

Nathana Lazzarotto Cristofoli

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS COM POTENCIAL  
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DA FOLHA DA  
CAJAZEIRA (*Spondias mombin*)**

Dissertação submetida ao Programa de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Engenharia de Alimentos.  
Orientadora: Profa. Dra. Sandra R. S. Ferreira  
Coorientadora: Dra. Kátia Suzana Andrade

Florianópolis - SC  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cristofoli, Nathana Lazzarotto

Obtenção de extratos com potencial antioxidante e antimicrobiano da folha da cajazeira (Spondias mombin) / Nathana Lazzarotto Cristofoli ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira, coorientadora, Kátia Suzana Andrade, 2017.

111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Extração Supercrítica. 3. Atividade Antioxidante. 4. Atividade Antimicrobiana. 5. Folhas da cajazeira. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Andrade, Kátia Suzana. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“OBTENÇÃO DE EXTRATOS COM POTENCIAL  
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DA FOLHA DA  
CAJAZEIRA (*Spondias mombin*)”**

Por

**Nathana Lazzarotto Cristofoli**

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira  
**Orientadora**

---

Dra. Kátia Suzana Andrade  
**Coorientador**

---

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi  
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Sandra Regina  
Salvador Ferreira

---

Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva  
(videoconferência)

---

Profa. Carmen Maria Olivera  
Müller

---

Profa. Dra. Alcilene Rodrigues  
Monteiro Fritz

**Florianópolis, 27 de setembro de 2017.**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Lori e Mari, e meu irmão Thiago por me apoiarem e incentivarem em todos os momentos. Vocês que me encorajam a ir cada vez mais além. Amo muito vocês!

Ao meu amor Alê por ser meu companheiro em todos os momentos e fazer dos meus objetivos, seus objetivos, me ajudando a encontrar a melhor solução sempre. Que sorte a minha ter você!

Ao grande e eterno Seu Luís por me salvar diversas vezes, colhendo minha matéria-prima.

Ao PGEAL pela oportunidade de cursar o mestrado e à CAPES pela bolsa de estudos.

Ao programa Erasmus Mundus pela oportunidade de realizar parte do mestrado em Portugal, ampliando meu aprendizado e abrindo novos caminhos.

À professora Sandra pela orientação, ensinamentos e confiança depositada.

À minha coorientadora Kátia por compartilhar seu conhecimento, pela paciência e auxílio no decorrer deste trabalho.

Aos professores e técnicos da UAlg pela forma carinhosa como me acolheram e apoiaram.

À professora Margarida, que me orientou no período de intercâmbio, obrigada pelas conversas e por não medir esforços para disponibilizar todo material necessário para a conclusão deste trabalho.

À Vera e Luísa pelo convívio diário nos últimos meses. Obrigada pelas incontáveis histórias e por compartilhar um pouco mais da cultura portuguesa. Um dia as convido para comer bacalhau com natas na minha vivenda.

A todos do laboratório LATESC por proporcionarem um ambiente de trabalho extremamente agradável, pelos momentos de descontração e trocas de experiência.

À banca examinadora pelas contribuições realizadas.

A todos que me apoiaram e torceram pelo sucesso deste trabalho.



“Saiba que são suas decisões, e não suas condições, que determinam seu destino”.

(Tony Robbins)





## RESUMO

A cajazeira (*Spondias mombin*) é uma planta frutífera, de clima tropical, pertencente à família Anacardiaceae, e usada na medicina popular devido as atividades biológicas desempenhadas pelos compostos presentes. A folha desta matéria prima tem seu uso destacado como antioxidante e antimicrobiano natural, o que justifica o objetivo deste trabalho, de obter extratos através do emprego de técnicas convencionais e a alta pressão, avaliando suas atividades biológicas, a fim de selecionar a melhor técnica e o melhor solvente. As extrações a baixa pressão foram realizadas através de Soxhlet e ultrassom de ponteira, fazendo o uso de solventes (hexano, acetato de etila, etanol, etanol+água e água). A extração supercrítica (ESC) foi estudada nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e pressões de 150, 200 e 300 bar, de forma a selecionar a melhor condição para os testes com adição de cossolvente. Os maiores rendimentos foram obtidos com o uso de solventes mais polares a baixa pressão e na ESC com o uso da maior pressão e temperaturas mais brandas. Em relação ao cossolvente, a quantidade adicionada foi diretamente proporcional ao aumento do rendimento. O teor de compostos fenólicos, avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu, obteve melhor resultado para a extração em Soxhlet com etanol. Este extrato apresentou também a maior atividade antioxidante pelo método de ABTS, chegando a ser 2,9 vezes superior ao antioxidante sintético BHT. Para a atividade antioxidante pelo método de DPPH, o extrato obtido com etanol+água em Soxhlet apresentou o melhor resultado (expresso em EC<sub>50</sub>), sendo superior ao BHT. Na atividade antimicrobiana os extratos a baixa pressão com hexano e acetato de etila foram fortes inibidores contra a bactéria *E. coli* e os extratos da ESC com adição de 2,5 % de cossolvente foram os únicos a inibir o crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Dos compostos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, nos extratos de *S. mombin* foram identificados os ácidos cafeico, elágico, gálico, vanílico, catequina e rutina. É importante a definição do método de extração empregado em matrizes vegetais para a obtenção de extratos que apresentem a atividade biológica desejada.

**Palavras-chave:** *Yellow mombin*. Extração supercrítica. Compostos bioativos. Medicina popular.



## ABSTRACT

The cajazeira (*Spondias mombin*) is a fruit tree, tropical climate, belongs to the Anacardiaceae family, and used in the popular medicine due to the biological activities performed by the present compounds. The leaf of this raw material has its highlighted use as antioxidant and natural antimicrobial, which justifies the objective of this work, to obtain extracts through the use of conventional techniques and high pressure, evaluating its biological activities, in order to select the best technique and the best solvent. The extractions at low pressure were carried out using Soxhlet and tip ultrasound, using solvents (hexane, ethyl acetate, ethanol, ethanol+water and water). Supercritical extraction (ESC) was studied at temperatures of 40, 50 and 60 °C and pressures of 150, 200 and 300 bar, in order to select the best condition for the tests with addition of cosolvent. The higher yields were obtained with the use of more polar solvents at low pressure and at ESC with the use of higher pressure and softer temperatures. In relation to cosolvents, the amount added was directly proportional to the increase in yield. The content of phenolic compounds, evaluated by the method of Folin-Ciocalteu, obtained better result for the extraction in Soxhlet with ethanol. This extract also showed the highest antioxidant activity by the ABTS method, reaching 2.9 times higher than the synthetic antioxidant BHT. For the antioxidant activity by the DPPH method, the extract obtained with ethanol+water in Soxhlet presented the best result (expressed in EC50), being higher than BHT. In the antimicrobial activity the extracts at low pressure with hexane and ethyl acetate were strong inhibitors against *E. coli* and extracts of ESC with addition of 2.5 % of cosolvent were the only ones to inhibit the growth of yeast *S. cerevisiae*. Of the compounds analyzed by high performance liquid chromatography, caffeic, ellagic, gallic, vanillic, catechin and rutin acids were identified in *S. mombin* extracts. It is important to define the method of extraction used in vegetable matrices to obtain extracts that present the desired biological activity.

**Keywords:** *Yellow mombin*. Supercritical extraction. Bioactive compounds. Popular medicine.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Spondias mombin.....	27
Figura 2 - Diagrama pressão-temperatura para um componente puro. ....	34
Figura 3 - Fluxograma do equipamento de extração supercrítica. ....	36
Figura 4 - Representação da curva de extração supercrítica. ....	37
Figura 5 - Estabilização dos radicais DPPH (A) e ABTS (B). ....	39
Figura 6 - Etapas de obtenção da matéria-prima: a) matéria prima in natura, b) matéria prima após secagem, c) matéria prima após trituração. ....	43
Figura 7 - Equipamento para extração em Soxhlet. ....	47
Figura 8 - Equipamento para extração assistida por ultrassom. ....	48
Figura 9 - Equipamento de extração supercrítica. ....	49
Figura 10 - Diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.....	49
Figura 11 - Organograma usado para representação da etapa experimental. ....	53
Figura 12 - Curva de extração da folha da cajazeira a 200 bar, 50 °C e vazão de CO <sub>2</sub> de 6±2 g/min. ....	64
Figura 13 - Isotermas de rendimento da folha da cajazeira.....	67
Figura 14 - Rendimentos globais (X <sub>0</sub> ) para os extratos da folha da cajazeira utilizando etanol e etanol+água como cossolventes a 200 bar, 40 °C e vazão de 6 ± 2 g/min.....	68
Figura 15 - Placas de testes apresentando ausência de halos de inibição para soluções de DMSO 60% para E. coli (A) e presença de halos de inibição para solução de antibiótico ampicilina (B). ....	75
Figura 16 - Cromatograma dos padrões analisados. ....	81
Figura 17 - Curva analítica de ácido gálico utilizada na determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos da folha de cajazeira. ....	109
Figura 18 - Curva analítica de Trolox utilizada na determinação de capacidade antioxidante dos extratos da folha de cajazeira. ....	109
Figura 19 - Espectros de UV de alguns padrões utilizados. A: Ácido gálico em ensaio isolado; B: Ácido ferrúlico em ensaio com todos os padrões analisados; C: Ácido elágico em ensaio isolado; D: Ácido elágico em ensaio com todos os padrões analisados. ....	111
Figura 20 - Cromatograma para a amostra obtida em Soxhlet com etanol. ....	111
Figura 21 - Cromatograma para a amostra obtida em ultrassom com etanol. ....	112
Figura 22 - Cromatograma para a amostra obtida em ultrassom com etanol*. ....	112
Figura 23 - Cromatograma para a amostra obtida por extração supercrítica com 2,5% de etanol. ....	113
Figura 24 - Cromatograma para a amostra obtida por extração supercrítica com 2,5% de etanol+água.....	113



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas comprovadas para a folha da cajazeira. ....	28
Tabela 2 - Estruturas dos compostos fenólicos. ....	30
Tabela 3 - Propriedades de gás, fluido supercrítico e líquido. ....	34
Tabela 4 - Subprodutos vegetais com atividade antimicrobiana. ....	40
Tabela 5 - Subprodutos vegetais com atividade antimicrobiana. ....	41
Tabela 6 - Índice de polaridade dos solventes orgânicos utilizados na extração em Soxhlet. ....	46
Tabela 7 - Planejamento experimental fatorial completo $3^2$ com as variáveis temperatura (T) e pressão (P), variando em três níveis. ....	52
Tabela 8 - Gradiente de eluição estabelecido para separação dos compostos fenólicos. ....	59
Tabela 9 - Características físicas da matéria-prima vegetal. ....	61
Tabela 10 - Rendimento global ( $X_0$ ) das extrações a baixa pressão, utilizando solventes com polaridades variadas. ....	62
Tabela 11 - Características do leito de extração supercrítica. ....	64
Tabela 12 - Parâmetros cinéticos de extração de folha de cajazeira a 200 bar, 50 °C e vazão de solvente de $6 \pm 2$ g/min. ....	65
Tabela 13 - Rendimento global de extração da folha de cajazeira ( $X_0$ ) obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão. ....	66
Tabela 14 - Teor de compostos fenólicos totais (CFT), expressos em equivalentes de ácido gálico para os extratos da folha de Spondias mombin. ...	69
Tabela 15 - Potencial antioxidante dos extratos da folha de Spondias mombin avaliado pelo método DPPH. ....	71
Tabela 16 - Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de folha de cajazeira. ....	74
Tabela 17 - Resultados do teste de difusão em ágar expressos em tamanho do halo de inibição (mm) para os extratos de folha de cajazeira. ....	76
Tabela 18 - Concentração mínima inibitória dos extratos de folha de cajazeira. ....	79
Tabela 19 - Identificação dos padrões analisados. ....	81
Tabela 20 - Compostos presentes no perfil químico das amostras de S. mombin, apresentados em porcentagem de área. ....	83





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- % AA – Percentual de atividade antioxidante  
AA – Atividade Antioxidante  
Abs – Absorbância  
ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)  
ANOVA – Análise de Variância  
AOAC – *Association of Analytical Communities*  
BHA – Butil-hidtoxi-anisol  
BHT – Butil-hidroxitolueno  
CER – do inglês, *Constant extraction rate*  
 $C_{\text{extrato}}$  – Concentração do extrato  
CFT – Compostos fenólicos totais  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CMI – Concentração mínima inibitória  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
D<sub>AB</sub> – Coeficiente de difusão  
DCP – do inglês, *Diffusion-controlled period*  
 $d_i$  – Diâmetro da peneira *i*  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DPPH – 2,2-difenil-1- picrilidrazina  
 $d_s$  – Diâmetro médio superficial das partículas  
EAG – Equivalente em ácido gálico  
EC<sub>50</sub> – Concentração equivalente a 50 % da atividade antioxidante  
ESC – Extração supercrítica  
EtOAc – Acetato de etila  
EtOH – Etanol  
ε – Porosidade do leito  
FER – do inglês, *Falling extraction rate*  
H<sub>2</sub>O – Água  
Hex – Hexano  
HPLC – High Performance Liquid Chromatography  
INT – Cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-feniltetrazolium  
LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica  
M – Massa total de amostra  
M<sub>CER</sub> – Taxa de extração na etapa CER  
 $m_f$  – Massa final de amostra  
 $m_i$  – Massa inicial de amostra ou massa de amostra retida na peneira *i*  
mmHg – Milímetro de mercúrio  
n – Número total de frações  
P<sub>C</sub> – Pressão crítica

PG – Propil galato  
 $Q_{CO_2}$  – Vazão de  $CO_2$   
 $R^2$  – Coeficiente de determinação  
SI – Sem inibição de crescimento  
TBBHQ – Terc-butil-hidroquinona  
 $T_C$  – Temperatura crítica  
 $t_{CER}$  – Tempo de duração da etapa CER  
 $t_{FER}$  – Tempo de duração da etapa FER  
UAlg – Universidade do Algarve  
UFC – Unidade de Formação de Colônias  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
US – Ultrassom  
 $X_0$  – Rendimento global da extração  
 $Y_{CER}$  – Concentração de soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER  
 $\mu$  – Viscosidade  
 $\rho$  – Densidade  
 $\rho_a$  – Massa específica aparente  
 $\rho_{CO_2}$  – Massa específica do solvente supercrítico  
 $\rho_r$  – Massa específica real

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 OBJETIVOS.....	25
1.1.1 Objetivo Geral.....	25
1.1.2 Objetivos Específicos.....	25
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
2.1 CAJAZEIRA (Spondias mombin).....	27
2.1.1 Atividade biológica.....	28
2.1.2 Compostos bioativos presentes nas folhas da cajazeira.....	29
2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	31
2.2.1 Soxhlet.....	32
2.2.2 Extração assistida por ultrassom.....	33
2.2.3 Extração supercrítica.....	33
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	37
2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	39
2.5 ESTADO DA ARTE.....	42
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA.....	43
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	43
3.2.1 Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis.....	43
3.2.2 Determinação do diâmetro médio de partícula.....	44
3.2.3 Determinação da massa específica aparente ( $\rho_a$ ).....	45
3.2.4 Determinação da massa específica real.....	45
3.2.5 Porosidade do leito.....	45
3.3 EXTRAÇÕES A BAIXA PRESSÃO.....	45
3.3.1 Extração em Soxhlet.....	46
3.3.2 Extração assistida por ultrassom.....	47
3.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC).....	48
3.4.1 Determinação da cinética de extração.....	51
3.4.2 Determinação do rendimento de extração ( $X_0$ ).....	51

<b>3.4.3 Extração supercrítica com cossolvente.....</b>	<b>52</b>
3.5 REPRESENTAÇÃO DA ETAPA EXPERIMENTAL.....	53
3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT).....	53
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	55
<b>3.7.1 Método DPPH.....</b>	<b>55</b>
<b>3.7.2 Método do radical ABTS.....</b>	<b>56</b>
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	57
<b>3.8.1 Teste de difusão em ágar.....</b>	<b>57</b>
<b>3.8.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....</b>	<b>58</b>
3.9 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	58
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
4.1 CARACTERÍSTICAS DA MATÉRIA PRIMA.....	61
4.2 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES A BAIXA PRESSÃO.....	61
4.3 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	63
<b>4.3.1 Características do leito de extração.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.2 Curvas de extração.....</b>	<b>64</b>
<b>4.3.3 Rendimento global da ESC (<math>X_0</math>).....</b>	<b>65</b>
<b>4.3.4 Emprego de cossolvente.....</b>	<b>67</b>
4.4 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT).....	69
4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	71
<b>4.5.1 Método DPPH.....</b>	<b>71</b>
<b>4.5.2 Método ABTS.....</b>	<b>73</b>
4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	75
<b>4.6.1 Método de Difusão em Ágar.....</b>	<b>75</b>
<b>4.6.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....</b>	<b>78</b>
4.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CLAE.....	80
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>

<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>89</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
APÊNDICE A – Curvas de calibração.....	109
APÊNDICE B – Cromatogramas CLAE.....	111



## 1 INTRODUÇÃO

A medicina popular nos fornece importantes informações acerca dos efeitos benéficos à saúde relacionados a inúmeros tipos de plantas que sugerem seu estudo para a aplicação destas matrizes vegetais em alimentos e em medicamentos. De maneira geral, a atividade biológica de uma planta está associada à presença de compostos bioativos, que apresentam diversos benefícios para a saúde humana e para a preservação de alimentos.

A cajazeira (*Spondias mombim*) é uma espécie frutífera de porte alto, encontrada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, além de regiões tropicais da América, África e Ásia. O fruto conhecido como cajá, cajá-mirim, taperebá, *hog plum* e *yellow mombim* é usado na medicina popular como febrífugo e diurético (ADESINA, 1982; SACRAMENTO e SOUZA, 2000).

A literatura reporta diversos estudos comprovando o uso da folha da cajazeira como antioxidante e antimicrobiano natural, cicatrizante, anti-inflamatório, no tratamento de conjuntivite, dor de estômago, diarreia, disenteria e alergias (BURKILL, 1985; ALBUQUERQUE et al., 2007; OKOLI et al., 2007; AYOKA et al., 2008).

