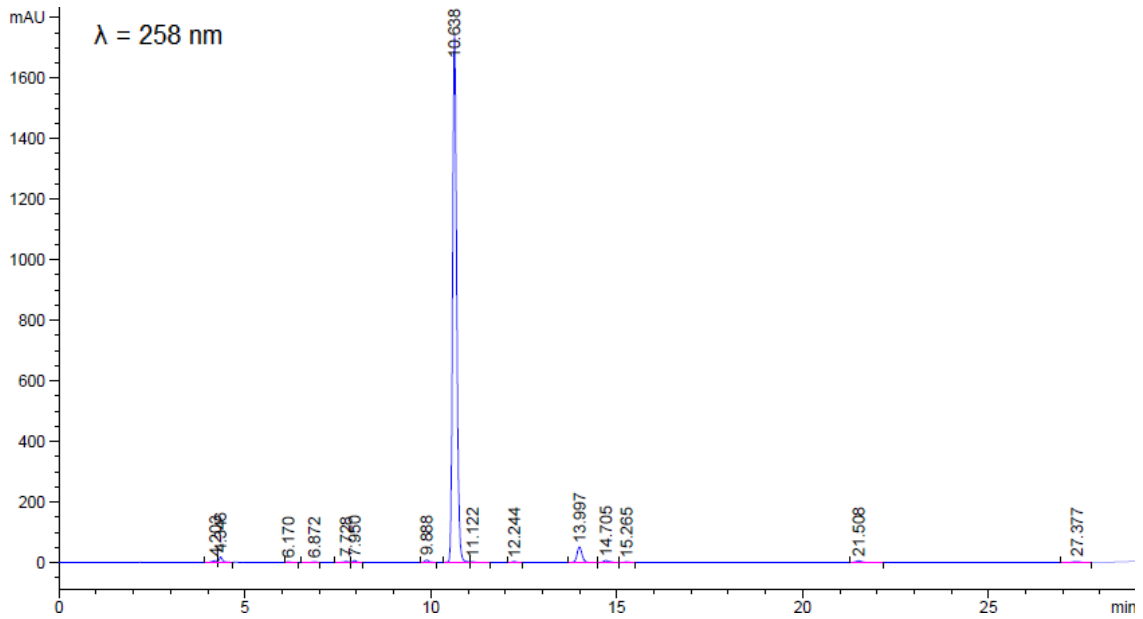


Figura 5.21. Cromatograma do extrato 6 (P= 180 bar, cossolvente: etanol:água).

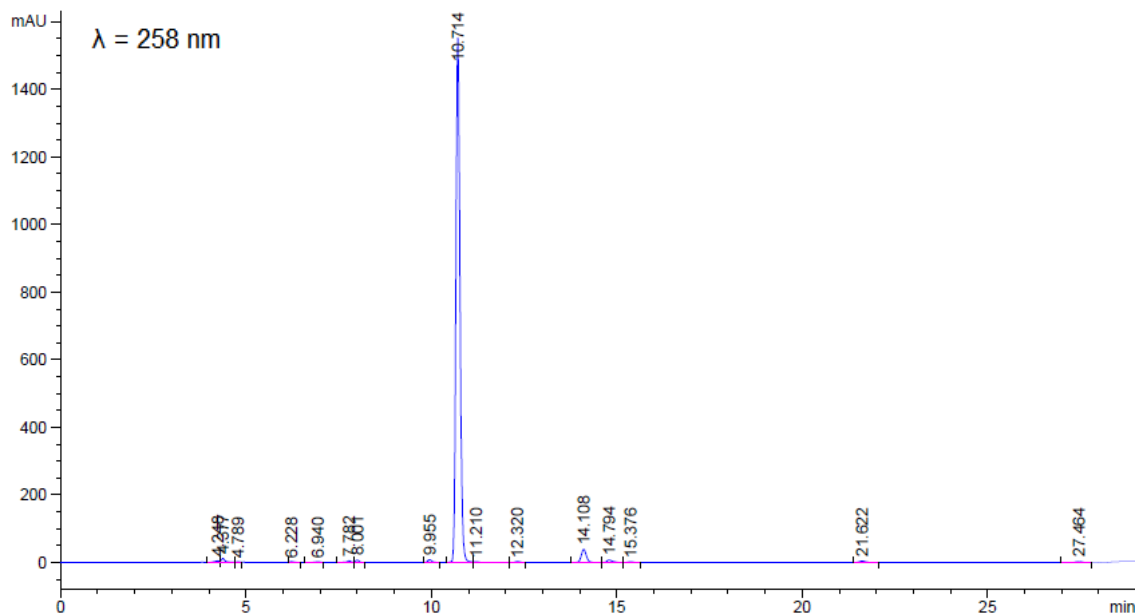


Figura 5.22. Cromatograma do extrato 7 (P= 180 bar, cossolvente: etanol:água).

Devido à similaridade entre os cromatogramas, para as etapas de separação e identificação química foi selecionado apenas um extrato. As etapas seguintes foram realizadas com o extrato 5, obtido a 180 bar utilizando solução etanol-água (50% v/v) como cossolvente. O extrato 5 foi escolhido por apresentar

maior massa, uma vez que a extração foi repetida por tratar-se do ponto central do planejamento fatorial, e, também, devido ao resultado nos testes antimicrobianos.

5.10.1. Separação cromatográfica de compostos do extrato obtido com fluido supercrítico

O extrato 5 foi submetido à separação em coluna cromatográfica a fim de purificar o composto eluído com tempo de retenção de 10,6 min na análise por HPLC. As frações obtidas foram analisadas por CCD e HPLC, cujos resultados demonstram que a maioria dos compostos foram extraídos com acetato de etila, inclusive o composto eluído em 10,6 min, conforme é apresentado nas figuras 5.23 e 5.24.

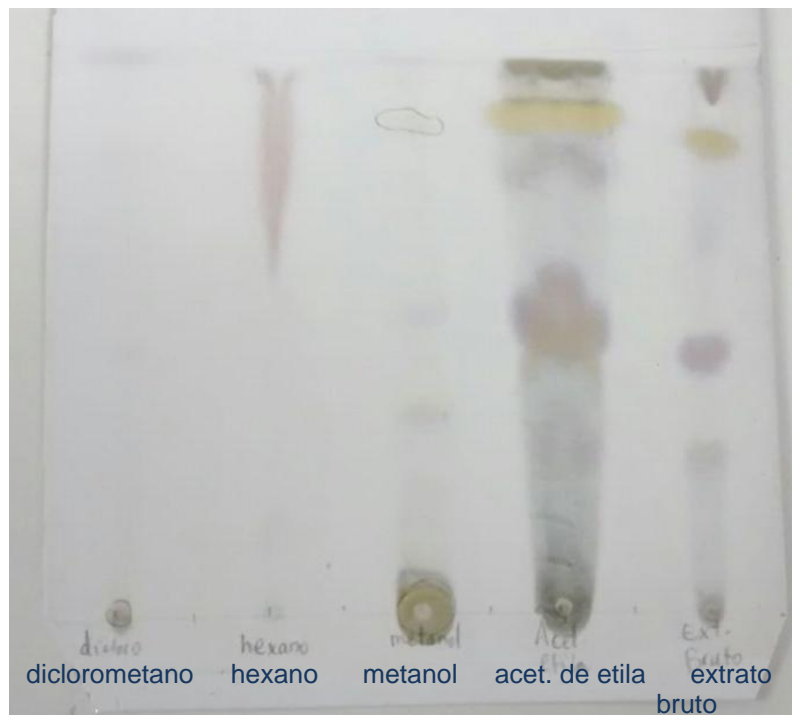


Figura 5.23. CCD após fracionamento em coluna do extrato 5 (revelador: vanilina sulfúrica).