Para a obtenção de extratos de matrizes vegetais normalmente se faz uso de solventes orgânicos. Estes, por sua vez, influenciam no rendimento e qualidade do extrato, além de necessitarem de uma etapa adicional para a remoção do solvente. A extração supercrítica é uma técnica alternativa aos métodos de extração convencionais possibilitando a obtenção de compostos bioativos de melhor seletividade e qualidade, por evitar a degradação de compostos termicamente sensíveis e o produto final ser isento de solvente, não apresentando riscos ambientais. É considerada uma ótima opção para a indústria alimentar e farmacêutica na extração e fracionamento de produtos naturais devido a automatização do processo e utilização de solventes em temperaturas mais brandas (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; GÓMEZ et al., 1996).

Até o momento não há relatos na literatura acerca do emprego da tecnologia supercrítica na obtenção de extratos de *S. mombim*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da extração supercrítica na obtenção de extratos de *S. mombim*, comparando com diferentes técnicas a atividade antioxidante e antimicrobiana dos produtos obtidos.





## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo a obtenção de extratos de folha de cajazeira (*Spondias mombin*) através do emprego de diferentes técnicas de extração, avaliando a atividade antioxidante, antimicrobiana e a composição química destes extratos.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar, em termos de rendimento, os extratos obtidos por técnicas a baixa pressão (Soxhlet, ultrassom), utilizando solventes de diferentes polaridades;

b) Avaliar o rendimento da extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (ESC) em função das diferentes condições de pressão e temperatura empregadas;

c) Definir a melhor condição para a ESC e o melhor solvente orgânico para os experimentos de ESC com cossolvente em termos de rendimento;

d) Avaliar o efeito do cossolvente no rendimento da ESC para os extratos de folha de cajazeira;

e) Avaliar os diferentes extratos em relação ao seu potencial antioxidante através dos métodos DPPH (1,1-diphenil-2-picryl hidrazil) e ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e o teor de fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu;

f) Avaliar os diferentes extratos quanto à atividade antimicrobiana, utilizando os microrganismos *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 43888, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903 e *Staphylococcus aureus* NCTC 12981 e para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCPF 3178;

g) Avaliar o perfil químico dos extratos obtidos por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência).



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CAJAZEIRA (*Spondias mombin*)

A cajazeira (*Spondias mombin*) pertence à família Anacardiaceae, encontrada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, além de regiões tropicais da América, África e Ásia. É uma espécie frutífera de porte alto de até 30 m de altura com tronco superior a 70 cm de diâmetro e revestido com casca grossa. As folhas são compostas, imparipinadas, oblongas, com 5 a 11 pares de folíolos, medindo 5 a 11 cm de comprimento por 2 a 5 cm de largura (BRAGA, 1960).

O fruto tem cor amarelo-alaranjado tipo drupa ovóide, com 3-4 cm de comprimento, é conhecido como cajá, além de cajá-mirim, taperebá e *hog plum* e *yellow mombin* na língua inglesa. É muito apreciado por ser nutritivo, saboroso e aromático e amplamente utilizado na obtenção de sucos, néctares e geleias (SACRAMENTO; SOUZA, 2009).

Figura 1 - *Spondias mombin*.



Fonte: a autora.

A cajazeira é considerada uma planta em domesticação, em que prevalece a exploração extrativista, não sendo cultivada em escala comercial. Esta planta é socioeconomicamente relevante para as regiões

Norte e Nordeste do Brasil, onde o fruto é normalmente destinado as agroindústrias regionais, as folhas são aproveitadas para alimentação animal durante a seca e diversas partes da planta são utilizadas na medicina popular (SOUZA, 2005; SACRAMENTO; SOUZA, 2009).

### 2.1.1 Atividade biológica

A cajazeira tem importantes aplicações na medicina popular, podendo-se destacar o uso do fruto como febrífugo e diurético, da raiz como analgésico para dores de estômago e das folhas como cicatrizante, anti-inflamatório, tratamento de alergias, conjuntivite, diarreia e disenteria, além de atuar como vermífugo (BURKILL, 1985; ALBUQUERQUE et al., 2007; OKOLI et al., 2007).

Devido às diversas atividades biológicas relacionadas à folha, muitos estudos foram realizados para comprovar tais benefícios, como apresentado na Tabela 1. Das atividades listadas na Tabela 1 podemos destacar as atividades antioxidante e antimicrobiana, que além de apresentarem importantes aplicações medicinais e/ou farmacêuticas, podem representar importantes usos como aditivos para alimentos, visando ampliação de sua vida útil.

Tabela 1 - Atividades biológicas comprovadas para a folha da cajazeira.

<b>Atividade biológica</b>	<b>Autores</b>
Atividade antiviral	Corthout et al., 1991; Corthout et al., 1992
Atividade antimicrobiana	Njoku; Akumefula, 2007; Accioly et al., 2012; Aromolaran; Badejo, 2014; Shittu et al., 2014a,b
Atividade antioxidante	Pauly; Fleury, 2002; Njoku; Akumefula, 2007
Atividade anti-inflamatória	Nworu et al., 2011
Efeito ansiolítico	Ayoka, et al., 2005
Efeito antidiarreico	Akubue; Mittal; Aguwa, 1983
Efeito antiépilético	Ayoka et al., 2006
Efeito cicatrizante	Villegas et al., 1997
Efeito moluscicida	Corthout et al., 1994
Efeito sedativo	Ayoka et al., 2006

## 2.1.2 Compostos bioativos presentes nas folhas da cajazeira

As atividades biológicas dos extratos da folha da cajazeira são normalmente relacionadas com a presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas e glicosídeos (AKUBUE; MITTAL; AGUWA, 1983; NJOKU; AKUMEFULA, 2007; AROMOLARAN; BADEJO, 2014; SHITTU et al., 2014b).

Os ácidos fenólicos são caracterizados por apresentarem pelo menos um anel aromático, um grupamento carboxílico e um ou mais substituinte hidroxila. De acordo com o número de carbonos podem ser divididos em ácidos benzóicos (C6–C1) e em ácidos cinâmicos (C6–C3) (BELLUZZO, 2008).

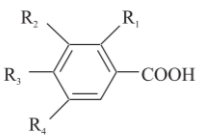
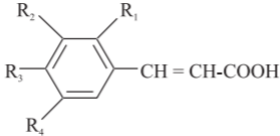
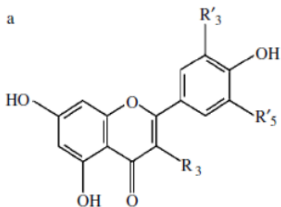
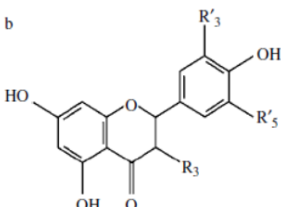
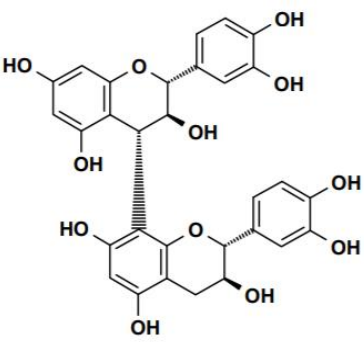
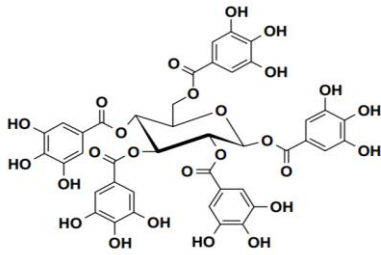
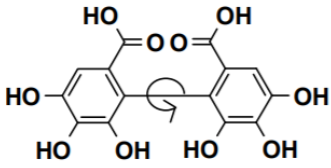
A estrutura dos flavonoides consiste de dois anéis fenólicos, unidos por um anel pirano heterocíclico (três carbonos) apresentando em sua estrutura 15 átomos de carbono (C6–C3–C6). São diferentes os grupos que podem estar ligados a estrutura básica que determinam a classe do flavonoide (BELLUZZO, 2008).

Os taninos são compostos fenólicos que se apresentam em forma de polímeros. Estruturalmente podem ser divididos em hidrolisáveis e condensáveis, no qual o primeiro pode ser formado por misturas de fenóis simples, geralmente ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagitaninos). Já os taninos condensáveis são formados através de sucessiva condensação de duas ou mais unidades de catequinas (HAGERMAN, 2002).

As estruturas destes compostos podem ser observadas na Tabela 2.

Os flavonóides são compostos amplamente distribuídos nas matrizes vegetais e são conhecidos por apresentarem atividades antialérgica, anti-inflamatória, antiviral e antioxidante. Corthout et al. (1992) e Silva et al. (2011) relacionaram essas atividades com a presença de ácido cafeico, quercetina, rutina e ácido elágico.

Tabela 2 - Estruturas dos compostos fenólicos.

<b>Estruturas dos compostos fenólicos</b>	
Derivados do ácido benzoico <sup>1</sup>	Derivados do ácido cinâmico <sup>1</sup>
	
<p>Ácido salicílico: R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H            Ácido gentísico: R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = OH; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H            Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico: R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>3</sub> = OH            Ácido protocatequínico: R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH            Ácido vanílico: R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = OH            Ácido gálico: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OH            Ácido siríngico: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = OH</p>	<p>Ácido cinâmico: R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H            Ácido <i>o</i>-cumárico: R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H            Ácido <i>m</i>-cumárico: R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH            Ácido <i>p</i>-cumárico: R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>3</sub> = OH            Ácido caféico: R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH            Ácido ferúlico: R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = OH            Ácido sináptico: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = OH</p>
Flavonoide <sup>2</sup>	Taninos condensados <sup>3</sup>
<p>a</p>  <p>a – Flavona R<sub>3</sub> = H; Flavonol R<sub>3</sub> = OH</p> <p>b</p>  <p>b – Flavanona R<sub>3</sub> = H; Flavanonol R<sub>3</sub> = OH</p>	 <p>catechin-(4<math>\alpha</math>-&gt;8)-catechin</p>
Taninos hidrolisáveis (galotaninos) <sup>3</sup>	Taninos hidrolisáveis (elagitaninos) <sup>3</sup>
	

Fonte: <sup>1</sup>RAMALHO e JORGE (2006), <sup>2</sup>RODRIGUES (2011), <sup>3</sup>HAGERMAN (2002).

Estudos desenvolvidos por Corthout et al. (1991) e Njoku e Akumefula (2007) relacionam a presença de taninos a atividade antimicrobiana, antiviral e ação cicatrizante, podendo ser indicado no tratamento de distúrbios gastrointestinais (DHARNANANDA, 2003). A atividade antimicrobiana foi associada a presença dos compostos quercetina e rutina, encontrados nas folhas de *S. mombin* (Da Silva et al., 2012). Geraniina e galoilgeranina foram os primeiros taninos identificados nesta matéria-prima e associados a atividade antiviral contra o vírus do Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), sendo mais tarde identificado os compostos ácido clorogênico, ácido elágico e quercetina (CORTHOUT et al., 1991; CORTHOUT et al., 1992; SILVA et al., 2011). Accioly (2012) verificou que o extrato hidroetanólico da folha de *S. mombin* apresentou boa atividade leishmanicida em testes *in vitro*, provavelmente devido a presença de galotaninos, sendo necessário estudos *in vivo* para comprovação de tal efeito.

Ayoka et al. (2006) realizaram estudos com extratos etanólico, metanólico e aquoso de *S. mombin*. Os ensaios *in vivo* demonstraram que estes extratos possuem propriedades sedativas e antipsicóticas, provavelmente devido a presença de taninos, antraquinonas, flavonóides, glicosídeos e saponinas. Observou-se no mesmo estudo que os extratos etanólico e metanólico possuíam atividade anticonvulsiva, sendo esta relacionada a presença de compostos fenólicos, presentes somente nestes extratos. Este estudo mostrou uma potencial aplicação dos extratos da cajazeira no tratamento de distúrbios psiquiátricos, com ausência de sintomas tóxicos para administração oral.

Estudos realizados por Pauly e Fleury (2002) tiveram como resultado o depósito de uma patente, sob número 20030072820 A1, no qual os extratos aquoso, etanólico e aquoso-etanólico (50 %) de *S. mombin* foram utilizados para a produção de um cosmético de uso tópico com ação antioxidante. O extrato está presente na composição cosmética em quantidade de 0,1 a 3 % em peso.

## 2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Dentre os métodos para a obtenção de diversos compostos ativos utilizados pelas indústrias alimentícia, química e farmacêutica, os mais clássicos são a extração em Soxhlet e assistida por ultrassom, que envolvem o emprego de solventes orgânicos como metanol, hexano, éter, clorofórmio, acetonitrila, benzeno e etanol. O tipo de solvente e método aplicado influencia o rendimento da extração e a composição do extrato, portanto, é importante a utilização de solventes com polaridades

diferentes nos casos de identificação e isolamento de compostos extraídos de fontes naturais (ANDREO; JORGE, 2007).

Além das técnicas de extração com uso de solventes orgânicos requererem um alto custo energético e possibilitarem a degradação de substâncias termicamente sensíveis, necessitam também de operações posteriores para a remoção do solvente, especialmente quando a finalidade é para uso alimentício (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; STARMANS; NIJHUIS, 1996).

Como alternativa aos métodos de extração com solventes orgânicos pode-se citar a extração supercrítica, cujo emprego em processos industriais vem ganhando espaço, sendo uma ótima opção na obtenção de produtos naturais. O uso da tecnologia supercrítica possibilita a obtenção de compostos bioativos de melhor qualidade, no qual pequenas variações de temperatura e pressão alteram a densidade do solvente, possibilitando a seletividade do processo. O solvente pode ser facilmente removido no final da extração sem apresentar riscos ambientais, e por usar temperaturas mais brandas apresentam menor risco de degradação térmica (ANDREO; JORGE, 2007; DÍAZ-REINOSO et al., 2006; GÓMEZ et al., 1996).

### **2.2.1 Soxhlet**

A extração em Soxhlet é classificada como um processo de lixiviação, sendo considerada uma das técnicas mais antigas de separação de materiais, em que os compostos presentes numa matriz sólida são extraídos através da sua dissolução em um líquido. Esta técnica foi desenvolvida em 1879 por Franz von Soxhlet e é considerada referência para medir o desempenho de novos métodos de extração (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

A extração em Soxhlet é um método contínuo, com recirculação de solvente, o que facilita o equilíbrio da transferência e aumenta a eficiência da extração. Além disso, possibilita a realização de várias extrações simultâneas, por conta do baixo custo do equipamento (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). No entanto, a duração da extração pode variar de 1 a 72 horas, o que tende a comprometer a integridade dos compostos extraídos, principalmente pela decomposição térmica dos compostos de interesse devido a elevada temperatura empregada e a necessidade de uma etapa posterior de eliminação do solvente (MIGUEL; DE ANDRADE, 1989).



## **2.2.2 Extração assistida por ultrassom**

A aplicação das ondas ultrassônicas se dá em diversos setores e tem como finalidade limpeza, esterilização, emulsão, homogeneização, aceleração de reações químicas, dissolução e extração, entre outros (BENDICHO; LAVILLA, 2000). Em relação à extração, esta técnica é uma alternativa eficiente para isolar compostos naturais de matrizes vegetais proporcionando maiores rendimentos em menor tempo de processo, em comparação à extração em Soxhlet, com reduzido consumo de solventes e maior controle de temperatura, evitando a degradação de compostos termicamente sensíveis (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013; PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2004; LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003).

O aumento da eficiência na extração assistida por ultrassom está relacionado ao fenômeno da cavitação. As ondas ultrassônicas propagam ciclos de expansão e compressão que geram bolhas no interior do líquido e estas quando não podem mais absorver energia implodem, criando a cavitação. Dessa forma a implosão das bolhas atinge a superfície da matriz sólida desintegrando as células e disponibilizando os compostos desejáveis (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013; LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003). A eficiência também está associada ao processo de desfibramento da celulose causado pelo ultrassom (LAINE et al., 1977; LAINE; GORING, 1977; TATSUMI, 2000; SILVA, 2002; FERREIRA, 2012).

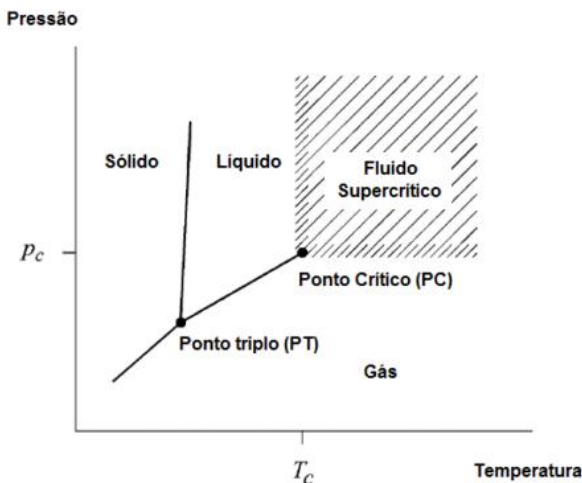
A extração assistida por ultrassom pode ser aplicada através de banho ou sistema de sonda. Apesar do primeiro ser mais difundido o sistema de sonda vem ganhando destaque por envolver uma cavitação direta, facilitando a liberação dos compostos de interesse. Portanto é uma técnica que possibilita maiores taxas de extração em um período de tempo menor (PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2004; RODRIGUES; PINTO; FERNANDES, 2008). Independentemente do método de aplicação, ainda é necessária a etapa de filtração ou centrifugação para a recuperação do extrato e a eliminação do solvente (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

## **2.2.3 Extração supercrítica**

A extração supercrítica (ESC) utiliza solventes no estado supercrítico que ao entrar em contato com uma amostra sólida, remove seus compostos de interesse. O solvente supercrítico é também conhecido como fluido supercrítico e é assim designado quando sua

pressão e temperatura estão acima de seu ponto crítico (Figura 2). A temperatura crítica ( $T_C$ ) é a temperatura mais alta na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica ( $P_C$ ) é a pressão mais elevada na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido (FREITAS, 2007).

Figura 2 - Diagrama pressão-temperatura para um componente puro.



Fonte: MUKHOPADHYAY (2000).

Um fluido supercrítico apresenta propriedades diferentes daquelas apresentadas no estado líquido ou gasoso (Tabela 3) e obtém variações significativas a partir de pequenas mudanças de pressão e temperatura (BRUNNER, 1994). São semelhantes aos líquidos quanto aos valores de densidade, seu coeficiente de difusão é intermediário entre gás e líquido e apresentam baixa viscosidade e ausência de tensão superficial, o que facilita a transferência de massa (MAUL, 1999).

Tabela 3 - Propriedades de gás, fluido supercrítico e líquido.