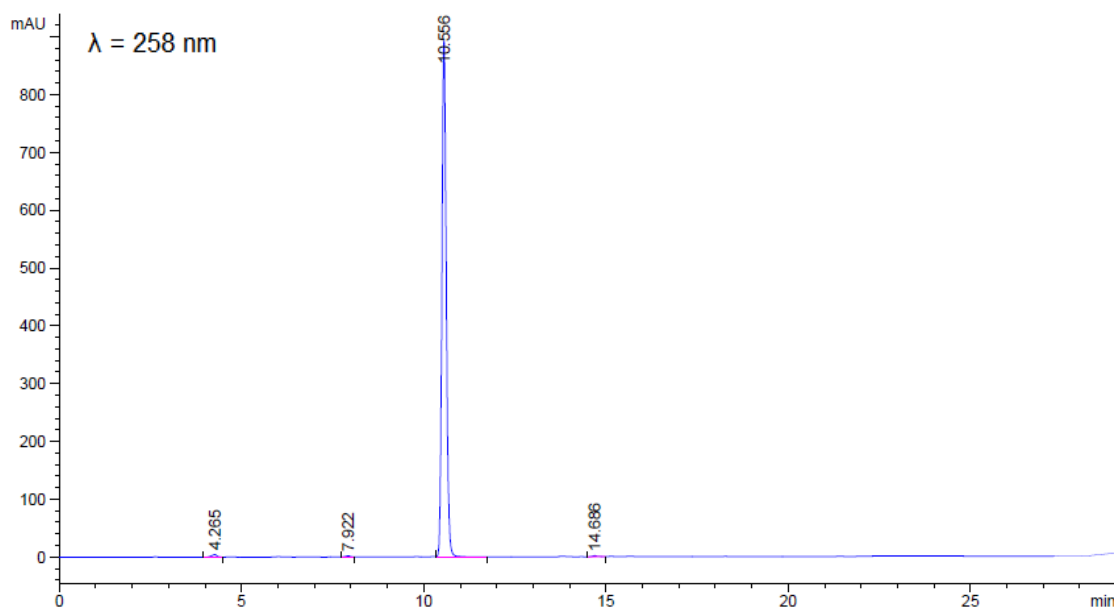


Figura 5.24. Cromatograma da fração acetato de etila.

A fração obtida com acetato de etila foi submetida a novo fracionamento, sendo obtidas 10 frações. Com isso, o composto eluído em 10,6 min ficou concentrado nas frações 4 e 5; resultado evidenciado na Tabela 5.7, na qual são apresentadas as áreas relativas do referido composto nas 10 frações.

Tabela 5.7. Áreas percentuais cromatográficas do composto eluído em 10,6 min.

Amostra	Área % do composto eluído em 10,6 min
Extrato bruto	91,45
Fração acetato de etila	99,01
Fração 4	98,07
Fração 5	98,33
Fração 6	35,60
Frações 1, 2, 3, 7, 8, 9 e 10	não detectado

Já na fração 2, foi recolhido um composto que na CCD, após revelação com vanilina, apresentou coloração laranja, porém não foi verificado na análise por HPLC com as condições utilizadas. Tais frações, 2 e 4, foram as utilizadas nos testes antimicrobianos, apresentados no capítulo 5.11.

A imagem da CCD, e dos cromatogramas das frações 4 e 5 são apresentadas a seguir nas Figuras 5.25, 5.26 e 5.27.

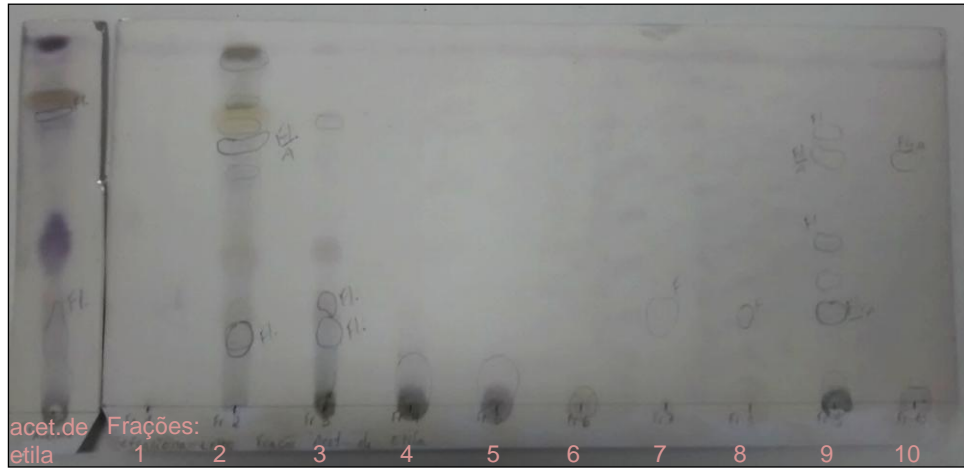


Figura 5.25. CCD após fracionamento da fração extraída com acetato de etila (revelador: vanilina sulfúrica).

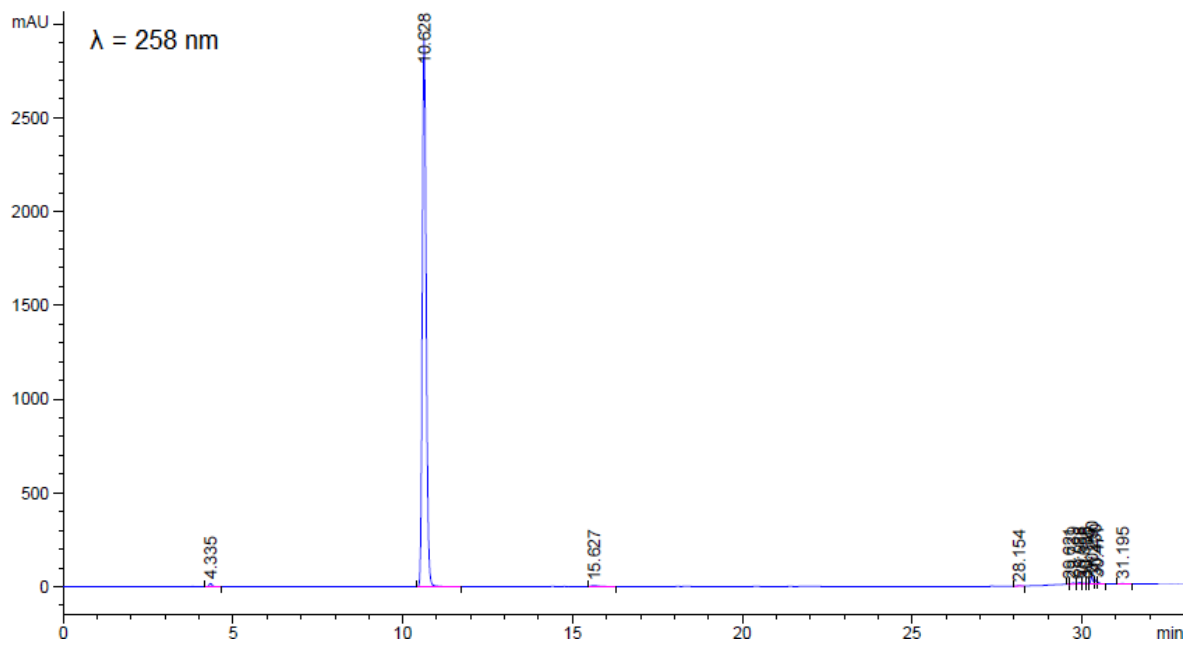


Figura 5.26. Cromatograma da fração 4 (fase móvel 40% hexano : 60% acetato de etila).

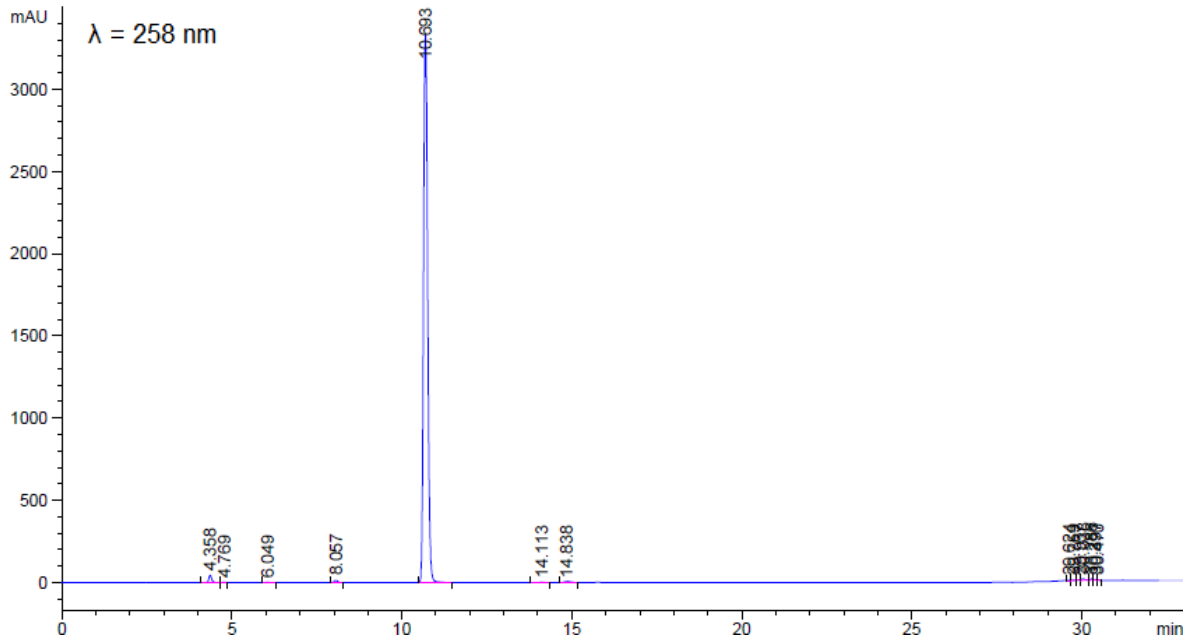


Figura 5.27. Cromatograma da fração 5 (fase móvel 20% hexano : 80% acetato de etila).

A fração 2 foi submetida a um novo refractionamento em coluna, no qual foram recolhidas 80 frações. Amostras em um intervalo de 5 em 5 foram analisadas por CCD (Figura 5.28), sendo identificado o composto de banda laranja na fração 20 e um composto de banda roxa na fração 25.

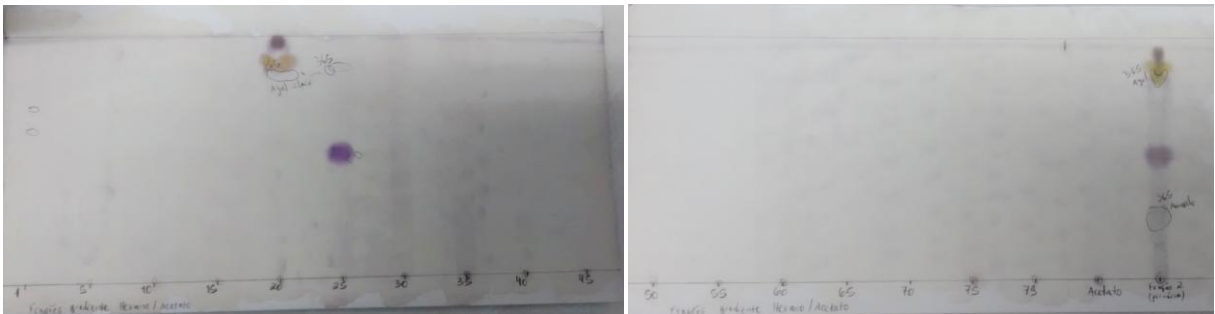


Figura 5.28. CCD das frações após separação em coluna com gradiente de Hexano/Acetato de etila (revelador: vanilina sulfúrica).

5.11. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato obtido com fluido supercrítico

As 7 amostras obtidas por extração com fluido supercrítico, de acordo com o delineamento do planejamento fatorial (Tabela 4.1), foram avaliadas preliminarmente pelo método da bioautografia indireta frente aos microorganismos gram positivo e

gram negativo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), respectivamente.

Todos os 7 extratos brutos analisados apresentaram ação inibitória contra *S. aureus*, enquanto nenhum apresentou atividade contra *E. coli*. No trabalho de Andrade *et al.* (2005), também foi relatada inibição do crescimento de *S. aureus* frente ao extrato etanólico bruto e à fração acetato de etila do extrato das flores de *Acacia podalyriifolia*; a determinação foi apenas qualitativa. De forma similar aos extratos das flores de *A. mearnsii* obtidos com fluido supercrítico, não foi relatada ação inibitória desses extratos contra *Escherichia coli*.

Assim, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) apenas para *S. aureus*. Os valores de CIM foram determinados para os extratos brutos e para algumas frações obtidas por separação em coluna cromatográfica, as quais foram selecionadas com base nos resultados das análises por CCD e HPLC. Os resultados de CIM são exibidos a seguir na Tabela 5.8 e nas Figuras 5.29 a 5.31.

Tabela 5.8. Concentrações inibitórias mínimas dos extratos supercríticos e de suas frações.

Amostra	CIM (mg.mL ⁻¹)
Extrato 2 (P= 120 bar; cossolvente: etanol)	24
Extrato 7 (P= 180 bar; cossolvente: H ₂ O : etanol 50% v/v)	24
Extratos 1; 3; 4; 5 e 6	> 24
Fração acetato de etila	59,2
Fração 2 (fase móvel 80% hexano : 20% acetato de etila)	35,9
Fração 4 (fase móvel 60% hexano : 40% acetato de etila)	11,8

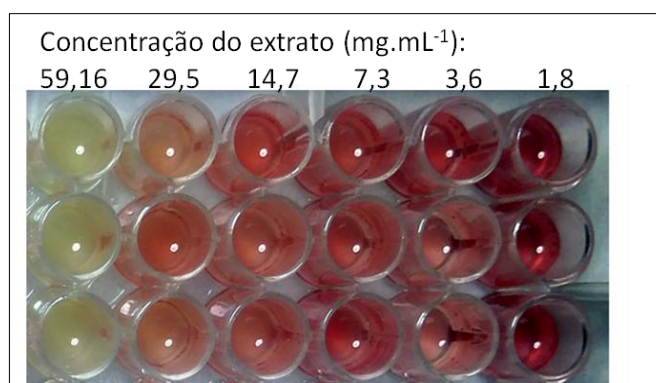


Figura 5.29. Teste de CIM com a fração acetato de etila.

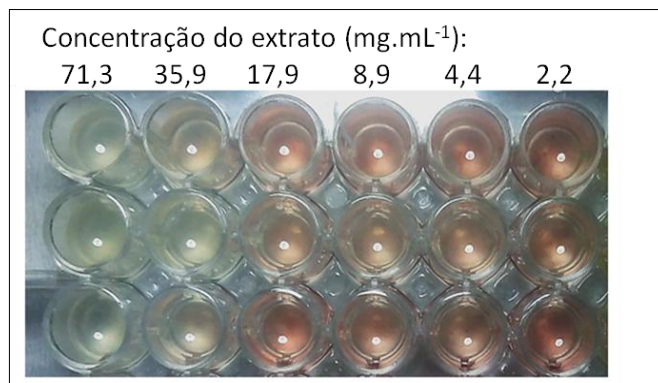


Figura 5.30. Teste de CIM com a fração 2.

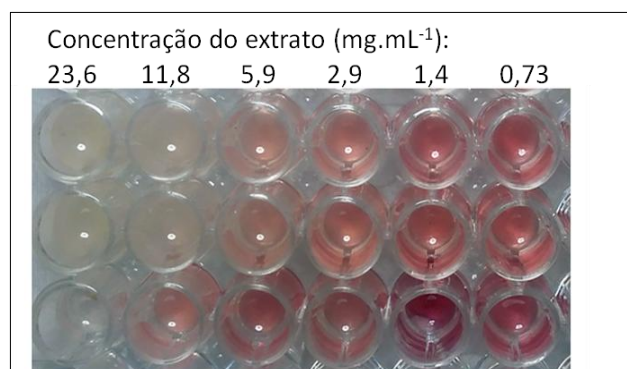


Figura 5.31. Teste de CIM com a fração 4.