Fluido	$\rho \times 10^3$ [Kg/m <sup>3</sup> ]	$D_{AB} \times 10^4$ [m <sup>2</sup> ]	$\mu$ [Kg/m.s]
Gás	$(0,6-2) \times 10^{-3}$	0,1 - 0,4	$(1-3) \times 10^{-5}$
FSC ( $P_C$ , $T_C$ )	0,2 – 0,5	$0,7 \times 10^3$	$(1-3) \times 10^{-5}$
Líquido	0,6 – 1,6	$(0,2-2) \times 10^5$	$(0,2-3) \times 10^{-3}$

Fonte: RIZVI et al., 1986.

A ESC tem inúmeras aplicações na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos, apresentando processos relevantes como a remoção de nicotina do tabaco e cafeína do café e chás, produção de extrato de lúpulo para a produção de cervejas, além da extração de ervas medicinais e extração de óleos de sementes oleaginosas (MUKHOPADHYAY, 2000).

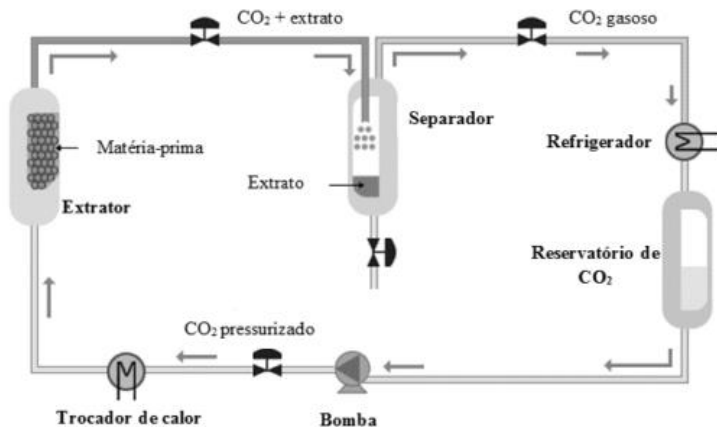
Esta tecnologia se destaca das demais por proporcionar extratos de alta qualidade e livres de solvente, sendo considerada ecologicamente correta devido a possibilidade de recuperação e reutilização do fluido supercrítico. É, portanto, considerada uma opção interessante para a indústria alimentar e farmacêutica na extração e fracionamento de produtos naturais (HERRERO et al., 2010; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

A maioria dos processos utiliza como fluido supercrítico o dióxido de carbono, pois este apresenta características interessantes como baixo custo, não ser inflamável, é atóxico e possui temperatura e pressão críticas relativamente baixas (31,1 °C e 73,8 bar), o que permite a extração de compostos termo sensíveis (REVERCHON; DE MARCO, 2006). Porém para a extração de compostos polares (menos solúveis no CO<sub>2</sub> supercrítico) se faz necessária a utilização de um cossolvente que irá aumentar a polaridade do meio. Normalmente o etanol é o cossolvente mais utilizado, como observado nos trabalhos desenvolvidos por Andrade, Poncelet e Ferreira (2017), Cruz et al. (2017), Mazzutti et al. (2017) realizados no LATESC (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013; TSAO; DENG, 2004).

De maneira geral, duas operações unitárias estão envolvidas na extração supercrítica: a extração e a separação do extrato do solvente, representados na Figura 3.

Durante a extração, o solvente supercrítico escoar através do leito de partículas, solubilizando e transportando os compostos presentes na matriz vegetal, ocorrendo assim a transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluida. A concentração do material extraído irá variar continuamente até que seja alcançado o equilíbrio da extração. Após a extração ocorre a etapa de separação, obtida através da redução da pressão (PEREIRA; MEIRELES, 2010; BRUNNER, 1994).

Figura 3 - Fluxograma do equipamento de extração supercrítica.



Fonte: SUFLUX, (2017), adaptado por MAZZUTTI, (2016).

A otimização do processo de extração depende de fatores como características do material vegetal, tais como umidade, massa específica, tamanho e distribuição das partículas e também das condições do processo, como temperatura e pressão de extração, vazão do solvente e cossolvente, quando usado, e tratamento da matriz sólida (MARTÍNEZ; VANCE, 2008).

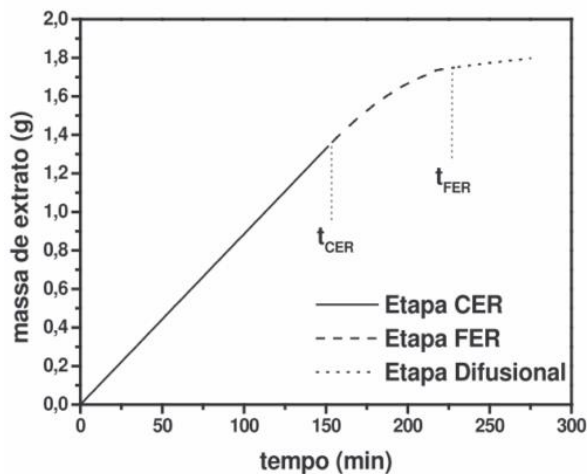
### 2.2.3.1 Curvas de extração

A curva de extração expressa o comportamento cinético do processo, ou seja, a massa acumulada de extrato em função do tempo de extração. Esta curva é geralmente dividida em três etapas, como apresentado na Figura 4.

Na primeira etapa, CER (*Constant Extraction Rate*), há velocidade constante de extração, pois o soluto está na superfície do sólido sendo facilmente acessível ao solvente. Nesta fase a resistência à transferência de massa está na fase fluida e o mecanismo dominante é a convecção. A segunda etapa, FER (*Falling Extraction Rate*), corresponde a uma velocidade decrescente de extração causado pela exaustão do soluto na superfície do sólido, portanto inicia-se a difusão do soluto presente no interior da partícula e a transferência de massa ocorre por difusão e convecção simultaneamente. A última etapa é a etapa difusional, DCP (*Diffusion Controlled Period*), caracterizado pela ausência de soluto facilmente acessível e a transferência de massa é

controlada pela difusão na fase sólida (BRUNNER, 1994; FERREIRA; MEIRELES, 2002; FERREIRA et al., 1999).

Figura 4 - Representação da curva de extração supercrítica.



Fonte: MARTÍNEZ, (2005).

O comportamento da curva de extração é influenciado por fatores como vazão do solvente utilizado e tamanho da partícula da fase sólida, e sua determinação se faz necessária para definir os parâmetros do processo, como por exemplo, o tempo de extração, a caracterização das etapas de extração supercrítica e a determinação da solubilidade (SILVA, 2004).

### 2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Antioxidantes são substâncias responsáveis pelo retardo e prevenção dos danos oxidativos causados por radicais livres. Radicais livres são moléculas instáveis altamente reativas, essenciais aos processos biológicos em pequenas concentrações, porém quando gerado em excesso podem causar danos celulares. Assim, os antioxidantes neutralizam os radicais livres, conferindo benefícios ao corpo humano, como o combate ao envelhecimento e a doenças graves (câncer, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares) e também aos alimentos (retardo da deterioração, rancidez ou descoloração) (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Na indústria alimentícia os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados para inibir alterações indesejáveis nos alimentos, sendo os mais usados o BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), TBHQ (terc-butil-hidroquinona) e PG (propil galato). Porém, estudos relatam uma provável relação destes compostos a efeitos adversos. Portanto tem-se aumentado o número de pesquisas por produtos naturais que apresentam atividade antioxidante e que sejam seguros para o ser humano (RAMALHO; JORGE, 2006). A atividade antioxidante dos produtos vegetais está associada à presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides e ácidos fenólicos (TSAO; DENG, 2004).

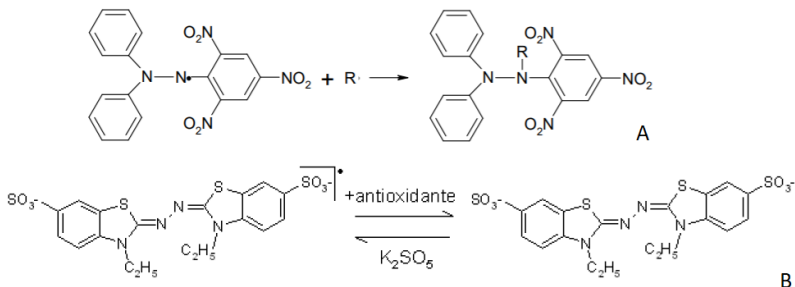
Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes através da remoção ou inativação de radicais livres e devido sua estrutura são capazes de produzir compostos estáveis. O método normalmente utilizado para a quantificação destes compostos é o de Folin-Ciocalteu, caracterizado pela transferência de elétrons (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Em testes realizados em gorduras, alguns compostos fenólicos apresentaram melhores resultados para a atividade antioxidante frente aos antioxidantes sintéticos, como o ácido caféico testado para o óleo de oliva, ácidos clorogênico, gálico, protocatequínico e caféico para óleo de girassol e catequina sozinha e em mistura com outros antioxidantes aumentaram significativamente a estabilidade do óleo de amendoim quando comparado com um controle (VON GADOW, JOUBERT, HANSMANN, 1997; SOTILLO, HADLEY, HOLM, 1994; CHU E HSU, 1999).

Tendo em vista a complexidade da composição dos produtos vegetais e a dificuldade em determinar o potencial antioxidante *in vitro* de diferentes compostos é recomendada a utilização de duas ou mais técnicas de análise (BADARINATH et al., 2010). Dentre os métodos mais utilizados podemos citar o método por sequestro de radicais livres, como DPPH· (2,2-difenil-1-picrilidrazina) e ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Estes métodos são os mais usados, devido sua rapidez, boa estabilidade e fácil replicação, sendo usados para compostos puros e extratos vegetais. O método do radical ABTS é recomendado tanto para compostos hidrofílicos como lipofílicos. Já o método do radical DPPH apresenta melhores resultados para compostos solúveis em meio orgânico (KUSKOSKI, 2005; SUCUPIRA, 2012).

Os compostos antioxidantes atuam como doadores de hidrogênio para os radicais DPPH e ABTS<sup>+</sup>, reduzindo-os a hidrazina e ABTS, respectivamente. Esta reação provoca a perda da coloração do meio,

verificado pelo decréscimo na leitura da absorbância (ALVES et al., 2010; BORGES et al., 2011; SUCUPIRA et al., 2012). A estabilização dos radicais DPPH e ABTS é observada na Figura 5.

Figura 5 - Estabilização dos radicais DPPH (A) e ABTS (B).



Fonte: RUFINO et al, (2007b), RUFINO et al, (2007a).

## 2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os antimicrobianos são compostos sintéticos ou naturais que tem como finalidade inibir ou destruir microrganismos, atuando diretamente sobre estes (DAVID; STEENSON; DAVIDSON, 2013). Há uma crescente preocupação dos consumidores com relação aos produtos sintéticos e a propagação de microrganismos multirresistentes, o que explica a popularidade dos antimicrobianos naturais (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

A prevenção ou cura de enfermidades pela medicina popular através do uso de produtos de origem vegetal é uma das mais antigas formas de tratamento. Com base no elevado potencial biológico dessas plantas têm-se intensificado as pesquisas para qualificar e quantificar os compostos antimicrobianos, servindo como alternativa aos antimicrobianos já existentes. Muitas destas pesquisas envolvem a recuperação de compostos bioativos, com propriedades antimicrobianas, de subprodutos vegetais, como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Subprodutos vegetais com atividade antimicrobiana.

<b>Subproduto</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Referência</b>
Bagaço de azeitona ( <i>Olea europaea</i> )	<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Friedman, 2007
Bagaço de uva ( <i>Vitis vinifera</i> , <i>Vitis labrusca</i> )	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Enterococos</i> , aeróbios mesófilos totais e bactérias psicrotróficas, bolores e leveduras	Martin et al., 2012; Sagdic et al., 2011
Casca de alho ( <i>Allium sativum</i> L.)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	Kallel et al., 2014
Casca de bergamota ( <i>Citrus bergamia</i> Risso)	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Mandalari et al., 2007
Casca de limão ( <i>Citrus acida</i> )	<i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Aspergillus ficuum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium saloni</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Candida utilis</i>	Mahmud et al., 2009
Casca de romã ( <i>Punica granatum</i> )	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	Al-Zoreky, 2009; Hayrapetyan, Hazeleger, Beumer, 2012; Kanati, Chander, Sharma, 2010
Casca da uva ( <i>Vitis vinifera</i> )	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella infantis</i> , <i>Campylobacter coli</i>	Katalinić et al., 2010



Tabela 5 - Subprodutos vegetais com atividade antimicrobiana.

<b>Subproduto</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Referência</b>
Folhas de caju ( <i>Anacardium occidentale</i> )	<i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>V. cholera</i>	Wonghirundecha, sumpavapol, 2012
Folhas de oliveira ( <i>Olea europaea</i> )	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>H. pylori</i> , <i>S. aureus</i>	Sudjana et al., 2009
Folha de videira ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i> e <i>Salmonella Infantis</i>	Katalinić et al., 2010
Óleo da casca de tangerina ( <i>Citrus reticulata</i> )	<i>Alternaria solani</i> , <i>Curvularia oxysporum</i> , <i>Helminthosporium oryzae</i>	<i>alternata</i> , <i>Rhizoctonia lunata</i> , <i>Fusarium</i> Chutia et al., 2009
Óleos essenciais de laranja ( <i>Citrus sinensis</i> ), limão ( <i>Citrus limon</i> ) e tangerina ( <i>Citrus reticulata</i> )	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Espina et al., 2011
Raiz de beterraba ( <i>Beta vulgaris</i> )	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Čanadanović-brunet et al., 2011
Semente de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	<i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. albicans</i>	Taveira et al., 2010
Semente de uva ( <i>Vitis vinifera</i> , <i>Vitis labrusca</i> )	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> <i>S. aureus</i>	Martin, 2012; Perumalla, Hettiarachchy, 2011

Os métodos mais utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana são o método de difusão em ágar e o método da concentração mínima inibitória (CMI). O primeiro é um método qualitativo, no qual é avaliada a capacidade do extrato de inibir ou não o crescimento do microrganismo de interesse. É um método simples e confiável, apresentando flexibilidade na escolha do tipo de antimicrobiano a ser testado e fácil interpretação dos resultados (JORGENSEN e FERRERO, 1998).

A partir da difusão em ágar são selecionados os extratos que serão submetidos ao teste quantitativo (CMI), o qual se baseia na determinação da menor quantidade de extrato necessária para inibir o crescimento bacteriano, através do teste de diferentes concentrações de extrato. A CMI é determinada através de diluição em caldo, diluição em ágar ou microdiluição em caldo, sendo esta a mais usada (VIEIRA, 2005).

## 2.5 ESTADO DA ARTE

A busca por compostos que apresentem atividades antioxidante e antimicrobiana aliada ao uso de tecnologias que possibilitem um produto de maior qualidade tem impulsionado a investigação em diversas matrizes vegetais.

Para a obtenção de compostos bioativos é utilizado, na maioria das vezes, solventes orgânicos que serão removidos do produto final através de uma etapa adicional ao processo. Devido a isso, tem-se intensificado as pesquisas com tecnologias que utilizem menor quantidade de solvente ou solventes ambientalmente seguros.

A matéria prima estudada neste trabalho tem suas atividades biológicas reconhecidas, sendo importante não somente na medicina popular, como também na produção de alimentos com valor agregado e em fármacos. Porém até o momento não foram encontrados trabalhos com o emprego da tecnologia supercrítica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

As folhas de cajazeira (*Spondias mombin*) foram coletadas no campus da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE no mês de abril de 2016. Uma amostra do material foi registrada no acervo do Herbário Prisco Bezerra, sob o número EAC52773. A matéria-prima foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) por 10 horas a 45 °C. O material seco foi triturado em moinho de facas tipo Willey (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil). As folhas secas e moídas foram acondicionadas em embalagens de polietileno, envoltas em papel alumínio e estocadas em freezer doméstico a aproximadamente -18 °C. A Figura 6 apresenta a amostra antes e após o pré-tratamento.

Figura 6 - Etapas de obtenção da matéria-prima: a) matéria prima *in natura*, b) matéria prima após secagem, c) matéria prima após trituração.



Fonte: a autora.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

##### 3.2.1 Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis

A determinação do teor de umidade para a folha da cajazeira foi realizada segundo adaptação da metodologia 925.09 da AOAC (2005),

cujo procedimento fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis quando a amostra é submetida a 105 °C.

Esta análise foi realizada em triplicata, 5 gramas de amostra foram medidos em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e colocados em cápsulas de alumínio, previamente aquecidas em estufa (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) a 70 °C por 1 hora, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa à vácuo (QUIMIS-Q819V2) a 70 °C e -30 mmHg por 24 horas, quando se obteve massa constante, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e as massas medidas novamente. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, foi utilizada a Equação 1.

$$\% \text{ umidade} = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100 \quad (1)$$

Onde:

*m<sub>i</sub>*: massa inicial da amostra (g)

*m<sub>f</sub>*: massa final da amostra (g).

A determinação de umidade e substâncias voláteis da amostra foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média ± desvio padrão.

### 3.2.2 Determinação do diâmetro médio de partícula

O diâmetro médio de partícula das folhas de cajazeira moídas foi determinado por meio do cálculo proposto por Gomide et al. (1980). Aproximadamente 50 g de amostra foram medidos em balança analítica e a separação das partículas foi realizada em peneiras da série de *Tyler* de *mesh* 30 a 140 (Retsch – Test Sieve), sendo o conjunto agitado por 5 minutos e o diâmetro médio calculado pelas Equações 2 e 3.

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{d_i}}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{d_i^3}}} \quad (2)$$

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{M} \quad (3)$$

Onde:

*d<sub>s</sub>*: diâmetro médio superficial das partículas (mm);

$m_i$ : massa de amostra retida na peneira  $i$  (g);

$M$ : massa total de amostra (g);

$d_i$ : diâmetro da peneira  $i$  (mm);

$n$ : número total de frações.

### 3.2.3 Determinação da massa específica aparente ( $\rho_a$ )

A massa específica aparente das partículas é determinada através da relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações e o volume da célula extratora ocupada pelo sólido (Equação 4).

$$\rho_a = \frac{\text{massa da amostra em gramas}}{\text{volume do leito em cm}^3} \quad (4)$$

### 3.2.4 Determinação da massa específica real

A massa específica real da amostra foi determinada utilizando-se a técnica de picnometria em gás hélio, com o uso do equipamento Accu Pyc II 1340 da Micromeritics no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC). Esta metodologia consiste no deslocamento de gás hélio para dentro dos poros da matriz sólida devido a sua baixa tensão superficial sem alterar as características das partículas (MOURA; FIGUEIREDO, 2002).