Os extratos obtidos a 180 bar com solução etanol:água como cossolvente e a 120 bar com etanol como cossolvente apresentaram CIM igual a 24 mg.mL⁻¹, enquanto os demais extratos brutos apresentaram CIM superior a máxima concentração testada de 24 mg.mL⁻¹. Para as frações testadas, as CIM foram de 59,2 mg.mL⁻¹ para a fração acetato de etila, 35,9 mg.mL⁻¹ para a fração 2 e 11,8 mg.mL⁻¹ para a fração 4. Esses resultados sugerem que a concentração de determinado composto interfere diretamente na ação frente ao microorganismo. Conforme os resultados apresentados no capítulo anterior, um composto majoritário foi eluído em aproximadamente 10,6 min na análise por HPLC, o qual foi separado na denominada fração 4. Assim, como a fração 4 apresentou a menor CIM entre as amostras testadas, pode-se sugerir que o composto observado nos cromatogramas é capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*.

Enquanto os extratos brutos da *A. mearnsii* apresentaram CIM igual ou superior a 24 mg.mL⁻¹, e o melhor resultado obtido fracionando o extrato foi de CIM

igual a $11,8 \text{ mg.mL}^{-1}$, Brito e colaboradores (2001) relataram que os antimicrobianos cefalotina, eritromicina, gentamicina, norfloxacin e oxacilina, comumente utilizados no tratamento da mastite bovina, apresentaram CIM iguais ou inferiores a $1,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *S. aureus*. Ainda assim, apesar da CIM dos extratos das flores da *A. mearnsii* obtidos com fluido supercrítico ser elevada, esse resultado pode indicar a utilização do extrato combinado com antibióticos sintéticos ou clássicos. Principalmente devido à resistência desenvolvida por bactérias contra medicamentos, torna-se importante a combinação de compostos naturais com antibióticos, pois são potenciais agentes modificadores contra a resistência de bactérias infecciosas multi-resistentes a medicamentos. Os extratos de *Solanum paludosum* Moric. obtidos por processo com fluido supercrítico, testados por Siqueira (2010), não apresentaram atividade antibacteriana, porém apresentaram atividade moduladora reduzindo a CIM de antibióticos em até oito vezes. De modo semelhante, extratos de *Plectranthus ornatus* também foram capazes de reduzir em até oito vezes a CIM dos antibióticos ampicilina, canamicina e gentamicina (SILVA, 2012).

Os autores Olajuyigbe & Afolayan (2012) testaram o efeito do extrato metanólico da casca da *A. mearnsii* e seu efeito sinérgico combinado com antibióticos contra 8 bactérias de relevância clínica. Frente a *S. aureus* (ATCC 6538), a concentração inibitória mínima do extrato foi de $0,313 \text{ mg.mL}^{-1}$, sendo que foi verificado sinergismo com os antibióticos eritromicina, metronidazol, amoxicilina, cloranfenicol e canamicina; a ação foi indiferente quando combinado com tetraciclina e ácido nalidíxico e houve antagonismo com ciprofloxacina. Desse modo, apesar de baixo o efeito dos extratos das flores da *A. mearnsii*, há potencial para exploração do uso combinado com drogas tradicionais.

6. CONCLUSÃO

O trabalho investigou a obtenção de extratos das flores de *Acacia mearnsii* através dos processos de destilação por arraste a vapor e extração com fluido supercrítico. Assim, foram obtidos produtos com diferentes características, que foram submetidos a diferentes avaliações.

Através da destilação por arraste a vapor, foram extraídos óleo essencial e extrato aquoso. O óleo essencial apresentou em sua composição principalmente hidrocarbonetos. Na análise olfatométrica, compostos alifáticos foram os principais compostos identificados, sendo que os aromas mais presentes no óleo foram castanha/defumado, café, vegetal e doce/floral.

No extrato aquoso foram identificados diversos compostos fenólicos, os quais contribuem com a elevada atividade antioxidante verificada para o extrato, superior ao padrão utilizado, rutina.

No processo de extração com fluido supercrítico foi estudada a influência da pressão e do uso de cossolventes através de planejamento fatorial. Com isso, verificou-se que tanto pressão como o cossolvente eram significativos, sendo estabelecida como melhor condição de extração, visando o maior rendimento de extrato, pressão de 240 bar e etanol como cossolvente. Segundo o modelo obtido pelo planejamento fatorial, o rendimento resultante seria de 2,49%, sendo o rendimento experimental igual a 2,41%, o que demonstra o bom ajuste do modelo. Essas condições de extração foram utilizadas no levantamento da curva rendimento *versus* tempo, cujos dados foram utilizados na modelagem matemática da transferência de massa. Os dois modelos estudados ajustaram-se muito bem aos dados experimentais, de forma que a difusão é a principal forma de transferência de massa associada à extração das flores da *A. mearnsii*. Através da modelagem da extração, foram obtidos parâmetros importantes na predição do processo, que

tornam possíveis o *scale-up* e a simulação do rendimento da extração alterando as condições experimentais como, por exemplo, volume do extrator, porosidade do leito, vazão de CO₂, entre outras

Além do estudo do processo, o extrato obtido pela extração supercrítica foi avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *E. coli*, apresentando ação apenas para as bactérias gram positivo. Além do extrato bruto, foram utilizadas diferentes frações, separadas através de cromatografia em coluna, na determinação da concentração inibitória mínima. Assim, verificou-se uma maior ação, e menor CIM, para uma das frações isoladas, sugerindo um efeito dependente da concentração de determinado composto.

Desse modo, conclui-se que as flores de *Acacia mearnsii* apresentam potencial para que sejam utilizadas na obtenção de um co-produto das cadeias produtivas que utilizam as demais partes da planta como matéria-prima. Até a execução deste estudo, não foram encontrados dados na literatura sobre extratos das flores da *A. mearnsii*. Assim, a partir desse trabalho, estudos mais profundos poderão formular produto(s) comercial(is), explorando as propriedades aqui evidenciadas, tais como poder aromático, atividade antioxidante e ação antimicrobiana. Tanto o processo por destilação por arraste a vapor como a extração com fluido supercrítico demonstraram viabilidade técnica para a obtenção de diferentes produtos a partir das flores da *A. mearnsii*.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Identificação química dos compostos do extrato obtido pela extração com fluido supercrítico; análise das frações isoladas por técnicas de elucidação (LC-MS/MS, RMN,...).

- Testes antimicrobianos do extrato obtido com fluido supercrítico combinado com drogas convencionais e avaliação frente a outros microorganismos, como, por exemplo, *Staphylococcus epidermidis*, o qual representa um dos principais agentes causadores de infecções hospitalares.

- Comprovação da identificação dos compostos verificados no extrato aquoso através da análise e comparação com padrões.

- Isolamento e identificação dos compostos do extrato aquoso com ação antioxidante.

- Comparação dos aromas identificados no óleo essencial obtido da planta seca com o aroma da planta fresca utilizando SPME; avaliação por especialistas quanto ao potencial uso do óleo essencial na perfumaria.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012**. Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Brasília, DF, 2013. 144 p. Disponível em: < <http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-ABRAF13-EN.pdf>>. Acesso em: 10 jul 2017.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4^o edition. Illinois: Allure. 804 p., 2007.
- AFANAS'EV, I.B.; DOKOZHKO, A.I.; BRODSKIX, A.V.; KOSTYUK, V.A.; POTAPOVITCH, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n.11, p. 1763-1769, 1989.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1041-1047, 2002.
- AMIN, M.U.; KHURRAM, M.; KHATTAK, B.; KHAN, J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, p. 1-12, 2015.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1015-1025, 1999.
- ANDRADE, C.A.; SILVA, V.C.; PEITZ, C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V. A. Revisão do gênero *Acacia* - atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 1, p. 47-56, 2003.
- ANDRADE, C.A. *et al.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.
- ANDRADE, C.A. **Estudo químico e biológico das flores e das folhas de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae – Mimosoideae**. Curitiba. 2010. 215 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Brasil.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007 .