### 3.2.5 Porosidade do leito

A porosidade do leito foi determinada relacionando-se a massa específica real ( $\rho_r$ ) e a massa específica aparente ( $\rho_a$ ), de acordo com a Equação 5.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (5)$$

## 3.3 EXTRAÇÕES A BAIXA PRESSÃO

As extrações a baixa pressão utilizaram diferentes solventes orgânicos e foram realizadas a fim de comparar os rendimentos e atividade biológica dos extratos com os obtidos da extração supercrítica.

Após a obtenção dos extratos a baixa pressão foi realizado o processo de eliminação de solvente, utilizando evaporador rotativo (Mod. 550 e 802, Fisatom, São Paulo/SP, Brasil) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC,

Brasil) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica Piracicaba/SP, Brasil).

### 3.3.1 Extração em Soxhlet

A extração em Soxhlet foi realizada segundo o método 920.39C da AOAC (2005), utilizando hexano, acetato de etila, etanol, água e mistura de etanol e água, na proporção 1:1(v/v) como solventes. A Tabela 6 apresenta o índice de polaridade desses solventes.

Tabela 6 - Índice de polaridade dos solventes orgânicos utilizados na extração em Soxhlet.

Solvente	Polaridade <sup>1</sup>	Constantes dielétricas ( $\epsilon$ ) a 25 °C <sup>2</sup>
Hexano	0,0	1,88
Acetato de etila	4,4	6,02
Etanol	5,2	24,30
Etanol + Água	7,1	53,44
Água	9,0	78,36

Fonte: <sup>1</sup>BYERS (2003);

<sup>2</sup>BURDICK e JACKSON (2015); BABU, 2008.

O sistema de extração em Soxhlet consiste de um extrator que é acoplado a um condensador na parte superior e um balão de 250 mL na parte inferior (Figura 7). Foram utilizados 5 gramas de amostra, acondicionados em cartuchos de papel filtro e este inserido no extrator. Para todas as extrações utilizou-se a proporção de amostra:solvente igual a 1:30 (m:v), e o solvente foi colocado no balão e aquecido até sua temperatura de ebulição através de uma manta de aquecimento. Com o aquecimento do solvente este passa pelo braço do extrator até o condensador onde volta a ser líquido e goteja sobre o cartucho de amostra no extrator, possibilitando a extração dos compostos solúveis. Quando o solvente enche o extrator até a altura do sifão, a mistura soluto/solvente retorna ao balão, e então o solvente é novamente aquecido e o processo reinicia, sendo mantido por 6 horas.

As extrações foram realizadas em duplicata e os extratos obtidos passaram pelo processo de evaporação do solvente, foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados a -18 °C em freezer doméstico. Os resultados dos rendimentos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Figura 7 - Equipamento para extração em Soxhlet.



Fonte: a autora.

### 3.3.2 Extração assistida por ultrassom

O método de extração assistida por ultrassom foi realizado usando um sonicador de ponteira (Ecosonics, modelo QR500), que opera em frequência de 20 kHz e potência máxima de 500 W, utilizando como referência os estudos descritos por Bajerová et al. (2014), Izadifar (2013) e Mijangos Ricárdez et al. (2011). Como parâmetros foi estabelecida a relação amostra:solvente de 1:30 (m:v), com amplitude de sonicação de 50% (250 W) e tempo de 8 minutos, ambos obtidos através de testes preliminares. Os testes foram realizados a temperatura ambiente, mantidos por banho de gelo e controlados por termômetro. A Figura 8 ilustra o equipamento utilizado.

Em um béquer de 250 mL foram pesadas 5 gramas de folhas secas e moídas, juntamente com 150 mL dos diferentes solventes já relatados no item anterior, sendo em seguida submetidas a sonicação direta através de micro ponta de titânio de 4 mm.

Após a extração, o material foi filtrado em filtro à vácuo (Fisatom-Modelo 825T), realizando a eliminação dos solventes conforme descrito no item 3.3, acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer doméstico a -18 °C.

Figura 8 - Equipamento para extração assistida por ultrassom.



Fonte: a autora.

### 3.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC)

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESEC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC e tiveram como intuito determinar as condições de temperatura e pressão no qual se obtém extratos com melhores parâmetros de qualidade e rendimento global, respeitando os limites de operação do equipamento e buscando evitar a degradação de compostos termossensíveis. Este trabalho teve como base outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LATESEC (ANDRADE; PONCELET; FERREIRA, 2017; CRUZ et al., 2017; MAZZUTTI et al., 2017; MICHIELIN, 2013)

A determinação do rendimento global de extração e os experimentos cinéticos foram realizados através do método dinâmico de extração, caracterizado pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida (FERREIRA et al., 1999).

A unidade de extração supercrítica utilizada neste trabalho opera até uma pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente de 1,67 g/min a 36,67 g/min e foi desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg*



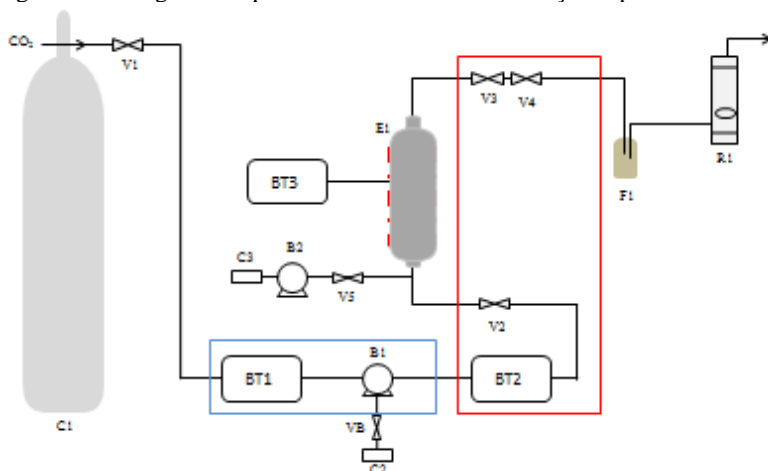
(TUHH), na Alemanha (ZETZL, BRUNNER e MEIRELES, 2003). As Figuras 9 e 10 apresentam o equipamento de extração utilizado e o esquema de funcionamento, respectivamente.

Figura 9 – Equipamento de extração supercrítica.



Fonte: a autora.

Figura 10 – Diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.



C1: cilindro de CO<sub>2</sub>; C2: compressor de ar; C3: reservatório de cossolvente; B1: bomba de CO<sub>2</sub>; B2: bomba de cossolvente; E1: extrator; F1: frasco coletor de

extrato; R1: rotâmetro; VB: válvula de entrada de ar comprimido; V1: válvula de entrada de CO<sub>2</sub> no sistema; V2: válvula de entrada de CO<sub>2</sub> no extrator; V3: válvula de saída de CO<sub>2</sub> no extrato; V4: válvula de saída de CO<sub>2</sub> no extrator (micrométrica); V5: válvula de retenção da bomba de cossolvente; BT1: banho de resfriamento; BT2 e BT3: banhos de aquecimento.

Fonte: Adaptado de Zetzl, C.; Brunner, G.; Meireles, (2003) e Kitzberger (2005)

Acoplado à unidade supercrítica tem-se um cilindro de CO<sub>2</sub> com 99,9 % de pureza que contém um tubo pescador (White Martins Ltda., Joinville/SC, Brasil). O CO<sub>2</sub> alimenta a linha de extração, seguindo primeiramente para um banho termostático (BT1) (C10-K10, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha) programado para manter a temperatura inferior a 0 °C, garantindo assim que o solvente esteja no estado líquido antes de sua entrada na bomba (B1) (M111, Maximator, Niedersachsen, Alemanha). A bomba trabalha alimentada por uma linha de ar comprimido, filtrado e ajustado para a pressão desejada. Este ajuste é realizado através de uma válvula (VB) que controla a pressão do ar comprimido, uma vez que a bomba opera em uma razão 1:130.

Após o CO<sub>2</sub> passar pela bomba ele é encaminhado à linha de extração, passando pelo extrator (E1), que consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 32,9 cm de comprimento, 2,0 cm de diâmetro interno e volume de 107,74 mL e extremidades rosqueadas. A linha que liga a bomba ao extrator, bem como a tubulação após o extrator, é mantida submersa em um banho termostático de aquecimento (BT2) (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) a uma temperatura de 65 °C, de modo a evitar o congelamento da linha e das válvulas macrométricas (V2 e V3) e micrométrica (V4) durante a despressurização da mistura soluto/solvente. A temperatura de operação do extrator é mantida constante na temperatura desejada por meio de um banho termostático de aquecimento (BT3) (DC30-B30, Thermo Haake, Alemanha).

No início do processo de extração, as válvulas V3 e V4 são mantidas fechadas e a válvula V2 é mantida aberta para permitir a passagem do CO<sub>2</sub> para o extrator. A válvula (V3) conectada na saída do extrator auxilia a válvula (V4) na despressurização do solvente e permite o controle do fluxo do solvente. Após passar pela (V4), o soluto é conectado em frascos âmbar (F1) e a vazão do CO<sub>2</sub> é medido no rotâmetro (R1).

Para os experimentos com cossolvente, a bomba de cossolvente (B2) é acoplada a linha antes da entrada no extrator.

### 3.4.1 Determinação da cinética de extração

A curva global de extração tem o objetivo de determinar o tempo ideal de extração e avaliar o comportamento cinético do processo. Para a determinação da cinética de extração foram utilizados 15,5 g de folha de cajá, obtendo dessa forma um leito de partículas com altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator, considerando-se que, com esta relação entre altura e diâmetro do leito, a dispersão axial seja desprezada. Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO<sub>2</sub> na pressão de 200 bar, temperatura de 50 °C e vazão de  $6 \pm 2$  g/min, correspondente a condição intermediária de densidade do solvente.

Os frascos de coleta de extrato foram previamente pesados em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e a coleta da amostra extraída foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados. Os frascos foram novamente pesados após a coleta e determinou-se a massa de extrato obtida em função do tempo de extração.

O período de cada etapa de extração (CER e FER) foi calculado a partir das curvas de extração. Os tempos  $t_{CER}$  e  $t_{FER}$  representam o final das etapas constante e decrescente de extração, respectivamente. A velocidade de transferência de massa na etapa CER ( $M_{CER}$ ) foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período CER, realizada com auxílio de planilha eletrônica, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER ( $Y_{CER}$ ) foi determinada pela razão entre  $M_{CER}$  e  $Q_{CO_2}$  (vazão de CO<sub>2</sub>).

### 3.4.2 Determinação do rendimento de extração ( $X_0$ )

O rendimento de extração foi calculado através da razão entre a massa de extrato obtida a uma dada condição de extração e a massa de matéria-prima utilizada para formar o leito. A influência da pressão e temperatura no rendimento foi realizada através de um planejamento experimental com 3 níveis e 2 variáveis, totalizando 9 experimentos (Tabela 7). Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se como condições de operação as pressões de 150, 200 e 300 bar, temperaturas de 40, 50 e 60 °C, vazão fixa de solvente ( $6 \pm 2$  g/min) e tempo de extração determinado através do ensaio cinético, descrito no item 3.4.1.

Tabela 7 - Planejamento experimental fatorial completo 3<sup>2</sup> com as variáveis temperatura (T) e pressão (P), variando em três níveis.

Experimento	Variáveis codificadas de T	Variáveis codificadas de P	Variáveis reais de T (°C)	Variáveis reais de P (bar)
1	-1	-1	40	150
2	-1	0	40	200
3	-1	+1	40	300
4	0	-1	50	150
5	0	0	50	200
6	0	+1	50	300
7	+1	-1	60	150
8	+1	0	60	200
9	+1	+1	60	300

Cada experimento utilizou, aproximadamente, 15 g de amostra para a formação do leite, sendo as extremidades da coluna de extração revestidas com algodão para evitar a entrada de partículas sólidas na tubulação e o espaço vazio restante foi completado com esferas de vidro. A partir da escolha da melhor condição da ESC, para posterior extração com cossolvente, foi realizada uma extração adicional (extração assistida por ultrassom) com o resíduo com o intuito de buscar o esgotamento da matéria-prima.

Os frascos contendo o material extraído foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer doméstico a -18 °C até a realização dos ensaios de avaliação da atividade biológica.

### 3.4.3 Extração supercrítica com cossolvente

Para a extração com CO<sub>2</sub> com adição de cossolvente, uma bomba de cossolvente (B2) (Constametric 3200, SP Thermo Separation Products, USA) foi acoplada ao equipamento de extração supercrítica, que trabalha numa faixa de vazão de 0,1 a 10 mL/min. Na linha de extração entre a bomba de cossolvente e o extrator foi acoplada uma válvula de retenção (V5) para evitar que o solvente orgânico retornasse para B2 se houvesse um aumento na pressão da bomba de CO<sub>2</sub> durante o experimento.

Com base nos resultados de rendimento das extrações em Soxhlet e dados da literatura, os solventes etanol (2,5%; 5,0%; 7,5%) e etanol+água (3:1, v/v) (2,5%) foram selecionados como cossolventes para os ensaios de ESC com modificador. Estas concentrações foram

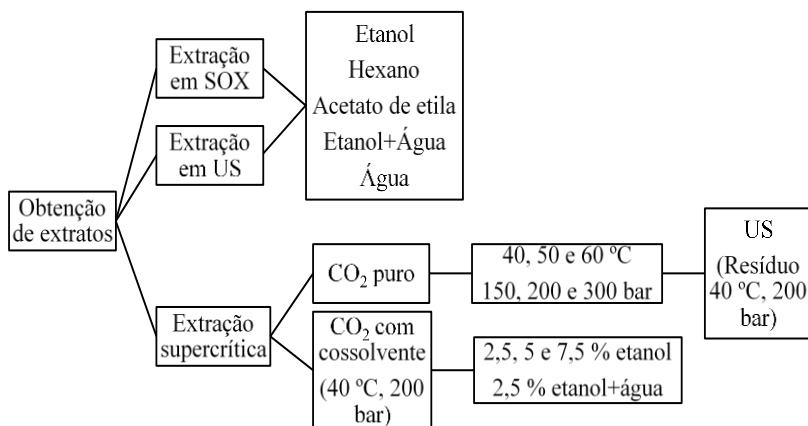
definidas a partir de trabalhos realizados por Andrade, Poncelet e Ferreira (2017), Cruz et al. (2017) e Mazzutti et al. (2012).

As extrações foram realizadas em duplicata, na condição de operação de 200 bar, 40 °C, vazão de CO<sub>2</sub> de 6,66 ± 2 g/min e tempo de 3,5 h de extração.

### 3.5 REPRESENTAÇÃO DA ETAPA EXPERIMENTAL

Para melhor compreensão, as etapas de obtenção dos extratos estão representadas na Figura 11. Todos os extratos foram submetidos às análises de atividade antioxidante e antimicrobiana (metodologias descritas a seguir), com exceção do extrato obtido por fluido supercrítico sem cossolvente, conforme descrito no item 4.3.3. A caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada apenas nas amostras com elevada atividade antioxidante.

Figura 11 - Organograma usado para representação da etapa experimental.



Fonte: a autora.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

A determinação do teor de CFT de todos os extratos da folha da cajazeira foi realizada nos Laboratórios de Processamento e Química de

Alimentos, do Departamento de Engenharia Alimentar da Universidade do Algarve, pelo método de Folin-Ciocalteu conforme Koşar, Dorman e Hiltunen (2005); Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999).

Inicialmente construiu-se uma curva analítica de ácido gálico, preparando uma solução estoque de 0,002 g/mL de ácido gálico em água destilada. A partir desta solução estoque foram obtidas, em tubos de ensaio, soluções de concentrações finais de 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/L. O meio reacional foi preparado em tubos de ensaio de 10 mL, sendo transferido para estes 100 µL de cada uma das diluições do padrão, 6 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu 2N. Homogeneizou-se em vórtex e após 1 minuto foi adicionado 1,5 mL de carbonato de sódio a 20 % (m/v), sendo adicionado por último mais 1,9 mL de água destilada, seguido de agitação e repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 2 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi – U2000) a 765 nm após ser calibrado com água. A curva de calibração do ácido gálico foi representada através do gráfico de absorbância *versus* concentração de ácido gálico (mg/L).

Os extratos foram diluídos em álcool etílico absoluto P.A., com exceção dos extratos cujo solvente de extração foi a água, sendo utilizado este mesmo solvente para a realização desta análise. A concentração final das soluções foi de 1 mg/mL e utilizou-se banho indireto de ultrassom (Sonorex Super RK - 510) por 5 minutos para melhorar a solubilização do extrato. Seguiu-se o mesmo procedimento reacional realizado para a curva analítica de ácido gálico. Os valores de absorbância encontrados para cada tipo de extrato foram verificados se estavam dentro da faixa de absorbância da curva padrão.

Para o cálculo de CFT foi subtraído do valor da absorbância de cada amostra o valor da absorbância do respectivo branco e a absorbância foi substituída na equação do ácido gálico, sendo obtido o equivalente em ácido gálico (EAG), calculando em seguida o teor de compostos fenólicos totais através da Equação 6. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico/g de extrato.

$$\text{CFT (mg EAG/g extrato)} = \frac{\text{EAG} \cdot 1000}{C_{\text{extrato}}} \quad (6)$$

Onde:

EAG: equivalente em ácido gálico (mg/L);

C<sub>extrato</sub>: concentração do extrato (mg/L).

### 3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante dos extratos de *S. mombin* foi realizada por meio de duas metodologias: método do radical DPPH e método do radical ABTS. Os resultados foram comparados com o butil-hidroxitolueno (BHT), um composto sintético de reconhecida atividade antioxidante. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Processamento e Química de Alimentos, do Departamento de Engenharia Alimentar da Universidade do Algarve.

#### 3.7.1 Método DPPH

A atividade antioxidante pelo método DPPH foi realizada de acordo com Mensor et al. (2001).