ANNAPURNA, A.; REDDY, C.S.; AKONDI, R.B.; RAO, S.R.C. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 1-10, 2009.

ARORA, A., MURALEEDHARAN, G.N., STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

AVOSEH, O.N.; OYEDEJI, O.O.; AREMU, K.; NKEH-CHUNGAG, B.N.; SONGCA, S.P.; OLUWAFEMI, S.O.; OYEDEJI, A.O. Chemical composition and anti-inflammatory activities of the essential oils from *Acacia mearnsii* de Wild. **Natural Product Research**, v. 29, n. 12, p. 1184-1188, 2015.

BABU, S.P.S. *et al.* Enhancement of membrane damage by saponins isolated from *Acacia auriculiformis*. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 451-454, 1997.

BARREIROS, A. L.; B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BICKING, M.K.L. A simplified experimental design approach to optimization of SFE conditions for extraction of an amine hydrochloride. **Journal of Chromatographic Science**, v. 30, p. 358-360, 1992.

BOLAND, D.J. BROOKER, M.I.H.; CHIPPENDALE, G.M.; HALL, N.; HYLAND, B.P.M.; JOHNSTON, R.D.; KLEINING, D.A.; TURNER, J.D. **Forest trees of Australia**. Melbourne: Nelson-CSIRO. 1984

BLOM, K.F. Estimating the Precision of Exact Mass Measurements on an Orthogonal Time-of-Flight Mass Spectrometer. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 715-719, 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; LEBENSM. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BREHERET, S.; TALOU, T.; RAPIOR, S.; BESSIÈRE, T. Monoterpenes in the Aromas of Fresh Wild Mushrooms (Basidiomycetes). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 831-836, 1997.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.531-537, 2001.

BUSHNELL, O.A.; FUKUDA, M.; TAKASHY, M. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. **Pacific Sc**, v. 4, n. 3, p. 167-183, 1950.

- CARPANEZZI, A.A. Espécies para recuperação ambiental. In: GALVÃO, A.P.M. (Coord.) **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais**. Colombo: Embrapa, 1998. p. 43-53.
- CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 55, p. 57-60, 2006.
- CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BRUN, G.W. Processos de Extração Supercrítica Aplicados a Produtos Naturais. In: Eduardo Cassel; Leandro Machado Rocha. (Org.). **Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapêuticos**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2008. p. 213-228.
- CASSEL, E. *et al.* Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 1, p. 171-176, 2009.
- CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BRUN, G.W.; ALMEIDA, D.E.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 656-661, 2010.
- CASSEL, E.; BEDINOT, C.; VARGAS, R.M.F., **Unidade Piloto de Extração Supercrítica**, 2011 - Privilégio de Inovação PROV020110081175, EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO SUPERCRTICA. 03 de Agosto de 2011(Depósito).
- CASTRO, M.D.L. DE; JURADO-LOPEZ, A.; LUQUE-GARCIA, J.L. Drug Extraction. In: Peter York, Uday B. Kompella, and Boris Y. Shekunov. (Org.). **Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development**. Informa Healthcare, 2004. p. 1-2, 9-16.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. A. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, p. 491-497, 2005.
- CHEN, S.S.; GONG, J.; LIU, F.T; MOHAMMED, U. Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cell activation. **Immunology**, v. 100, p. 471-480, 2000.
- CHEN, H.; MIAO, Q.; GENG, M.; LUI, J.; HU, Y.; TIAN, L.; PAN, J.; YANG, Y. Anti-Tumor Effect of Rutin on Human Neuroblastoma Cell Lines through Inducing G2/M Cell Cycle Arrest and Promoting Apoptosis. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- CHHABRA, S.C;UISO, F.C. A survey of medicine plants of eastern tanzânia for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. **Fitoterapia**, v. 4, p. 307-316, 1990.
- CHISHOLM, M.G.; Wilson, M.A.; Gaskey, G.M. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). **Flavour and Fragrance Journal**; v. 18, p. 106–115, 2003.
- CHOR, C.H. Allelopathic researches in the subtropical vegetation in Taiwan. **Comparative Physiology and ecology**, v. 5, n. 4, p. 222-234, 1980.

- CLIFFORD, T. **Fundamentals of supercritical fluids**. New York, NY: Oxford University Press, 1999. p. 1, 83-85.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. v. 3, 3. ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
- CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. New York, NY: Oxford University Press. 2 ed. 1975. p. 60-61.
- CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.
- DAWN-LINSLEY, M.; EKINCI, F.J.; ORTIZ, D.; ROGERS, E.; SHEA, T.B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **Journal of Neurosciences Method**, v. 141, n. 2, p. 219-222, 2005.
- DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.
- DESCHNER, E.E.; RUPERTO, J.; WONG, G.; *et al.* Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1193-6, 1991.
- DINIZ, A.C.B.; ASTARITA, L.V.; SANTARÉM, E.R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 442-450, 2007.
- DRAVNIKS, A. **Atlas of Odor Character Profiles**. ASTM Data Series 61, Philadelphia, p. 354, 1985.
- DUNLOP, R.W.; GOODRICKE, T.; CLARKE, C.R.E. Open-pollinated family variation in growth, wood, and dissolving pulp properties of *Acacia mearnsii*. **Forest genetics for the next millennium**. 2000, Durban. Proceedings... Pietermaritzburg: ICFR, 2000. p. 103-110.
- DUROUX, L.; DELMOTTE, F. M.; LANCELIN, J. M.; KRAVIS, G.; ALLEMAND, C. Insight into naphthoquinone metabolism: beta-glucosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone beta-D-glucopyranoside. **Biochemical Journal**, v. 333, n. 2, p. 275-283, 1998.
- FALCÃO, M.A., FIANCO, A.L.B., LUCAS, A.M., PEREIRA, M.A., TORRES, F.C., VARGAS, R.M.F., CASSEL, E. Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 405-412, 2012.
- FERRARI, C.K.B. **Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) e colorimetria em 21 alimentos comercializados no município de São Paulo**. São Paulo. 2002. 124 p. Tese (Doutorado em Nutrição). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Brasil.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophan determination proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 01, p. 171-178, 2006.

GARCEZ, J.J. *et al.* Evaluation and mathematical modeling of processing variables for a supercritical fluid extraction of aromatic compounds from *Anethum graveolens*. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 744-741, 2017.

GASPAR, F.; Lu, T.; Santos, R.; Al-Duri, B. Modelling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 25, p. 247-260, 2003.

GEETHA, T.; GARG, A.; CHOPRA, K.; KAUR, I.P. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. **Mutation Research**, v. 556, p. 65-74, 2004.

GHOSH, M. *et al.* Antifilarial effect of two terpenoids isolated from *Acacia auriculiformis*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 31, n. 7, p. 604-606, 1993.

GHOSH, N.K. *et al.* Cestocidal activity of *Acacia auriculiformis*. **Journal of Helminatology**, v. 70, n. 2, p. 171-172, 1996.

GONZAGA, J.V.; MENOCELLI, S.; RECH, B. BUSNARDO, C.A.; FOELKEL, C.E.B. Qualidade da madeira de *Acacia mearnsii* da região de Guaíba-RS. In: **Congresso Florestal Brasileiro**, 4., 1982, Belo Horizonte. Anais... São Paulo: SBS, p. 813-820, 1982.

GOODNER, K.; ROUSEFF, R. **Gas Chromatography/Olfactometry - GC/O Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials**. 3 ed. Hoboken: Wiley, 2011. p. 228.

GRAW, Mc. L. J. *et al.* Prostaglandin synthesis inhibitory activity in Zulu, Xhola and Sotho medicinal plants. **Phytoterapy Research**, v. 11, n.2, 1997.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il Farmaco**, v. 56, p. 683-687, 2001.

GÜLCIN, I.; OKTAY, M.; KIREÇCI, E.; KÜFREVIÖGLU, O. I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, p. 371-382, 2003.