Para a solução estoque dos extratos (1 mg/mL) seguiu-se o mesmo procedimento realizado para a análise de compostos fenólicos totais, sendo estes diluídos em concentrações de 0, 5, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg/L em uma solução de DPPH (0,3 mM). As amostras foram homogeneizadas em vórtex, tampadas e incubadas no escuro e à temperatura ambiente por 30 minutos, seguido de leitura em espectrofotômetro a 517 nm. O percentual de inibição da amostra testada sobre o radical DPPH foi calculado de acordo com a Equação 7.

$$AA (\%) = 100 - \left[ \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco} * 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (7)$$

Após a obtenção dos valores de AA (%) calculou-se o EC<sub>50</sub> (Effective concentration) por análise de regressão linear. O EC<sub>50</sub> é a concentração mínima eficaz para capturar 50 % do radical DPPH. Segundo Alexander et al. (1999) para calcular o EC<sub>50</sub> de forma confiável é necessário: a) plotar o gráfico concentração de extrato *versus* absorbância apenas se o valor de 50 % da AA estiver próximo ao centro da curva, num intervalo de aproximadamente 20 a 80 %; b) que o coeficiente de regressão (R<sup>2</sup>) seja o mais próximo de 1 possível. A partir da equação da reta (Y=aX+b), substitui-se o Y por 50 e calcula-se o EC<sub>50</sub> (X). Com base nesses requisitos foi necessário diluir a solução estoque, de algumas amostras, em valores diferentes dos já reportados (entre 0 e 500 mg/L).

### 3.7.2 Método do radical ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Re et al., (1999) e Rufino et al. (2007a).

O radical ABTS<sup>+</sup> foi preparado através da mistura de 5 mL da solução estoque de ABTS 7 mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mM, ambos preparados com água. Esta solução foi armazenada no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas para estabilização do radical, sendo diluído em álcool etílico no momento da análise até obter absorvância de 0,70 +/- 0,05 a 734 nm.

Uma solução estoque do padrão trolox a 2 mM em etanol PA foi preparada e, a partir desta solução, foram realizadas diluições obtendo concentrações entre 0 e 2000 µM. O meio reacional foi preparado em tubos de ensaio, sendo transferido para estes 30 µL de cada diluição, em triplicata, e 3 mL de radical ABTS<sup>+</sup>, seguido da incubação no escuro à temperatura ambiente por 6 minutos e leitura em espectrofotômetro a 734 nm. A partir das absorvâncias obtidas, plotou-se a concentração do padrão de trolox (µM) no eixo X e as respectivas absorvâncias no eixo Y, sendo calculada a equação da reta. A partir da equação da reta ( $y = -ax + b$ ) calculou-se a absorvância referente a 1000 µM do padrão trolox, onde se substituiu X por 1000 µM.

Para a solução estoque dos extratos (1 mg/mL) seguiu-se o mesmo procedimento realizado para a análise de compostos fenólicos totais, sendo estes diluídos em concentrações de 100, 250, 500 e 1000 µg/mL. O meio reacional se deu de maneira semelhante à realizada com o padrão trolox, misturando-se alíquotas de 30 µL de cada diluição do extrato e 3 mL de radical ABTS<sup>+</sup>, incubado no escuro ao abrigo da luz e realizada a leitura após 6 minutos. A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos foi plotado a absorvância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X, sendo determinada a equação da reta. Para calcular a atividade antioxidante, substituiu-se na equação da reta a absorvância equivalente a 1000 µM do padrão trolox. O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM de trolox (Equação 8).

$$y = -ax + b \quad (8)$$

Onde,

y: absorvância correspondente a 1000 µM de trolox;



x: diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM de trolox.

A partir do resultado encontrado (x) na equação 8, dividiu-se por 1000 para ter o valor em g (Equação 9). O resultado final foi calculado pela divisão de 1000 (µM) pelo valor de X (g) e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em µM trolox / g de extrato (porção comestível) (Equação 10).

$$X(g) = \frac{x}{1000} \quad (9)$$

$$Z = \frac{1000}{X(g).1} \quad (10)$$

### 3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos extratos de *S. mombin* foi avaliada para as bactérias *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 43888, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903 e *Staphylococcus aureus* NCTC 12981 e para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCPF 3178. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Engenharia Alimentar da Universidade do Algarve.

#### 3.8.1 Teste de difusão em ágar

No método de difusão em ágar em discos, realizada de acordo com Smânia et al. (1995), foi inicialmente preparada uma suspensão bacteriana de cada espécie contendo, aproximadamente,  $10^8$  UFC/mL, verificado com o padrão de McFarland 1, sendo essa suspensão semeada em placas com meio ágar de Müller-Hinton com auxílio de *swab* estéril. Distribuiu-se 6 discos estéreis de 6 mm por placa com auxílio de pinça, onde foram testados dois extratos, em triplicata.

Em cada disco foram adicionados 10 µL de solução de extrato de concentração 50 mg/mL em DMSO (dimetilsulfóxido) a 60 %. A solução de DMSO a 60 % foi testada e verificou-se que não oferece nenhuma inibição aos microrganismos testados.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica e em condições aeróbicas, respeitando o tempo e temperatura de cada microrganismo. Portanto as bactérias *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram incubados por 24 h a 37 °C, *L. innocua* por 24 h a 30 °C e a levedura *S. cerevisiae* por 48 h a 25 °C. Nos casos em que foi

verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido em milímetros. As amostras com halos de inibição com tamanho acima de 9 mm são considerados resultados positivos (SMÂNIA et al., 1995) e foram avaliados quanto a concentração mínima inibitória.

Como controle positivo foi utilizado o antibiótico ampicilina para *E. coli*, ciprofloxacina para *P. aeruginosa*, cloranfenicol para *B. cereus* e *S. aureus*, nystatin para *S. cerevisiae* e trimethoprim para *L. innocua*.

### 3.8.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita por Ávila et al. (2008). Os extratos testados foram dissolvidos em DMSO previamente esterilizado, obtendo uma concentração inicial de 20 mg/mL. Em uma placa de microdiluição de 96 poços foram preparadas diluições seriadas obtendo-se concentrações finais variando entre 2000 e 3,90 µg/mL. Em cada micropoço foram distribuídos 10 µL de cada diluição, 85 µL de caldo de Müller-Hinton e 5 µL de inóculo bacteriano contendo, aproximadamente,  $10^8$  UFC/mL. Como controles de crescimento e esterilidade foram usados mistura do meio de cultura e inóculo bacteriano e meio de cultura e DMSO.

Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas foram incubadas conforme método já citado no item 3.7.1. A leitura foi realizada através da adição de 20 µL de uma solução alcóolica (70 %) reveladora de crescimento bacteriano INT (cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium), seguido de incubação por 30 min a 37 °C. A interpretação das placas se deu de acordo com a coloração, em que amarelo indica ausência de crescimento bacteriano e púrpura indica crescimento. A CMI foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano, sendo os resultados expressos em µg/mL.

## 3.9 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos foi realizada no Laboratório de Química de Alimentos da Universidade do Algarve – Faro, Portugal. A análise foi realizada em um cromatógrafo Jasco, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) (Jasco MD2015 Plus). Utilizou-se uma coluna C18 Nucleosil

(4,6 mm x 250 mm, 5  $\mu$ m), com fase móvel composta de água acidificada com ácido acético 1% (A) e acetonitrila (B), sendo o gradiente de eluição apresentado na Tabela 8. A vazão utilizada foi de 1,1 mL/min, com volume de injeção de 20  $\mu$ L, e a temperatura interna do sistema a 25 °C. A leitura foi realizada nos comprimentos de 280, 310 e 340 nm e o espectro de absorção foi gravado na faixa de comprimento de onda de 250 a 400 nm. Os cromatogramas obtidos foram analisados e comparados com o perfil dos padrões (tempos de retenção e espectro UV) para identificação dos prováveis compostos fenólicos presentes nas amostras de *S. mombin*.

Tabela 8 - Gradiente de eluição estabelecido para separação dos compostos fenólicos.

Tempo (min)	Eluentes (%)	
	A	B
0	95	5
0-6	95	5
6-14	80	20
14-18	80	20
18-20	70	30
20-30	70	30
30-38	20	80
38-40	95	5

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de rendimento global, teor de compostos fenólicos totais, atividades antioxidante e antimicrobiana foram avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA), utilizando o software Statistica para Windows 7,0 (StatsoftInc., EUA). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram analisadas pelo teste de Tukey.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DA MATÉRIA PRIMA

Os valores de umidade e substâncias voláteis, diâmetro médio de partículas e massa específica real que caracterizam a folha de cajazeira são apresentados na Tabela 9, como média  $\pm$  desvio padrão.

Tabela 9 - Características físicas da matéria-prima vegetal.

<b>Matéria-prima</b>	<b>Teor de umidade e voláteis (g/100g)</b>	<b>Diâmetro médio de partícula (mm)</b>	<b>Massa específica real (g/cm<sup>3</sup>)</b>
Folha de cajazeira	4,15 $\pm$ 0,89	0,22 $\pm$ 0,1	1,3515 $\pm$ 0,0006

A água presente na amostra pode afetar negativamente a extração, pois pode atuar como solvente e competir com o CO<sub>2</sub> supercrítico, prejudicando a transferência do soluto para o fluido. Porém, pequenas quantidades de água podem abrir os poros da matriz, facilitando o acesso ao soluto, além de solubilizar compostos relativamente polares, pouco solúveis em CO<sub>2</sub>, devido ao aumento da polaridade do solvente (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Logo, as etapas preliminares de secagem e de trituração da matéria prima são necessárias para reduzir a interferência da água no processo de extração e aumentar a área de contato da amostra. Reverchon e Marco (2006) afirmam que o tamanho médio de partículas deve ser entre 0,25 e 2 mm para utilização nas extrações a alta pressão, pois partículas muito pequenas podem formar caminhos preferenciais na passagem do CO<sub>2</sub> através do leito de extração, causando perda de eficiência e rendimento de extração.

### 4.2 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES A BAIXA PRESSÃO

Os rendimentos dos extratos da folha da cajazeira obtidos pelos processos a baixa pressão e seus índices de polaridade são apresentados na Tabela 10.

Observa-se na Tabela 10 que os resultados de rendimento variaram entre 2,3  $\pm$  0,1 para o extrato obtido em Soxhlet com hexano e 30,5  $\pm$  0,7 para a extração assistida por ultrassom utilizando como solvente etanol+água (1:1).

Tabela 10 - Rendimento global ( $X_0$ ) das extrações a baixa pressão, utilizando solventes com polaridades variadas.

Método de Extração	Solvente	Polaridade <sup>(1)</sup>	$X_0$ (%) <sup>(2)</sup>
Soxhlet	Hex	0,0	$2,3 \pm 0,1^d$
	EtOAc	4,4	$6,3 \pm 0,1^{cd}$
	EtOH	5,2	$22,5 \pm 0,5^{ab}$
	EtOH+H <sub>2</sub> O	7,1	$23,5 \pm 4,4^{ab}$
	H <sub>2</sub> O	9,0	$21,6 \pm 4,7^b$
Ultrassom	Hex	0,0	$2,9 \pm 1,3^d$
	EtOAc	4,4	$3,2 \pm 0,1^{cd}$
	EtOH	5,2	$11,4 \pm 1,3^c$
	EtOH+H <sub>2</sub> O	7,1	$30,5 \pm 0,7^a$
	H <sub>2</sub> O	9,0	$27,5 \pm 1,7^{ab}$
	EtOH*	5,2	$4,19 \pm 0,04^{cd}$

Hex: Hexano; EtOAc: Acetato de etila; EtOH: Etanol; EtOH-H<sub>2</sub>O: Etanol + Água; H<sub>2</sub>O: Água.

\*Resíduo da ESC submetido a nova extração.

<sup>(1)</sup> Índice de polaridade do solvente (BYERS, 2003).

<sup>(2)</sup> Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Os maiores valores de rendimento foram obtidos utilizando como solvente etanol+água (30,5 %) e água (27,5 %) para a técnica de ultrassom e etanol+água (23,5 %), etanol (22,5 %) e água (21,6 %) para a técnica de Soxhlet, não havendo diferença significativa ao nível de 5% entre os solventes para cada técnica. O fato do rendimento aumentar com o aumento da polaridade está relacionado a estes solventes apresentarem forte poder de dissolução de compostos polares, porém podem não apresentar atividades biológicas, como reportado por Benelli et al. (2010). A constante dielétrica pode também explicar os maiores rendimentos obtidos. Esta pode ser definida como a capacidade de reduzir a intensidade dos campos elétricos presentes no meio. Como a constante dielétrica da água é mais elevada do que a maioria dos líquidos, contribui para o aumento do rendimento da extração (BARWICK, 1997; MARKOM et al., 2007).

Comparando os métodos de extração a baixa pressão, para um mesmo solvente, só foi possível observar diferença significativa entre os rendimentos das extrações em Soxhlet e ultrassom para o etanol, sendo que a primeira apresentou o maior valor ( $22,5 \pm 0,5\%$ ), comparado com a técnica de ultrassom ( $11,4 \pm 1,3$ ). Estes resultados podem ser

relacionados as condições de operação da extração em Soxhlet, como recirculação de solvente e utilização de temperatura mais elevada, além das características do etanol que apresenta melhor eficiência de extração à temperatura de ebulição devido a diminuição da viscosidade do soluto, contribuindo para uma maior solubilização dos compostos (TOMAZIN JUNIOR, 2008).

Outros autores estudando a folha de *S. mombin* encontraram uma relação semelhante. Ayoka et al. (2006) utilizando a técnica de Soxhlet com solvente etanol+água (1:1) e utilizando maceração com água quente, encontraram valores de rendimento de 19,2 e 16,5 %, respectivamente. Já Shittu et al. (2014b) obtiveram 33,3 e 40 % de rendimento para a técnica de Soxhlet com solvente etanol+água (40 %) e água, respectivamente. Este comportamento foi atribuído pelos autores ao valor da constante dielétrica, sendo mais elevado para a água, apresentando maior rendimento de extração.

Pesquisas encontradas na literatura (AYOKA et al., 2006; MADUKA et al., 2014) mostram que os extratos etanólicos apresentam melhores resultados de atividade biológica (efeito neuroprotetor e melhor atividade antimicrobiana) em relação aos extratos aquosos. Desta forma, o etanol foi escolhido como cossolvente da ESC.

Observa-se que o resíduo da ESC submetido a extração adicional (US) apresentou rendimento de  $4,19 \pm 0,04$  %, não havendo diferença significativa para os extratos obtidos com hexano ( $2,3 \pm 0,1$  % e  $2,9 \pm 1,3$  %) e acetato de etila ( $6,3 \pm 0,1$  % e  $3,2 \pm 0,1$  %) utilizando SOX e US, respectivamente, além da extração em US com etanol ( $11,4 \pm 1,3$  %). Este é um resultado positivo visto que essa matéria-prima é o resíduo de uma etapa anterior de extração empregando um solvente de caráter apolar ( $\text{CO}_2$ ) (resultados apresentados no item 4.3), o que nos permite afirmar que esta matéria-prima é rica em compostos polares, como pode ser observado nos itens 4.4 e 4.5. Ara, Karami, Raofie (2014); Tchabo et al. (2015) e Kowalski e Wawrzykowski (2009) relataram o uso de tecnologias combinadas com a finalidade de aumentar quantitativa e qualitativamente os compostos extraíveis.

### 4.3 EXTRAÇÃO SUPERCRTICA

#### 4.3.1 Características do leito de extração

A Tabela 11 apresenta os valores de massa específica aparente e porosidade do leito, calculadas de acordo com as Equações 4 e 5, respectivamente. O conhecimento dessas características é importante

para o entendimento dos mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de extração.

Tabela 11 - Características do leito de extração supercrítica.

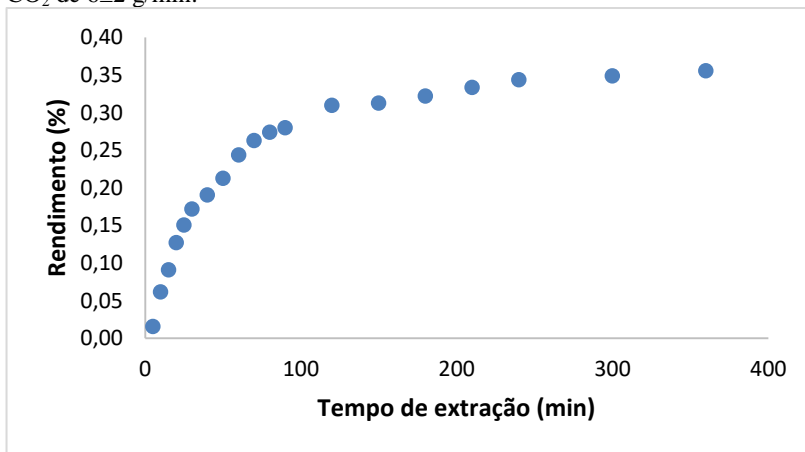
Matéria-prima	Massa específica aparente ( $\text{g/cm}^3$ )	Porosidade do leito
Folha de cajazeira	$0,28 \pm 0,01$	0,793

Os dados obtidos para a caracterização da matéria-prima, como porosidade do leito e densidade do sólido são necessários para a modelagem do processo de extração, a fim de avaliar a influência destes parâmetros na eficiência da extração (KITZBERGER, 2005).

#### 4.3.2 Curvas de extração

A cinética de extração para a folha da cajazeira é apresentada na Figura 12. A partir desta cinética padronizou-se o tempo total de extração em 3,5 h (210 min), para garantir o alcance da etapa difusiva para todas as condições de extração estudadas e formação da curva de extração. Ao fim deste tempo foi obtido um rendimento de 0,31%.

Figura 12 - Curva de extração da folha da cajazeira a 200 bar, 50 °C e vazão de  $\text{CO}_2$  de  $6 \pm 2$  g/min.





Os parâmetros cinéticos da extração, apresentados na Tabela 12, foram calculados com base nos dados obtidos na cinética de extração e são importantes para o estabelecimento do tempo das etapas da extração, assim como para estudar a modelagem matemática da cinética de extração, possibilitando a otimização de projetos e ampliação de escala laboratorial para industrial (SILVA, 2004).

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos de extração de folha de cajazeira a 200 bar, 50 °C e vazão de solvente de  $6 \pm 2$  g/min.

Parâmetro	Etapa de extração		
	CER	FER	DCP
t (min)	0-40	40-120	>120
m (g)	0,0294	0,0184	0,0081
X <sub>0</sub> (%)	0,1902	0,1191	0,0524
M (g/min)	0,0007	0,0002	0,0000
Y	0,0001		

t: duração da etapa de extração; m: massa de extrato aproximada; X<sub>0</sub>: rendimento da etapa; M: taxa de extração; Y: concentração de soluto na fase solvente; CER: etapa de velocidade de extração constante; FER: etapa de velocidade de extração decrescente; DCP: etapa de velocidade de extração difusional.

Como observado na Tabela 12, aos 120 minutos a etapa difusional já havia sido alcançada. Assim, o tempo de extração total a ser utilizado nos experimentos para avaliação do rendimento das extrações foi definido em 3,5h, como forma de garantir que a maior parte de extrato fosse extraída.