HAGOS, M; SAMUELSSON, G. Quantitative determination of Quracol A, b and (+)-fisetinidol in bark and gum of *Acacia tortilis*. **Acta Pharmaceutica Suecica**, v. 25, n. 6, p. 321-324, 1988.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2 ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HOFFMANN, J.J. *et al.* Potential activity of plants from the southwestern United States. In: **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, n. 2, p. 101-115, 1993.

HÖGNADÓTTIR, A.; ROUSEFF, R.L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 998, p. 201–211, 2003.

HOLLMAN, P.C.H; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-942, 1999.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 589– 598, 2008.

JANES, D.; KANTAR, D.; KREFT, S.; PROSEN, H. Identification of buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) aroma compounds with GC–MS. **Food Chemistry**, v. 112, p. 120-124, 2009.

JORDÁN, M.J; MARGARÍA, C.A.; SHAW, P.E.; GOODNER, K.L. Volatile Components and Aroma Active Compounds in Aqueous Essence and Fresh Pink Guava Fruit Puree (*Psidium guajava* L.) by GC-MS and Multidimensional GC/GC-O. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v. 51, p. 1421-1426, 2003.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. **Food Chemistry**, v. 73, p. 245-250, 2001.

KANNEGIESSER, S.U. Apuntes sobre algunas acacias australianas. 1.- *A. mearnsii* De Wild. **Ciencia e Investigación Forestal**. Santiago, v.4, n.2, p. 198-212, 1990.

KHAN, M.R. *et al.* Studies on African plants: 1-preliminary screening of medicinal plants for antibacterial activity. **Planta Medica**, Suppl., p. 91-7, 1980.

KHAN, M.R. *et al.* Antimicrobial activity of Tanzanian chewing sticks against oral pathogenic microbes. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 3, p. 235-240, 2000.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 50, p.213-218,1999.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. *et al.* Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. **Clinica Chimica Acta**, v. 300, p. 107-117, 2000.

LAGARIAS, J.C.; Reeds, J.A.; Wright, M.H.; Wright P.E. Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions. **SIAM Journal of Optimization**, v. 9, p. 112-147, 1998.

LÓPEZ-CARBALLO, G.; CAVA, D.; LAGARÓN, J.M.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Characterization of the Interaction between two food aroma components, α -pinene and ethyl butyrate, and ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) packaging films as a function of environmental humidity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v. 53, p. 7212-7216, 2005.

LUCAS, A.M. **Estudos sistemáticos de obtenção e impregnação supercrítica de extratos de *baccharis***. Porto Alegre. 2015. 90 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

MARTINS, M.A.L.; FOELKEL, C.E.B.; GOMIDE, J.L.; VITAL, B.R. Estudo tecnológico da polpação kraft de *Acacia mearnsii* In: **Congresso Latinoamericano de celulose e papel**, 3., 1983, São Paulo. Anais... São Paulo: ABCP, 1983, v. 1, p. 73-92.

MATEUS, E. M. *et al.* Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal. **Silva Lusitana**, v. 14, p. 203-217, 2006.

MEDRADO, M.J.S.; CARVALHO, P.E.R. Espécies de múltiplo propósito para uso em sistemas agrofloretais. In: GALVÃO, A.P.M. (Coord.) **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais**. Colombo: Embrapa, 1998. p.129-141.

MEERA, B.; CHANDER, J.; KALIDHAR, S. B. A review on the chemistry and bioactivity of the *Acacia* spp. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v.27, p. 51-90, 2005.

MENDOZA-WILSON, A.M.; GLOSSMAN-MITNIK, D. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 761, p. 97-106, 2006.

MIR, I.A.; TIKU, A.B. Chemopreventive and Therapeutic Potential of "Naringenin," a Flavanone Present in Citrus Fruits. **Nutrition and Cancer**, v. 67, p. 27-42, 2015.

MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SKROVANKOVA, S.; SOCHOR, J. Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 623-637, 2016.

MONTGOMERY, D.C.; Runger, G.C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003. p. 295-304.

MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C.; DE MARIA, C.A.B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p.195-203, 2000.

MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G.; BONECHI, C.; IACOPONI, F.; MARTINI, S.; ROSSI, C.; COLLODEL, G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin

on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 651-657, 2012.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts usign supercritical carbon dioxide**. Boca Raton: CRC, 2000. p. 2-3, 11-28.

NABI, ABD *et al.* Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L) Willd ex Del var. *Nilotica* (*Mimosaceae*). In: **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, n.1, p. 77-79, 1992.

NARAYANA, K. R.; REDDY, M. S., CHALUVADI, M.R.; KRISHNA, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 2-16, 2001.

NASSAR, M.I. Apigoinin-C-glycoside from de Leaves of *Acacia laeta* and their Anticancer Activity Evaluation. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 1, p. 73-77, 1999.

NERIO, L.S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372–378, 2010.

OGUNBINU, A.O.; OKENIYI, S.; FLAMINI, G.P.; CIONI, L. I.; OGUNWANDE, A.; BABALOLA, I.T. Essential Oil Composition of *Acacia nilotica* Linn., and *Acacia albida* Delile (Leguminosae) from Nigeria. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 540-542, 2010.

OGUNWANDE, I.A.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, K.; SHIMODA, S.; KUBMARAWA, D. Constituents of the Essential Oil from the Leaves of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 116-119, 2008.

OLAJUYIGBE, O.O.; AFOLAYAN, A.J. Synergistic interactions of methanolic extract of *Acacia mearnsii* De Wild. with antibiotics against bacteria of clinical relevance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8915-8932, 2012.

OLIVEIRA, F.C.M. **Caracterização dos resíduos industriais gerados no processo de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. Porto Alegre. 2015. 121 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

OLIVEIRA, M.M. de; *et al.* Antitumor activity of condensed flavonols. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 44, n. 1, p. 41-44, 1972.

ORHAN, I.; KÜPELI, E.; SENER, B.; YESILADA, E. Appraisal of anti-inflammatory potential of the clubmoss, *Lycopodium clavatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 146-150, 2006.

ÖZCAN, M.; CHALCHAT, J. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v. 30, p. 68-73, 2004.

OZEK, T. Distillation Parameters for Pilot Plant Production of *Laurus nobilis* Essential oil. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 2, p. 135-143, 2012.

PARABATHINA, R.K.; RAJA, G.V.; RAO, M.N.; RAO, G.S.; RAO, K.S. Cardioprotective effects of vitamin E, morin, rutin and quercetin against Doxorubicin induced oxidative stress of rabbits: A biochemical study. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n.3, p. 754-765, 2010.

PEDERSSETTI, M.M. **Análise dos efeitos da temperatura e pressão na extração supercrítica do óleo essencial de canola com dióxido de carbono supercrítico e n-propano pressurizado**. Toledo. 2008. 90 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil.

PEREIRA, M.A.A. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica**. Porto Alegre. 2010. 60p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

POLYA, G. M.; FOO, L. Y. Inhibition on eukaryote signal-regulated protein kinases by plant-derived catechin-related compounds. **Phytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 1399-1405, 1994.

POPOCA, J. *et al.* Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, n. 3, p. 173-177, 1998.

PRIETRO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

REIS-VASCO, E.M.C.; COELHO, J.A.P.; PALAVRA, A.M.F.; MARRONE, C.; REVERCHON, E. Mathematical Modelling and Simulation of Pennyroyal Essential Oil Supercritical Extraction. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 2917-2922, 2000.

REVERCHON, E. Mathematical Modelling of Supercritical Extraction of Sage Oil, **AIChE Journal**, v. 42, p. 1765-1771, 1996.

REZAEI, R.; HOSSEINZADEH, H. Safranal: From an Aromatic Natural Product to a Rewarding Pharmacological Agent. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, p. 12-26, 2013.

ROTELLI, A.E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A.O.; ROCHA, N.E.; PELZER, L.E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 601-606, 2003.

RUFINO, M.S.M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico Online**, Embrapa, v. 127, p. 1-4, 2007. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_127.pdf>. Acesso em: 28 fev 2016.

SANT'ANNA, B.M.P.; FONTES, S.F.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Characterization of Woody Odorant Contributors in Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 984-989, 2007.