#### 4.3.3 Rendimento global da ESC (X<sub>0</sub>)

Os resultados dos rendimentos dos extratos da folha da cajazeira obtidos pela extração supercrítica são apresentados na Tabela 13. São apresentadas as condições de pressão e temperatura empregadas, bem como os valores de massa específica do solvente supercrítico.

O rendimento global da extração é influenciado pelas diferentes condições de pressão e temperatura empregadas, sendo que pequenas alterações nesses parâmetros interferem no poder de solubilização do solvente. A extração supercrítica apresentou os melhores rendimentos a 300 bar, nas temperaturas de 40 °C e 50 °C, sendo estes valores estatisticamente iguais. O menor rendimento foi verificado na pressão de 150 bar, para 40 °C e 50 °C, também sem diferença significativa.

Tabela 13 - Rendimento global de extração da folha da cajazeira ( $X_0$ ) obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	$\rho$ CO <sub>2</sub> (g/cm <sup>3</sup> )*	X <sub>0</sub> (%)
40	150	0,781	0,22 ± 0,05 <sup>b</sup>
	200	0,841	0,32 ± 0,001 <sup>ab</sup>
	300	0,911	0,50 ± 0,11 <sup>a</sup>
50	150	0,701	0,19 ± 0,02 <sup>b</sup>
	200	0,785	0,31 ± 0,07 <sup>ab</sup>
	300	0,871	0,51 ± 0,06 <sup>a</sup>
60	150	0,607	0,30 ± 0,06 <sup>ab</sup>
	200	0,724	0,31 ± 0,03 <sup>ab</sup>
	300	0,830	0,31 ± 0,01 <sup>ab</sup>

\*ANGUS; ARMSTRONG; DE REUCK, 1976

Avaliando a Tabela 13, observa-se que, à temperatura constante, há o aumento dos rendimentos com o aumento da pressão, exceto para a temperatura de 60 °C que obteve rendimento de 0,3 % para todas as pressões estudadas. Segundo Campos et al. (2005) o aumento da pressão pode gerar rupturas na matriz vegetal, liberando, assim, compostos que não estavam disponíveis, logo, aumenta-se o rendimento. A elevação da pressão causa também o aumento da densidade do solvente, que por sua vez aumenta o poder de solvatação do CO<sub>2</sub>, interferindo no rendimento do processo (BRUNNER, 1994). Apesar do aumento da densidade do solvente a 60 °C/300 bar (0,830 g/cm<sup>3</sup>), esta mantém-se inferior a obtida na condição de 40 °C/200 bar (0,841 g/cm<sup>3</sup>). Portanto, para esta matéria prima, o incremento do rendimento só será possível com densidades superiores a 0,841 g/cm<sup>3</sup>.

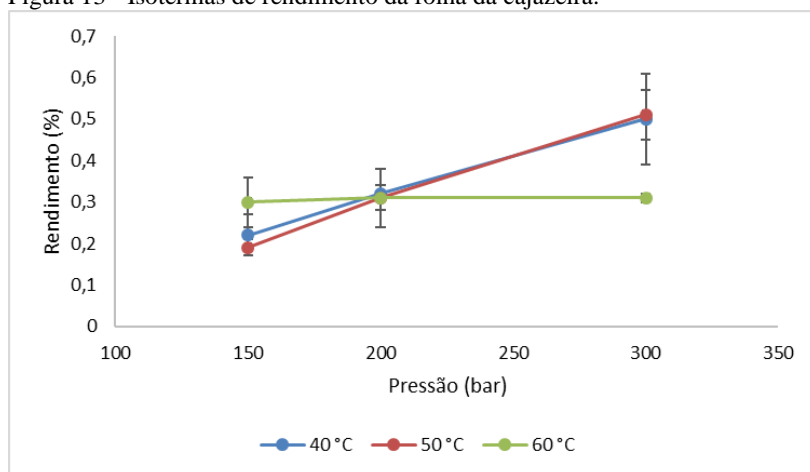
Sabe-se que o rendimento da extração é influenciado por diferentes fatores em baixas e altas pressões, e os efeitos opostos causados pela pressão de vapor do soluto e a massa específica do solvente geralmente resultam na inversão das isotermas de rendimento. Em pressões abaixo da inversão das isotermas, o aumento da temperatura resulta na diminuição da densidade, que resultará na diminuição do rendimento da extração. Já em pressões mais elevadas, após a inversão das isotermas, o efeito da densidade é mais sutil e o rendimento sofre influência da pressão de vapor causado pelo aumento de temperatura (BRUNNER, 1994).

Observa-se na Figura 13 que para as temperaturas de 40 °C e 50 °C não ocorre a inversão das isotermas, estando ambas muito próximas e dentro do erro experimental. Como não há a inversão das isotermas,

prevalece o efeito da densidade sobre o rendimento, no qual é nítido o efeito desta a 60 °C/300 bar.

Por conta do baixo rendimento dos extratos obtidos com CO<sub>2</sub> puro, não foram realizadas análises de atividade biológica com estes extratos, já que não havia material suficiente.

Figura 13 - Isotermas de rendimento da folha da cajazeira.



#### 4.3.4 Emprego de cossolvente

A extração supercrítica com CO<sub>2</sub> puro favorece a recuperação de compostos de baixa polaridade, devido ao caráter apolar do solvente. Assim, com a finalidade de melhorar o rendimento da extração e aumentar a extração de componentes de maior polaridade, utilizou-se o etanol em diferentes concentrações e a mistura etanol+água (3:1) como cossolvente de caráter polar.

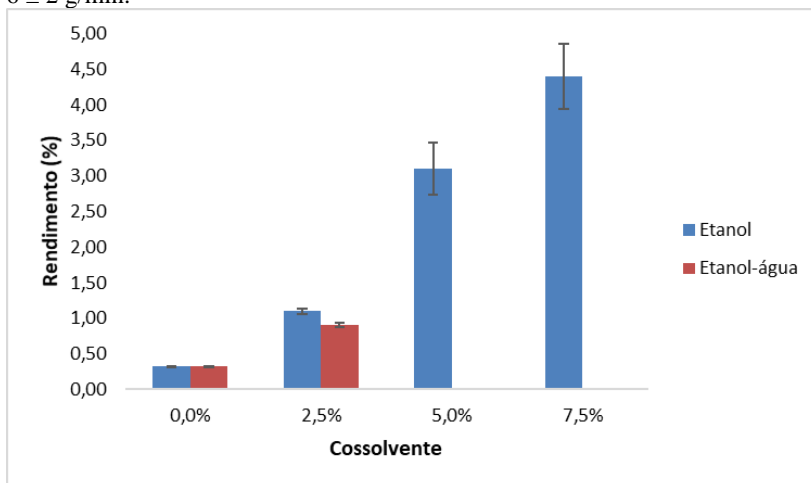
A escolha do etanol se deu por este apresentar melhor rendimento a baixa pressão, além de apresentar vantagens em relação aos outros solventes orgânicos, como baixa toxicidade, facilidade de eliminação por meio de rotaevaporação e também por ser comumente utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica. A adição de diferentes concentrações (2,5%, 5% e 7,5%) em relação à massa de CO<sub>2</sub> utilizada foi selecionada com base em outros estudos já realizados (ANDRADE; PONCELET; FERREIRA, 2017; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; MICHIELIN, 2013). A mistura etanol+água foi

avaliada em baixa concentração, pois para remover a água é necessário o uso de altas temperaturas podendo interferir na qualidade do extrato.

Para a extração supercrítica com adição de cossolvente foi selecionada a condição de 200 bar e 40 °C, pois por ser uma temperatura mais baixa evita a degradação térmica dos compostos, além de não haver diferença significativa no rendimento para os maiores resultados e possibilitar a economia de energia nesta condição.

Na Figura 14 são apresentados os rendimentos para a adição de 2,5%, 5% e 7,5% de etanol e 2,5% da mistura etanol+água.

Figura 14 - Rendimentos globais ( $X_0$ ) para os extratos da folha da cajazeira utilizando etanol e etanol+água como cossolventes a 200 bar, 40 °C e vazão de  $6 \pm 2$  g/min.



A adição de cossolvente à extração supercrítica elevou os valores de rendimento global, e a quantidade adicionada foi diretamente proporcional ao aumento do rendimento. Este comportamento é justificado pela maior solubilização de compostos polares na mistura etanol/ $\text{CO}_2$  e que não estavam disponíveis com o uso de  $\text{CO}_2$  puro.

O processo com adição de 7,5 % de etanol proporcionou um rendimento 13,8 vezes maior que o obtido nas mesmas condições com  $\text{CO}_2$  puro (de  $0,32 \pm 0,001$  %), apresentando diferença estatística entre os demais extratos. O menor rendimento foi obtido com a adição de etanol a 2,5 %, sendo estatisticamente igual ao obtido com a mesma fração de etanol+água, apresentando valores de 1,1 e 0,9%, respectivamente.

#### 4.4 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

Os valores encontrados para o teor de compostos fenólicos totais da folha da cajazeira, obtidos por diferentes métodos de extração são apresentados na Tabela 14. A curva padrão de ácido gálico, utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos é apresentada no Apêndice A.

Tabela 14 - Teor de compostos fenólicos totais (CFT), expressos em equivalentes de ácido gálico para os extratos da folha de *Spondias mombin*.

<b>Técnica de extração</b>	<b>Solvente</b>	<b>CFT (mg EAG/g extrato)**</b>
Soxhlet	Hexano	12,7 ± 1,0 <sup>g</sup>
	Acetato de etila	205,7 ± 11,7 <sup>e</sup>
	Etanol	410,1 ± 33,1 <sup>b</sup>
	Etanol+água	337,4 ± 10,9 <sup>cd</sup>
	Água	293,0 ± 6,9 <sup>d</sup>
Ultrassom	Hexano	16,2 ± 3,4 <sup>g</sup>
	Acetato de etila	96,4 ± 6,9 <sup>f</sup>
	Etanol	308,3 ± 7,9 <sup>d</sup>
	Etanol+água	226,6 ± 6,6 <sup>e</sup>
	Água	194,4 ± 4,3 <sup>e</sup>
	Etanol*	381,9 ± 15,0 <sup>bc</sup>
ESC 200bar/40°C	CO <sub>2</sub> +2,5% etanol	70,5 ± 3,2 <sup>IB</sup>
	CO <sub>2</sub> +5% etanol	53,1 ± 2,7 <sup>fgC</sup>
	CO <sub>2</sub> +7,5% etanol	58,6 ± 3,7 <sup>fgBC</sup>
	CO <sub>2</sub> +2,5% etanol+água	84,6 ± 7,8 <sup>fA</sup>
BHT		465,5 ± 27,4 <sup>a</sup>

\*Resíduo da ESC submetido a nova extração.

\*\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados da ESC 200bar/40°C.

O teor de compostos fenólicos totais variou de 12,7 a 410,1 mg EAG/g, no qual o menor valor foi obtido para a extração em Soxhlet usando como solvente o hexano e o maior valor obtido na mesma técnica de extração com etanol. Estes resultados estão de acordo com Ziakova e Brandsteterova (2002) que afirmam que os compostos fenólicos são caracterizados como polares, logo apresentam maior solubilização em solventes de maior polaridade. O resultado obtido para

o antioxidante sintético utilizado neste estudo foi de 465,5 mg EAG/g e diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) de todos os resultados obtidos para a folha da cajazeira. Porém os extratos obtidos em Soxhlet com etanol e ultrassom com etanol\* apresentaram 88,10 e 82,04 %, respectivamente, do teor apresentado para o BHT, demonstrando bons resultados do teor de compostos fenólicos.

De modo geral, comparando os resultados obtidos em relação aos diferentes solventes empregados a baixa pressão, a extração em Soxhlet apresentou melhores resultados. A utilização do etanol na técnica de Soxhlet ( $410,1 \pm 33,1$  mg EAG/g) não apresentou diferença estatística quando comparada a técnica de ultrassom para o resíduo proveniente da extração supercrítica ( $381,9 \pm 15,0$  mg EAG/g), comprovando que a ESC apresenta vantagens quando utilizada como pré-tratamento, sendo capaz de remover a parte mais apolar (compostos voláteis e cerosos) da matéria-prima, como afirmado por You et al., (2002), além de possibilitar uma extração em menor tempo e não utilização de temperaturas elevadas.

Na extração supercrítica com cossolvente o teor de compostos fenólicos variou entre 53,1 e 84,6 mg EAG/g. Estes resultados foram superiores aos obtidos com hexano na baixa pressão e não apresentou diferença significativa para a extração assistida por ultrassom utilizando acetato de etila, provando que a utilização do etanol como cossolvente possibilitou maior extração de compostos fenólicos. O maior valor corresponde a adição de 2,5 % de etanol+água e este apresentou diferença significativa das demais condições estudadas. Observa-se a redução dos valores de CFT com o aumento da concentração de etanol, resultados também encontrados por Andrade et al. (2012) e Andrade, Poncelet, Ferreira (2017) e explicado por Morrison e Boyd (1996), no qual afirma que, para cada matéria-prima, há uma concentração ótima de cossolvente a ser utilizada e em concentrações superiores a esta pode haver uma redução na extração de compostos polares devido à redução do efeito do etanol na mistura supercrítica.

Omorieg e Oikeh (2015) avaliaram o teor de compostos fenólicos de extratos metanólicos de folhas de *S. mombin* obtidos por 72 h de maceração, encontrando valores de 213,5 mg EAG/g, atribuídos a maior presença de compostos de origem não flavonóide. Shittu et al. (2014b) ao realizar uma triagem fitoquímica, no qual a presença do composto era indicada pela coloração verde escuro, encontraram ácidos fenólicos apenas no extrato obtido com etanol.

As diferenças apresentadas nos resultados de compostos fenólicos totais da literatura podem ser explicadas pelo uso de diferentes técnicas

de extração e quantificação, além de fatores relacionados com a variedade, condição e local de cultivo, colheita e armazenamento da matéria-prima (BRAVO, 1998).

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

##### 4.5.1 Método DPPH

Os resultados para a atividade antioxidante da folha da cajazeira, determinados através do método de DPPH são apresentados na Tabela 15 em termos de  $EC_{50}$ . O valor de  $EC_{50}$  expressa a concentração mínima necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do DPPH, sendo que menores valores representam maior atividade antioxidante. Estes resultados são comparados com o antioxidante sintético, BHT.

Tabela 15 - Potencial antioxidante dos extratos da folha de *Spondias mombin* avaliado pelo método DPPH.

Técnica de extração	Solvente	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )**
Soxhlet	Hexano	$140,9 \pm 1,5^{\text{h}}$
	Acetato de etila	$21,2 \pm 0,9^{\text{d}}$
	Etanol	$11,8 \pm 0,3^{\text{a}}$
	Etanol+água	$11,6 \pm 0,2^{\text{a}}$
	Água	$12,7 \pm 1,9^{\text{a}}$
Ultrassom	Hexano	$123,2 \pm 2,0^{\text{g}}$
	Acetato de etila	$50 \pm 0,6^{\text{c}}$
	Etanol	$14,9 \pm 0,2^{\text{a}}$
	Etanol+água	$20,8 \pm 0,2^{\text{b}}$
	Água	$24,4 \pm 0,1^{\text{b}}$
ESC 200bar/40°C	Etanol*	$13,5 \pm 0,1^{\text{a}}$
	CO <sub>2</sub> +2,5% etanol	$107,3 \pm 1,0^{\text{eA}}$
	CO <sub>2</sub> +5% etanol	$120,1 \pm 1,4^{\text{fgC}}$
	CO <sub>2</sub> +7,5% etanol	$233,2 \pm 0,7^{\text{id}}$
BHT	CO <sub>2</sub> +2,5% etanol+água	$116,3 \pm 1,7^{\text{tB}}$
		$72,5 \pm 4,1^{\text{d}}$

\*Resíduo da ESC submetido a nova extração.

\*\* Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados da ESC 200bar/40°C.

Os resultados para os extratos obtidos a baixa pressão variaram entre 11,6 e 140,9  $\mu\text{g/mL}$ , no qual os melhores resultados são encontrados nas extrações com solventes de maior polaridade, comprovando a maior afinidade de compostos polares a atividade antioxidante por este método. Este resultado já era esperado, uma vez que a atividade antioxidante pelo radical DPPH é menos eficiente para compostos lipídicos (APAK et al., 2007).

O extrato que apresentou a maior atividade antioxidante foi o obtido por etanol+água pelo método Soxhlet ( $11,6 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ ), corroborando com Cruz et al. (2017) ao estudar a semente de *Butia catarinensis*. Este extrato não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os extratos obtidos somente com etanol ( $11,8 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ) ou água ( $12,7 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$ ) para a mesma técnica e utilizando etanol no ultrassom ( $14,9 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ ). Desta forma, o uso do ultrassom é mais vantajoso por proporcionar uma extração mais rápida.

Os valores encontrados para o resíduo proveniente da ESC estão relacionados aos resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos, que, mesmo tendo um rendimento muito baixo, apresentou a maior atividade antioxidante ( $13,5 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) frente as demais extrações obtidas pela extração assistida por ultrassom.

Analisando os resultados da ESC observa-se que todos os extratos apresentaram resultados superiores ao antioxidante sintético ( $72,5 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$ ), diferindo significativamente. Dentre as demais tecnologias, esta proporcionou extratos com menor atividade antioxidante, justificado pela menor polaridade do solvente empregado (maior quantidade de  $\text{CO}_2$ ), no qual mesmo com o aumento da concentração de etanol não houve incremento nos resultados. Como explicado no item 4.4 há uma concentração ótima de cossolvente, que para esta matéria prima é 2,5 %, e acima desta há redução na extração de compostos polares (CAMPOS et al., 2008).

A melhor atividade antioxidante foi encontrada quando se utilizou 2,5 % de etanol ( $107,3 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ ), apresentando uma correlação com os valores encontrados para o teor de compostos fenólicos, uma vez que estes são um dos principais grupos de compostos com atividade antioxidante.

Omoregie e Oikeh (2015), encontraram valores de  $\text{EC}_{50}$  de 144,89  $\mu\text{g/mL}$  ao estudar o extrato metanólico de folhas de *S. mombin*. Estes resultados foram relativamente baixos em comparação ao padrão analisado de ácido ascórbico (118,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Cabral et al. (2016), ao avaliarem o extrato obtido por maceração em etanol+água (70:30, v/v) por 7 dias encontraram um percentual de



atividade antioxidante de 70 % para a concentração de 60 µg/mL. Este resultado é inferior ao obtido em Soxhlet com etanol+água neste estudo, no qual, para a concentração de 25 µg/mL o percentual de inibição foi de 91,4 %. Embora a melhor forma de expressar os resultados obtidos pelo método de DPPH seja o EC<sub>50</sub>, os resultados expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH são úteis para a comparação com os resultados obtidos, uma vez que são poucos os trabalhos relatados na literatura.