SARKAR, P.; SINHA, B. S. P.; SUKUL, N. C. Antofilarial effect of a combination of botanicals of *Acacia auriculiformis* and Centella asiática on canine dirofilariases. In: **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 2, p. 107-110, 1998.

SEIGLER, D. S. Phytochemistry of *Acacia* – sensu lato. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 345-373, 2003.

SEKINE, *et al.* Structure and synthesis of a new monoterpenoidal carboxiamide from the seeds of the Thaimedicinal plant *Acacia concinna*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 148-151, 1997.

SHAI, R.; AGARWAL, S. K.; RASTOGI, R. P. Auriculoside, a new flavan glycoside from *Acacia auriculiformis*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1560-1562, 1980.

SHARIF, K.M.; RAHMAN, M.M.; AZMIR, J.; MOHAMED, A.; JAHURUL, M.H.A.; SAHENA, F.; ZAIDUL, I.S.M. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105-116, 2014.

SHARMA, S.; ALI, A.; ALI, J.; SAHNI, J.K.; BABOOTA, S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 22, n. 8, p. 1063-79, 2013.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, D.M. **Efeito de extratos vegetais e antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina**. Viçosa. 2012. 58 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

SILVA, G.F. **Extração supercrítica de *Lycopodium clavatum* L.** Porto Alegre. 2014. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

SILVA, C.G.F. **Estudo de técnicas de extração de saponinas do fruto de erva mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hill)**. Porto Alegre. 2016. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

SILVA, J.H.S. **Desenvolvimento e aplicação de ferramentas computacionais para análise econômica da produção de óleos essenciais vinculados à extração por arraste a vapor**. Porto Alegre. 2016. 141 p. Dissertação (Mestrado em

Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: Cláudia Maria Oliveira Simões *et al.* (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS – UFSC, 2003. p. 467-488.

SIQUEIRA, S. **Atividades biológicas de extratos de *Solanum paludosum* Moric. Obtidos por maceração e extração supercrítica**. Ribeirão Preto. 2010. 129 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Brasil.

SKOOG, D.A., WEST, D.A., HOLLER, F.J., CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica**. 8° ed. São Paulo: Thomson, 2008.

SOVOVÁ, H. Rate of Vegetable Oil Extraction with Supercritical CO₂ – I and II Modelling of Extraction Curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409-420, 1994.

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

TANAC. Unidades de negócio. **Florestal**. Montenegro, [201-]. Disponível em: <<http://www.tanac.com.br/pt-br/unidades/florestal>>. Acesso em: 18 nov 2017.

TAYLOR, L.T. **Supercritical fluid extraction**. New York, NY: J. Wiley, 1996. p. 1-3, 45-47.

TONIETTO, L.; STEIN, P.P. Silvicultura da acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) no Brasil. **Florestar Estatístico**, v. 4, n. 12, p. 11-16, nov.1996/out.1997.

TURNBULL, J.W.; MIDGLEY, S.J.; COSSALTER, C. Tropical Acacias Planted in Asia: an Overview. In: RECENT DEVELOPMENTS IN ACACIA PLANTING. 1997, Vietnam. **Proceedings**, 82. Canberra: ACIAR, 1998. p. 14-28.

TZEN, C. S. *et al.* Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. In: **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3420-3424, 2001.

VALENTOVÁ, K.; VRBA, J.; BANCÍROVÁ, M.; ULRICHOVÁ, J.; KREN, V. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 267–282, 2014.

VALGAS, C., SOUZA, S.M., SMÂNIA, E.F.A., SMÂNIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 369-380, 2007.

VAN BAREN, C.M. **Composición química y actividades biológicas de una espécie aromática y medicinal de la estepa patagónica con potencial interés industrial: *Mulinum spinosum* (Cav.) Persoon**. Buenos Aires. 2008. 368 p. Tese

(Doutorado em Farmácia e Bioquímica). Cátedra de Farmacognosia, Universidade de Buenos Aires, Argentina.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de nitrogênio, de oxigênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WANKAT, P.C. **Equilibrium staged separations: separations in chemical engineering**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1988.

WEBB, D.B.; WOOD, P.J.; SMITH, J. **A guide to species selection for tropical and subtropical plantations**. Oxford: CFI. 1980. Tropical Forestry Paper, 15.

WEBSTER, R.P.; GAWDE, M.D.; BHATTACHARYA, R.K. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. **Cancer Lett**, v.109, p.185-91, 1996.

WOLFFENBÜTTEL, A.N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica**. São Paulo: Roca, 2011.

XAVIER, V.B., VARGAS, R.M.F., MINTEGUIAGA, M., UMPIÉRREZ, N., DELLACASSA, E., CASSEL, E. Evaluation of the key odorants of *Baccharis anomala* DC essential oil: new applications for known products. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 492–496, 2013.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p.1060-1066, 2008.

YORBIK, O.; SAYAL, A.; AKAY, C.; AKBIYIK, D.; SOHMEN, T. Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. **Prostaglandin, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, n. 5, p. 341-343, 2002.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. FLAVONÓIDES. In: Cláudia Maria Oliveira Simões *et al.* (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS – UFSC, 2003. p. 577-607.

ANEXOS

ANEXO A: LISTA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO ACACIA RELATADOS NA LITERATURA

Na tabela a seguir (Tabela A.1), os compostos apresentados tiveram a massa monitorada na análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de tempo do voo (LC-qTOF-MS), porém não foram identificados como presentes no extrato aquoso das flores de *A. mearnsii*.

Tabela A.1. Compostos relatados na literatura para extratos de *Acacia* não identificados no extrato aquoso da *A. mearnsii*.

Composto	Massa	Fórmula
Crisina ²	254,2375	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
4'-Hidroxi-2'-metoxichalcona ²	254,2806	C ₁₆ H ₁₄ O ₃
quracol A ⁴	260,287	C ₁₅ H ₁₆ O ₄
Apigenina ²	270,2369	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
Galangina ²	270,2369	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
Apigenina ⁴	270,237	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
Fisetinidol ³	274,2687	C ₁₅ H ₁₄ O ₅
quracol B ⁴	276,288	C ₁₅ H ₁₆ O ₅
Melacacidina ²	306,2675	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
3,3'-Dimetilquercetina ²	330,2889	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Farnesina ⁴	348,439	C ₂₀ H ₂₈ O ₅
(+)-Catequina-5-galato ²	442,3723	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
(+)-Catequina-7-galato ²	442,3723	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
(+)-Catequina-3'-galato ²	442,3723	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
(+)-Catequina-4'-galato ²	442,3723	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
Proteracacinidina ²	562,527	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁
ent-oritina-(4β,7;5,6)-epioritin-4α-ol ³	562,527	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁
Prunina-O-6'-galato ²	586,502	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₄
(+)-Catequina-5,7-digalato ²	594,481	C ₂₉ H ₂₂ O ₁₄
(+)-Catequina-3',5-digalato ²	594,481	C ₂₉ H ₂₂ O ₁₄
(+)-Catequina-3',7-digalato ²	594,481	C ₂₉ H ₂₂ O ₁₄

(+)-Catequina-4',5-digalato ²	594,481	C ₂₉ H ₂₂ O ₁₄
(+)-Catequina-4',7-digalato ²	594,481	C ₂₉ H ₂₂ O ₁₄
Kaempferol-7-(6-galoilglucosídeo) ²	600,4812	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅
Quercetina-7-(6"-galoilglucosídeo) ²	616,484	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆
Isoramnetina 3-O-rutinosídeo ²	624,5441	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆
Miricetina 7-(6"-galoilglucosídeo) ²	632,483	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₇
Naringenina7-(4',6'-digaloilglucosídeo) ²	738,6019	C ₃₅ H ₃₀ O ₁₈

¹MACKENZIE, A.M. The flavonoids os the leaves of *Acacia mearnsii*. **Phytochemistry**, 8, 1813-1815, 1969.

²SEIGLER, D.S. Phytochemistry of *Acacia - sensu lato*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 31, 845-873, 2003.