Avaliando os resultados apresentados neste estudo observa-se que todos os extratos obtiveram valores de EC<sub>50</sub> inferiores a 250 µg/mL, sendo alguns deles inferiores ao BHT. Segundo Campos et al. (2008), os valores de EC<sub>50</sub> inferior a 250 µg/mL são considerados de alto potencial antioxidante, indicando a necessidade de baixas concentrações de extrato para inibir em 50 % a atividade do radical.

#### 4.5.2 Método ABTS

Na Tabela 16 são apresentados os resultados da atividade antioxidante para o método ABTS, dos extratos da folha da cajazeira, expressos em µM equivalente ao Trolox (µM TEAC/g).

Os extratos obtidos por etanol e etanol+água pelo método em Soxhlet apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante, 3030,1 e 2594,7 µM TEAC/g, respectivamente, e diferiram estatisticamente entre si e dos demais extratos, podendo ser associado ao teor de compostos fenólicos, no qual os melhores resultados foram obtidos nas mesmas condições. Em comparação com o BHT, o extrato chegou a ser 2,9 vezes superior, demonstrando o potencial antioxidante da folha da cajazeira frente também a outras matrizes vegetais como camu-camu, acerola, jaboticaba e cajá que apresentaram atividade antioxidante de  $1237 \pm 33,8$ ,  $953 \pm 34,1$ ,  $317 \pm 2,7$  e  $40,7 \pm 2,2$  µM TEAC/g, respectivamente, em estudo com frutas tropicais brasileiras (RUFINO et al., 2010) e para folhas secas da pera do cerrado (*Eugenia klotzschiana* Berg) com valor de  $143,85 \pm 5,35$  µM TEAC/g (CARNEIRO et al., 2017).

A extração em Soxhlet utilizando água ( $2108,6 \pm 16,1$  µM TEAC/g) como solvente não diferiu significativamente da extração em ultrassom utilizando etanol ( $2254,3 \pm 9,7$  e  $2155,0 \pm 20,1$  µM TEAC/g) (ambas extrações) e apresentou resultados superiores ao do antioxidante sintético ( $1039,0 \pm 12,3$  µM TEAC/g).

Tabela 16 - Capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS para os extratos de folha de cajazeira.

Técnica de extração	Solvente	ABTS ( $\mu\text{M}$ TEAC/g <sub>extrato</sub> )*:(1)
Soxhlet	Hexano	$336,8 \pm 3,5^{\text{h}}$
	Acetato de etila	$1488,3 \pm 44,4^{\text{d}}$
	Etanol	$3030,1 \pm 60,1^{\text{a}}$
	Etanol+água	$2594,7 \pm 60,3^{\text{b}}$
	Água	$2108,6 \pm 16,1^{\text{c}}$
Ultrassom	Hexano	$341,9 \pm 4,2^{\text{h}}$
	Acetato de etila	$737,4 \pm 5,0^{\text{g}}$
	Etanol	$2254,3 \pm 9,7^{\text{c}}$
	Etanol+água	$1447,8 \pm 17,0^{\text{de}}$
	Água	$1137,0 \pm 11,3^{\text{ef}}$
ESC 200bar/40°C	Etanol*	$2155,0 \pm 20,1^{\text{c}}$
	CO <sub>2</sub> +2,5% etanol	$326,0 \pm 0,7^{\text{hA}}$
	CO <sub>2</sub> +5% etanol	$282,1 \pm 15,3^{\text{hB}}$
	CO <sub>2</sub> +7,5% etanol	$284,4 \pm 21,5^{\text{hB}}$
BHT	CO <sub>2</sub> +2,5% etanol+água	$332,4 \pm 5,4^{\text{hA}}$
		$1039,0 \pm 12,3^{\text{f}}$

\*Resíduo da ESC submetido a nova extração.

\*\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados da ESC 200bar/40°C.

(1) capacidade antioxidante expressa em equivalentes de Trolox.

Por este método apresentar afinidade tanto para compostos hidrofílicos quanto lipofílicos esperava-se melhores resultados para os extratos obtidos por hexano e CO<sub>2</sub> (RE et al., 1999), porém estes apresentaram os menores resultados para as condições testadas, não diferindo estatisticamente. Dessa forma, verifica-se que os compostos responsáveis pelo potencial antioxidante apresentam maior afinidade por solventes de polaridade intermediária a alta.

Ao comparar somente os resultados da ESC observa-se que estes tiveram um comportamento semelhante ao apresentado na análise de DPPH e CFT, onde os melhores resultados foram para a menor concentração de cossolvente adicionada, com valores de 332,4 e 326,0  $\mu\text{M}$  TEAC/g para 2,5 % de etanol+água e etanol, respectivamente, sendo explicado por Campos et al. (2008), a relação entre a

concentração ótima de cossolvente adicionado e o resultado obtido, como relatado nos itens 4.4 e 4.5.1.

Estes resultados demonstram o potencial da folha da cajazeira para utilização como antioxidante natural, necessitando de mais testes, incluindo em sistemas biológicos, para comprovação da sua eficácia e efeitos tóxicos.

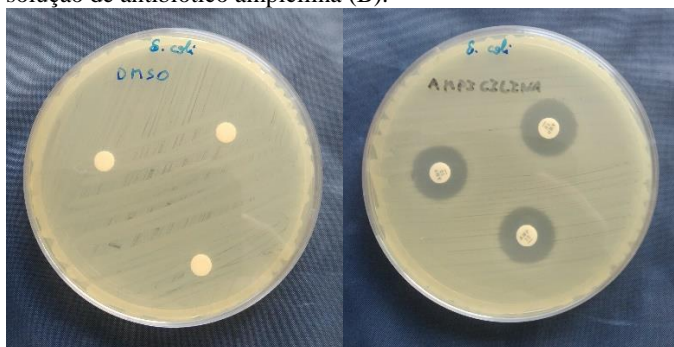
## 4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 4.6.1 Método de Difusão em Ágar

A atividade antimicrobiana dos extratos de *S. mombin* obtidos por diferentes técnicas de extração foi determinada pelas técnicas de difusão em ágar e microdiluição em meio líquido. Os extratos foram testados para os microrganismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A Figura 15A ilustra os testes previamente realizados para a solução de DMSO a 60 %, em que não houve presença de halos de inibição. Já na Figura 15B pode-se observar a formação de halos de inibição para a solução de antibiótico ampicilina frente a bactéria *E. coli*.

Figura 15 - Placas de testes apresentando ausência de halos de inibição para soluções de DMSO 60% para *E. coli* (A) e presença de halos de inibição para solução de antibiótico ampicilina (B).



A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos para a técnica difusão em ágar, em termos de tamanho de halos de inibição para os microrganismos testados.

Tabela 17 - Resultados do teste de difusão em ágar expressos em tamanho do halo de inibição (mm) para os extratos de folha de cajazeira.

Técnica de extração	Solvente	Halo de inibição (mm)				
		<i>B. cereus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. auruginosa</i> / <i>S. cerevisiae</i>
Sox	Hexano	7,1	9,7	7,0	6,6	SI
	Acetato de etila	8,7	9,6	7,0	7,0	SI
	Etanol	7,9	7,8	7,6	7,0	SI
	Etanol+ água	7,3	7,5	6,7	SI	SI
US	Água	SI	SI	SI	SI	SI
	Hexano	8,0	9,6	SI	SI	SI
	Acetato de etila	9,0	8,3	6,9	7,5	SI
	Etanol	7,4	8,6	7,0	7,4	SI
	Etanol+ água	8,1	6,6	6,5	SI	SI
	Água	6,6	SI	SI	7,6	SI
ESC 200bar/ 40°C	Etanol*	8,0	6,6	6,6	SI	SI
	CO <sub>2</sub> + 2,5% etanol	8,5	10,7	8,0	7,1	SI
	CO <sub>2</sub> + 5% etanol	8,4	11,4	7,6	SI	SI
	CO <sub>2</sub> + 7,5% etanol	8,3	8,3	SI	SI	SI
CO <sub>2</sub> + 2,5% etanol+ água	10,3	9,6	7,5	SI	SI	

SI: Sem inibição de crescimento

Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana para pelo menos dois dos microrganismos testados, exceto o extrato obtido por Soxhlet com água que não inibiu nenhum microrganismo. A ESC com cossolvente possibilitou os melhores resultados de atividade antimicrobiana, com inibição de até cinco microrganismos. Este resultado pode ser devido a presença de alcaloides que em sua forma básica são extremamente solúveis em solventes de baixa polaridade, apresentando comprovada atividade antimicrobiana (SIMÕES et al., 2017; NWAOGU et al., 2007; AGBAFOR, 2004).

A maioria dos extratos de cajá obtidos no presente trabalho pode ser caracterizada como antimicrobiano de ação moderada, apresentando halos de inibição maiores que 9 mm para pelo menos um microrganismo (MOTHANA e LINDEQUIST, 2005). Para os métodos a baixa pressão, destaque foi observado para os extratos obtidos com hexano e com acetato de etila e ao comparar os extratos obtidos com etanol e com água observa-se que o etanol é mais eficiente na obtenção de compostos antimicrobianos, independente da técnica de extração utilizada.

Na extração supercrítica, com exceção do extrato com 7,5 % de cossolvente, todos os demais extratos apresentaram halos de inibição maiores do que 9,0, sendo que os extratos com adição de 2,5 % de cossolvente foram os únicos a inibir o crescimento da levedura *S. cerevisiae*, e chegando a obter halo de inibição de 11,4 mm para *L. innocua*. Palma et al. (1999) afirmam que a ausência de ar e luz durante o processo de ESC protege a bioatividade dos extratos. Portanto, o resultado encontrado neste estudo pode ser devido a extração de algum composto específico que só está disponível nestas condições. Outros estudos desenvolvidos no LATESC apresentam resultados semelhantes, no qual os extratos obtidos por extração supercrítica apresentam maior atividade antimicrobiana do que técnicas tradicionais de extração (MAZZUTTI et al., 2012, 2017; OLIVEIRA et al., 2013, 2016). O presente estudo foi o primeiro do LATESC que realizou ensaios de atividade antimicrobiana para a *S. cerevisiae*. Este microrganismo é utilizado como ingrediente alimentar e, em equilíbrio, não causa nenhum problema ao consumidor. Porém estudos relatam que em pacientes com doenças intestinais, como doença de Crohn e doença celíaca, há maior produção de anticorpos contra este microrganismo, relacionando-o ao desenvolvimento destas doenças (MAIN et al., 1988; PRIDEAUX et al., 2012; MALLANT-HENT et al., 2006).

O componente antimicrobiano ativo presente nos extratos é mais facilmente extraído com solventes de baixa polaridade, corroborando

com Palma et al. (1999) que afirmam que a fração lipídica é mais efetiva por apresentar esteróis.

Maduka et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *S. mombin* submetidos a maceração por 24 horas e verificaram que o extrato obtido por etanol teve maior poder antimicrobiano em relação ao extrato aquoso, sendo efetivo contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Aromolaran e Badejo (2014) também testaram a folha da cajazeira para *S. aureus* encontrando halos de inibição de 12,8, 12,5, 11,17 e 10,67 mm para os extratos obtidos com metanol, etanol, acetona e água, respectivamente.

Estes resultados podem ser explicados pela diferença na estrutura celular das bactérias. As bactérias Gram positivas são, normalmente, mais susceptíveis à ação dos antimicrobianos por possuírem na sua estrutura apenas a parede celular, enquanto que as Gram negativas possuem uma membrana exterior em torno da parede celular, que age como uma barreira à permeabilidade (SMITH- PALMER et al., 1998).

#### **4.6.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)**

Como reportado na seção 3.8.1, os extratos que apresentaram halo de inibição de crescimento acima de 9 mm no método de difusão em ágar, foram submetidos ao método quantitativo de microdiluição para determinação da concentração mínima inibitória.

Os resultados são apresentados na Tabela 18. Não foi realizado o teste para a bactéria *P. aeruginosa* devido à ausência de inibição de crescimento para todos os extratos testados na análise anterior. É possível classificar os extratos de acordo com o valor do CMI, onde para valores até 500 µg/mL o extrato é considerado forte inibidor, entre 600 e 1500 µg/mL moderado inibidor e acima de 1600 µg/mL fraco inibidor (DUARTE et al., 2007; WANG et al., 2008; SARTORATTO et al., 2004).

Analisando a Tabela 18 observa-se que os extratos obtidos em Soxhlet obtiveram melhores resultados, podendo ser classificados como fortes inibidores contra a bactéria *E. coli* (15,6 µg/mL). O extrato obtido por acetato de etila em ultrassom também teve forte inibição contra a *E. coli* (15,6 µg/mL).

Tabela 18 - Concentração mínima inibitória dos extratos de folha de cajazeira.

Técnica de extração	Solvente	Concentração Mínima Inibitória ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
		<i>B. cereus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Soxhlet	Hexano	>1000	>1000	SI	15,6	-
	Acetato de etila	SI	SI	SI	15,6	-
Ultrassom	Hexano	SI	>1000	-	-	-
	Acetato de etila	SI	>1000	SI	500	-
ESC 200bar/40°C	CO <sub>2</sub> +2,5% etanol	>1000	250	>1000	SI	SI
	CO <sub>2</sub> +5% etanol	>1000	500	SI	-	-
	CO <sub>2</sub> +2,5% etanol-água	>1000	500	>1000	-	250

SI: Sem inibição de crescimento

Na extração supercrítica os extratos analisados são considerados fortes inibidores para a *L. innocua*, apresentando melhores resultados para os extratos cuja adição de cossolvente foi de 2,5 %. O extrato obtido com 2,5 % de etanol+água foi o único que apresentou inibição para a *S. cerevisiae*, apresentando valores de 250 µg/mL. Outros autores também encontraram melhores resultados para os extratos obtidos com CO<sub>2</sub>, ao comparar com os solventes utilizados a baixa pressão (BENELLI et al., 2010; MAZZUTTI et al., 2012, 2017; MICHIELIN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013, 2016).

Aromolaran e Badejo (2014) obtiveram valores de concentração mínima inibitória de 10000 µg/mL para extratos da folha da cajazeira obtidos com os solventes metanol, acetona e etanol. Shittu et al. (2014b) ao avaliarem a CMI de extratos aquoso e alcoólico da folha de *S. mombin* obtidos em Soxhlet, encontraram valores de 41560 e 83130 µg/mL para duas variedades de *Vibrio cholerae* subgrupo 01. Da Silva et al. (2012) encontraram valores de CMI de 125 µg/mL para cada uma das bactérias testadas (*Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter cloacae*) para folhas maceradas com metanol:água (80:20).

Diversos são os fatores que podem interferir nos diferentes valores de CMI, como a técnica de análise aplicada, a cepa do microrganismo utilizado, além de fatores relacionados a planta como local de plantio, época da coleta e métodos de obtenção dos extratos.

O amplo espectro da atividade antimicrobiana apresentado pelos extratos da folha da cajazeira, agindo sobre bactérias Gram positivas e negativas, demonstra a importância desta matéria-prima para a obtenção de extratos com variadas atividades antimicrobianas para usos em alimentos e fármacos, promovendo a manutenção da qualidade, aumento da vida útil dos produtos e utilização no tratamento de doenças, corroborando com a medicina popular na busca de alternativas para a obtenção de produtos de alto valor agregado.

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CLAE

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada para os extratos que apresentaram elevada atividade antioxidante com o objetivo de observar possíveis diferenças entre eles em função dos diferentes compostos presentes em cada um. O tempo de retenção e os espectros UV das amostras e dos padrões foram utilizados para a identificação dos compostos.

Inicialmente foram realizados ensaios com os padrões isolados e uma mistura deles, sendo observado que o tempo de retenção (Tr) de



alguns compostos era alterado em decorrência da presença dos demais. Este fato também foi percebido nas análises das amostras. Os espectros UV para os padrões utilizados são demonstrados na Figura 19, no Apêndice B.

O método testado para a mistura de padrões obteve como resultado os picos e Tr apresentados na Figura 16 e Tabela 19, respectivamente.

Figura 16 - Cromatograma dos padrões analisados.

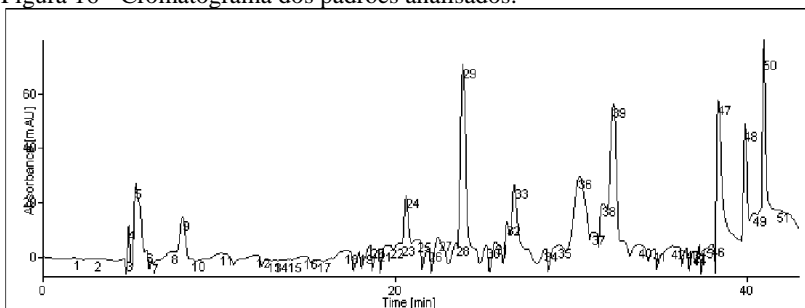


Tabela 19 - Identificação dos padrões analisados.

Pico	Composto	$\lambda$ (nm)	Tr (min)
9	Ácido gálico	267	7,3
23	Ácido cafeico	321	20,4
24	Ácido clorogênico	327	20,6
27	Catequina	273	22,5
29	Ácido vanílico	255	23,8
33	Rutina	255	26,8
36	Ác elágico	255	30,4
39	Ác ferrúlico	321	32,3
48	Quercetina	255	39,8
50	Kaempferol	261	40,9

A Tabela 20 apresenta os compostos presentes nas amostras analisadas apresentados em porcentagem de área. Os padrões utilizados foram ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido ferrúlico, ácido gálico, ácido vanílico, catequina, kaempferol, quercetina e rutina.

Os cromatogramas obtidos para as amostras estão apresentados no Apêndice B.

Os resultados apresentados estão de acordo com Omoregie e Oikeh (2015), o qual sugerem que o conteúdo fenólico total encontrado nas folhas de *S. mombin* é em maior quantidade de compostos de origem não flavonoide.