³VENTER, P.B; *et al.* Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 3: The chemical composition of wattle (*Acacia mearnsii*) bark extract. **Phytochemistry**, 83, 153-167, 2012.

⁴ANDRADE, C.A.; SILVA, V.C.; PEITZ, C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V. A. Revisão do gênero *Acacia* - atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. **Visão Acad.**, v.4, n.1, p.47-56, 2003.

ANEXO B: TESTES PRELIMINARES - EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Na fase inicial do trabalho, foram submetidos à análise por CCD alguns extratos obtidos com fluido supercrítico. Nessa fase, 80 g de flores secas de *A. mearnsii* foram extraídas com fluido supercrítico nas pressões de 90, 120, 150, 200 e 250 bar, sem adição de cossolvente, à temperatura de 50°C. Os extratos foram solubilizados em metanol e aplicados em placa cromatográfica, sendo utilizado diclorometano como fase móvel. As placas foram então observadas sob luz U.V. a 254 nm e 365 nm e sob efeito dos reveladores cloreto férrico e anisaldeído sulfúrico, conforme figuras abaixo (Figura A.1 e A.2).



Figura A.1. CCD de extratos supercríticos obtidos a diferentes pressões: 90 = extrato a 90 bar; 1 = 120 bar; 2= 150 bar; 3 = 200 bar; 4 = 250 bar (todos sem cossolvente); revelador: FeCl_3 ; as marcações à lápis indicam as “manchas” observadas sob luz U.V.

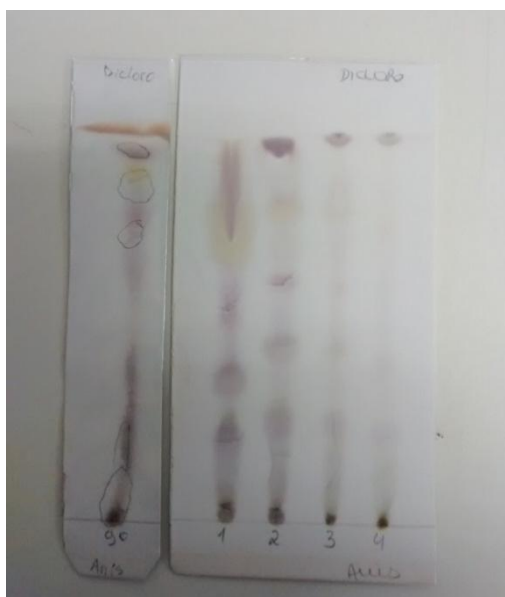


Figura A.2. CCD extratos supercríticos obtidos a diferentes pressões: 90 = extrato a 90 bar; 1 = 120 bar; 2= 150 bar; 3 = 200 bar; 4 = 250 bar (todos sem cossolvente); revelador: Anisaldeído.

Também foi realizado um estudo preliminar da atividade antioxidante de extratos obtidos com fluido supercrítico, no qual foram variadas as condições de extração (pressão, temperatura e cossolvente) conforme tabela abaixo (Tabela A.2). Os extratos foram solubilizados em etanol e diluídos a uma concentração de 40 ppm, sendo então testados utilizando o método de captura do radical DPPH descrito nesse trabalho (Cap 4.4.1).

Tabela A.2. Condições de extração e atividade antioxidante dos extratos supercríticos.

P (bar)	T (°C)	Cossolvente	Atividade antioxidante (% inibição)
120	65	---	10,63
220	50	4 % água	33,09
320	35	--	33,35
320	65	8 % água	44,04

Todos os extratos testados apresentaram baixa atividade antioxidante nas condições analisadas. Entretanto, nota-se um incremento positivo no aumento da capacidade de inibição do radical DPPH com o aumento da pressão e ao utilizar

água como cossolvente, de modo que a atividade antioxidante pode estar relacionada a compostos mais pesados e polares.

ANEXO C: RODA DE AROMAS

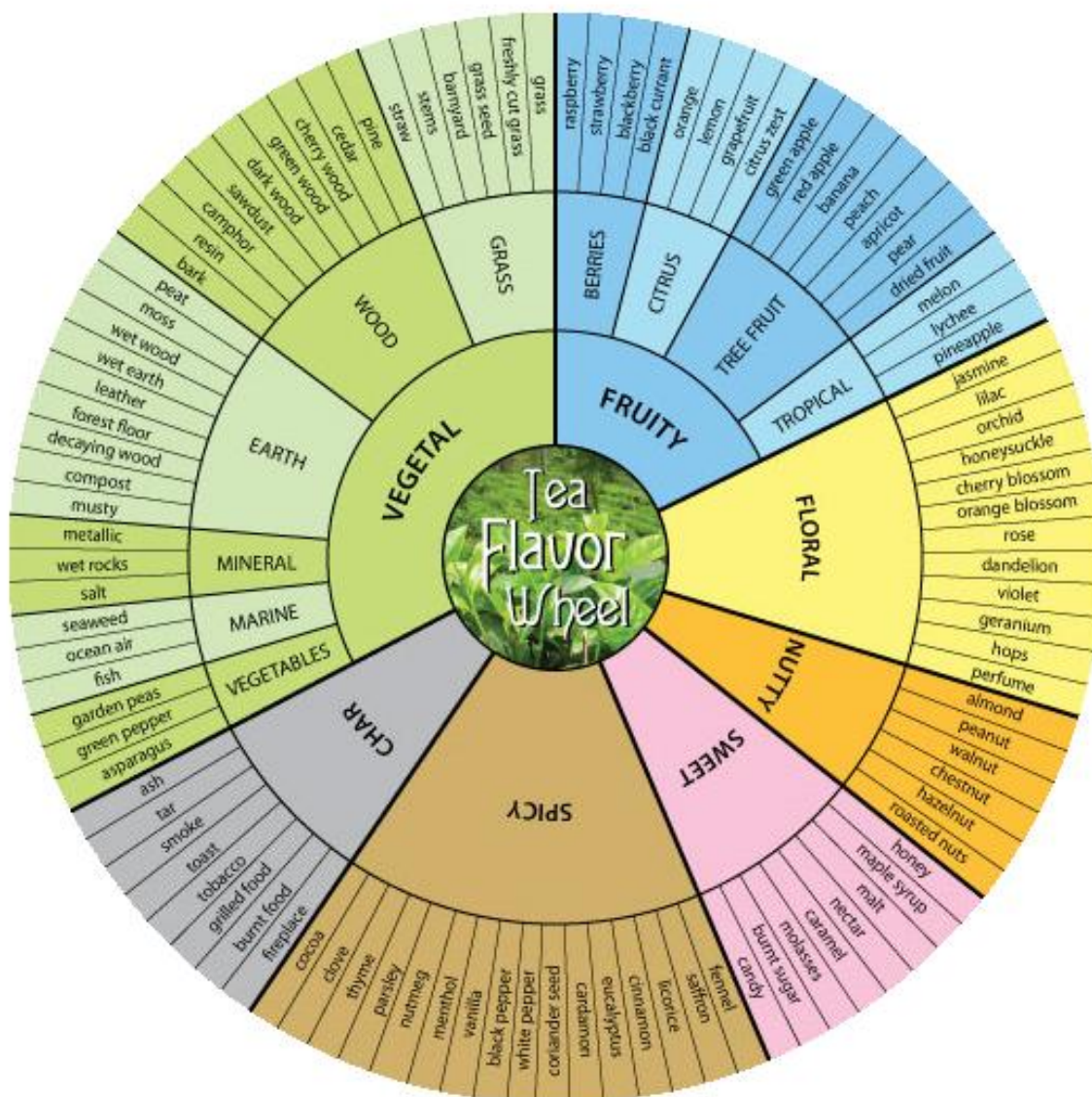


Figura A.3. Roda de aromas para chás*.

* Teahouse Kuan Yin. **The Tea Flavor Wheel: A Curious Proposition**. Seattle, [2009]. Disponível em: < <https://teahousekuanyin.wordpress.com/2009/03/30/the-tea-flavor-wheel-a-curious-proposition>>. Acesso em: 23 dez 2016.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br