Nos extratos de *S. mombin* foram identificados os ácidos cafeico, elágico, gálico, vanílico, catequina e rutina. Estes compostos foram identificados em outros trabalhos com a cajazeira e são responsáveis por diferentes bioatividades, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiviral e efeito sedativo (AYOKA et al., 2006; CORTHOUT et al., 1992; SILVA et al., 2011). Os compostos fenólicos são considerados importantes antioxidantes por reagirem rapidamente com o radical livre, protegendo células sadias. Portanto, estes compostos podem ser responsáveis pela forte atividade antioxidante verificada.

Tabela 20 - Compostos presentes no perfil químico das amostras de *S. mombin*, apresentados em porcentagem de área.

Técnica de extração	Solvente	Compostos fenólicos (% área)						
		Ác. cafeico	Ác. elágico	Ác. gálico	Ác. vanílico	Catequina	Rutina	
Sox	Etanol	1,11	8,33	1,24		1,27	0,72	
	Etanol	2,78	4,26	0,19		2,58	4,79	
US	Etanol*	5,51	4,09	0,17		4,81		
	CO <sub>2</sub> + 2,5% etanol		4,93	0,69	2,81	6,90		
ESC 200bar/ 40°C	CO <sub>2</sub> + 2,5% etanol+ água		7,69	1,23	0,71	6,68		

\*Resíduo da ESC submetido a nova extração

Comparando os compostos presentes nos extratos pode-se verificar que as técnicas de extração empregadas possibilitaram a obtenção de perfis um pouco diferentes, no qual a atividade antioxidante pode estar relacionada ao efeito sinérgico dos diferentes compostos. Em todas as amostras foram obtidos picos com maiores intensidades que não se assemelharam aos perfis dos padrões, podendo estar presente outros compostos fenólicos não estudados neste trabalho ou a isomerização dos compostos já identificados.

Em todas as amostras analisadas foi encontrado um composto que apresentou Tr e espectros UV semelhante ao padrão catequina. Este composto também conhecido como flavan-3-ol, é considerado um tanino condensado quando está ligado à duas ou mais moléculas dela mesma (Hagerman, 2002), apresentando melhor atividade antioxidante nesta forma (Gu et al., 2003). Este composto também apresenta importante atividade antimicrobiana, possuindo elevada toxicidade em relação aos microrganismos através de diferentes mecanismos de ação (SCALBERT, 1991). Ayoka et al. (2006), Omoregie e Oikeh (2015), Shittu et al. (2014b) também reportaram a presença de taninos em extratos da folha de *S. mombin*. Outras plantas pertencentes a família *Anacardiaceae* tem a presença de taninos relacionadas a atividade antifúngica, anti-inflamatória, antimalária, antitumoral, antiviral, citotóxica e hipoglicemiante, além das já citadas antimicrobiana e antioxidante (LIMA et al., 2004; LOGUERCIO, 2005; ERAZO et al., 2006; RAYNE e MAZZA, 2007).

A rutina, também denominada quercetina-3-O-rutosídeo, é um flavonóide presente naturalmente no reino vegetal, com elevada atividade antioxidante, além de atividade anti-inflamatória e antiviral (BÜRGER, 2008). Por possuir maior polaridade que os ácidos fenólicos, a rutina tem menor solubilidade em CO<sub>2</sub> supercrítico, justificando a não identificação desta nas amostras obtidas a alta pressão. Silva (2012) relacionou a elevada atividade antioxidante de extratos da folha da cajazeira, obtidos por maceração com metanol, com a presença de flavonoides, sendo a rutina identificada como composto majoritário. Silva et al. (2011) em estudos com *S. mombin* e *S. tuberosa* reportou a atividade antiviral contra o vírus da dengue tipo 2 (DENV-2) dos extratos e dos compostos isolados rutina, quercetina e ácido elágico.

Os ácidos fenólicos são associados a diversas atividades biológicas. Cabral (2014), em testes com ratos sugeriu que o ácido elágico e o ácido clorogênico, estejam envolvidos na atividade anti-inflamatória apresentada por extratos de *S. mombin* e relacionou a atividade antimicrobiana a compostos de caráter polar. Kang et al.

(2006), em testes com ratos, reportou que o ácido elágico possui propriedade terapêutica contra o vírus da hepatite B.

Corthout et al. (1991) associaram a atividade antiviral a presença de elagitaninos em extrato obtido por uma série de solventes de diferentes polaridades. Outros trabalhos relataram a atividade antimicrobiana em decorrência da presença de galotaninos (ENGELS et al, 2009; TIAN et al., 2009a,b). O efeito antimicrobiano pode estar associado à presença desses compostos, juntamente com a presença de taninos condensados.

Ramalho e Jorge (2006) demonstraram em testes, que a atividade antioxidante do ácido cafeico era superior ao antioxidante sintético BHT, seguido dos ácidos 3,4-diidroxibenzoico, ác. sinápico, ác. siríngico, ác. ferrúlico, ác. p-cumárico e ác. vanílico. Portanto, o ácido cafeico pode ser o composto principal responsável pela maior atividade antioxidante dos extratos obtidos a baixa pressão.

Assim, para os extratos de *S. mombin* obtidos com solventes orgânicos foi identificado maior número de compostos fenólicos, no qual a maior influência da atividade antioxidante deve-se a presença do ácido cafeico, ácido elágico, catequina e rutina. Já para os extratos obtidos a alta pressão a atividade antioxidante pode ser relacionada a presença de ácido elágico e catequina, sendo estes diretamente associados a atividade antimicrobiana apresentada no item 4.6, destacando a importância da definição da tecnologia empregada para obtenção dos extratos de acordo com a atividade biológica desejada.

Podemos concluir que os compostos reportados são, provavelmente, os maiores responsáveis pela atividade biológica dos extratos estudados, de forma total ou parcial, sendo necessário demais análises para comprovação, como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectro de massas e análise de quantificação.



## 5 CONCLUSÃO

Ao estudar as técnicas de extração a baixa pressão observa-se que ao utilizar solventes de maior polaridade obtêm-se maiores valores de rendimento. Estes foram significativamente maiores aos obtidos por extração supercrítica, no qual a adição de cossolvente permitiu um aumento considerável nos valores de rendimento, apresentando uma relação direta para a quantidade de modificador adicionada.

As extrações testadas permitiram a obtenção de resultados satisfatórios para o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, no qual os extratos obtidos por solventes de alta polaridade em Soxhlet e em ultrassom apresentaram os melhores resultados, superiores ao BHT nas análises de DPPH e ABTS. De forma geral, a utilização de concentrações mais baixas de cossolvente na ESC possibilitou resultados superiores do que quando utilizado hexano à baixa pressão.

A atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos de *S. mombin* obtida por solventes de menor polaridade à baixa pressão e por ESC tiveram resultados mais expressivos, inibindo pelo menos dois dos microrganismos testados. Os extratos obtidos à alta pressão com as menores concentrações de cossolvente destacam-se por serem os únicos que apresentaram inibição para a levedura testada.

A análise cromatográfica revelou a presença de compostos similares para os extratos obtidos por diferentes técnicas de extração. Estes compostos podem ser relacionados com a atividade antioxidante e antimicrobiana.

O presente trabalho contribuiu para ampliar os estudos relacionados a folha da cajazeira, mostrando-se fonte de compostos com importante atividade biológica podendo ser utilizado para a geração de outros produtos com valor agregado, aplicados na área alimentar, medicinal ou farmacêutica.





## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação do potencial antioxidante dos extratos *in vivo* empregando culturas de células endoteliais;
- Avaliação da atividade anti-inflamatória e toxicidade dos extratos;
- Avaliação da extração por líquido pressurizado;
- Avaliação da composição química por CLAE de todos os extratos, ampliando o número de compostos analisados;
- Avaliação da composição química dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectro de massa e análise de quantificação.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIOLY, M. P. et al. Leishmanicidal activity in vitro of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 79-84, 2012.
- ADESINA S. K. Studies on some plants used as anticonvulsants in American and African traditional medicine. **Fitoterapia**, v. 53, p. 147-162, 1982.
- AGBAFOR, K. N. The effect of aqueous and organic extracts of fresh leaves of *Baphia nitida* on tissue acetylcholinesterase in guinea pigs. **Journal of Science and Technology**, v. 10, p. 1-8, 2004.
- AKUBUE, P. I.; MITTAL, G. C.; AGUWA, C. N. Preliminary Pharmacological Study of some Nigerian Medicinal Plants. 1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 53-63, 1983.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALEXANDER, B. et al. A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 41, n. 2, p. 55-58, 1999.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 244-248, set. 2009.
- ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, p. 544-552, 2012.
- ANDRADE, K. S.; PONCELET, D.; FERREIRA, S. R. S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**, v. 204, p. 38-45, 2017.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas De Extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319–336, 2007.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists** – Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18. ed. Maryland:AOAC, 2005

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S.; BEKTAŞOĞLU, B.; BERKER, K.; ÖZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v. 12(7), p. 1496-1547, 2007.

ARA, K. M.; KARAMI, M.; RAOFIE, F. Application of response surface methodology for the optimization of supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction of *Capparis spinosa* seed oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 85, p. 173–182, 2014.

AROMOLARAN, O.; BADEJO, O. K. Efficacy of fresh leaf extracts of *Spondias mombin* against some clinical bacterial isolates from typhoid patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 6, p. 442–446, 2014.

ÁVILA, H. P. et al. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9790–9794, 2008.

AYOKA, A. O. et al. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 166–175, jan. 2006.

AYOKA, A. O. et al. Studies on the anxiolytic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 2, p. 153-165, 2005.

BABU, PR Sathesh et al. Solubility enhancement of cox-II inhibitors by cosolvency approach. **Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 119-126, 2008.

- BADARINATH, A. V et al. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276–1285, 2010.
- BAJEROVÁ, P. et al. Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. **Journal of separation science**, v. 37, n. 7, p. 835-844, 2014.
- BARWICK, Vicki J. Strategies for solvent selection – a literature review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 293-309, 1997.
- BELLUZZO, Ana Silvia Fidelis. **Caracterização parcial da polifenoloxidase e avaliação de compostos fenólicos e antioxidantes em pêssego (cv. BIUTI)**. 98f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2008
- BENDICHO, C.; LAVILLA, I. Ultrasound extractions. **Encyclopedia of separation science**. Academic Press, London, v. 56, p. 1448-1454, 2000.
- BENELLI, P. et al. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132–141, 2010.
- BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre Métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1–20, 2011.
- BRAGA, R. **Plantas Do Nordeste**, Especialmente Do Ceara. 4 ed ed. Fortaleza: Ed. Universitária, UFRN, 1960.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.
- BRUNNER, Gerd. **Gas Extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. Darmstadt: Steinkopff. New York. Springer, v. 4, 1994.

BURDICK e JACKSON. **Dielectric Constant**. Disponível em: <<http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Dielectric Constant .htm>>. Acesso em: 28 set. 2017.

BÜRGER, D. Ações da Quercetina como Agente Cicatrizante. **Revista Ciência em Curso**, v. 3, n. 2, 2008.

BURKILL, H. M. **Spondias mombin Linn.** [family ANACARDIACEAE]. 1985. Disponível em: <[http://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.upwta.1\\_210](http://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.upwta.1_210)>. Acesso em: 3 abr. 2017.

BYERS J. A, **Solvent Polarity and Miscibility Data**. Chemical Ecology. 2003. <http://www.chemical-ecology.net/java/solvents.htm>. Acesso em: 05 fev. 2016.

CABRAL, Bárbara. **Caracterização dos marcadores químicos e avaliação de atividades biológicas do extrato de Spondias mombin (ANACARDIACEAE)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Natal, Rio Grande do Norte. 2014.

CABRAL, B. et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 304-311, mar. 2016.

CAMPOS, L. M. A. S. et al. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 163-170, 2005.

CAMPOS, L. M. A. S. De et al. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413–8420, 2008.

ČKANADANOVIĆ-BRUNET, J. M. et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Beet Root Pomace Extracts. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. 6, p. 575-585, 2011.

CARNEIRO, N. S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of

Eugenia klotzschiana Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.

CHU, Yan-Hwa; HSU, Hsia-Fen. Effects of antioxidants on peanut oil stability. **Food chemistry**, v. 66, n. 1, p. 29-34, 1999.

CHUTIA, M. et al. Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 777-780, abr. 2009.

CORTHOUT, J. et al. Antibacterial and Molluscicidal Phenolic Acids from Spondias mombin. **Planta Medica**, v. 60, n. 5, p. 460-463, 4 out. 1994.

CORTHOUT, J. et al. Antiviral caffeoyl esters from Spondias mombin. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1979-1981, jun. 1992.

CORTHOUT, J. et al. Antiviral ellagitannins from Spondias mombin. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1129-1130, jan. 1991.

CRUZ, P. N. et al. Antioxidant and antibacterial potential of butia (Butia catarinensis) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 229-237, 2017.

DA SILVA, A. R. A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two Spondias species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740-746, 10 jun. 2012.

DAVID, J. R. D.; STEENSON, L. R.; DAVIDSON, P. M. Expectations and applications of natural antimicrobials to foods: A guidance document for users, suppliers, research and development, and regulatory agencies. **Food Protection Trends**, v. 33, n. 4, p. 241-250, 2013.

DHARNANANDA, Subhuti. The uses of tannins in Chinese medicine. In: **Proceedings of Institute for Traditional Medicine Portland, Oregon**. 2003

DÍAZ-REINOSO, B. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441-2469, abr. 2006.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELENA, C.; SOARES, A. A., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on Escherichia coli. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197-201, 2007.

ENGELS, C. et al. Antimicrobial activity of gallogannins isolated from Mango (*Mangifera indica*) kernels. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7712-7718, 2009.

ERAZO, S. et al. Constituents and biological activities of *Schinus polyganus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 395-400, 2006.

ESPINA, L. et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, jun. 2011.

FERREIRA, A. M. et al. **Estudo de composições de amido termoplástico: extrusão reativa e nanocompósitos com microfibrilas de celulose**. 82 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, São Paulo. 2012.

FERREIRA, S. R. S. et al. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, n. 3, p. 235-245, mar. 1999.

FERREIRA, S. R.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 4, p. 263-269, out. 2002.

FREITAS, Lisiane dos Santos. **Desenvolvimento de procedimentos de extração de óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos**. 227f. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre. 2007



FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 1, p. 116-134, jan. 2007.

GÓMEZ, A. M. et al. Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. **The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal**, v. 61, n. 3, p. 227-231, 1996.

GOMIDE, Reinaldo. Operações com sistemas sólidos granulares. In: **Operações unitárias**, v. 1. GOMIDE, R. São Paulo, 1980.

GU, L. K. et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 613-617, 2004.

HAGERMAN, Ann. E. **Tannin chemistry**. 2002. Disponível em: <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2017.

HAYRAPETYAN, H.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 66-72, jan. 2012.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2495-2511, abr. 2010.

IZADIFAR, Zahra. Ultrasound pretreatment of wheat dried distiller's grain (DDG) for extraction of phenolic compounds. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 6, p. 1359-1369, 2013.

JOANA GIL-CHÁVEZ, G. et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5-23, jan. 2013.

JORGENSEN, J.H. e FERRERO, M.J. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. **Clin. Infect. Dis.**, 26: 973-80, 1998.

KALLEL, F. et al. Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 34-41, dez. 2014.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 216-222, fev. 2010.

KANG, E. H. et al. The flavonoid ellagic acid from a medicinal herb inhibits host immune tolerance induced by the hepatitis B virus-e antigen. **Antiviral Research**, v. 72, n. 2, p. 100-106, nov. 2006.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 13 mar. 2009.

KATALINIĆ, V. et al. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 715-723, 15 mar. 2010.

KITZBERGER, C. S. G. **Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO<sub>2</sub> a alta pressão**. 142p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, Santa Catarina. 2005.

KOŞAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 525-533, 2005.

KOWALSKI, R.; WAWRZYKOWSKI, J. Effect of ultrasound-assisted maceration on the quality of oil from the leaves of thyme *Thymus vulgaris* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, n. 2, p. 69-74, mar. 2009.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para

determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LAINE, J. E. et al. Application of ultrasound in pulp and paper technology. **Paper Ja Puu: Paper och Trä**, v. 59, p. 235-247, 1977.

LAINE, J. E.; GORING, D. A. I. Influence of ultrasonic irradiation on the properties of cellulosic fibres. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 11, n. 5, p. 561-567, 1977.

LIMA, E.O. et al. Schinus Terenbethifollius Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**, n. 16 p. 7-8. 2004.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, abr. 2010.

LUQUE DE CASTRO, M.; GARCÍA-AYUSO, L. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1-2, p. 1-10, ago. 1998.

LUQUE-GARCÍA, J.; LUQUE DE CASTRO, M. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, jan. 2003.

MADUKA, H. C. C. et al. Phytochemical, antioxidant and microbial inhibitory effects of *Spondias mombin* leaf and stem bark extracts. **J Pharm Biol Sci**, v. 9, n. 2, p. 14-17, 2014.

MAHMUD, S. et al. Volatile components, antioxidant and antimicrobial activity of *Citrus acida* var. sour lime peel oil. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 195-198, jul. 2009.

MAIN, Janice et al. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. **BMJ: British Medical Journal**, v. 297, n. 6656, p. 1105, 1988.

MALLANT-HENT, Rosalie Ch et al. Disappearance of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in coeliac disease during a gluten-free diet. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 18, n. 1, p. 75-78, 2006.

MANDALARI, G. et al. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (Citrus bergamia Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2056-2064, 2 ago. 2007.

MARKOM, M. et al. Extraction of hydrolysable tannins from Phyllanthus niruri Linn.: effects of solvents and extraction methods, **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 487-496, 2007.

MARTIN, José Guilherme Prado et al. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. **Journal of Natural Products**, v. 5, n. 2, 2012.

MARTÍNEZ, Julian. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO<sub>2</sub> supercrítico: Desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, São Paulo. 2005.

MARTÍNEZ, J. L.; VANCE, S. W. Supercritical extraction plants equipment, process, and costs. **Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds (Martinez, JL, Ed.)**, CRC Press, Taylor and Francis Group, USA, p. 25-49, 2008.

MAUL, Aldo Adolar. **Fluidos supercríticos**, 1999. Disponível em: <[http://www.academia.edu/27075403/Fluidos\\_supercríticos](http://www.academia.edu/27075403/Fluidos_supercríticos)>. Acesso em: 14 mar. 2017

MAZZUTTI, S. et al. Green-based methods to obtain bioactive extracts from Plantago major and Plantago lanceolata. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 211-220, 2017.

MAZZUTTI, S. et al. Supercritical fluid extraction of Agaricus brasiliensis: Antioxidant and antimicrobial activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 70, p. 48-56, 2012.

MAZZUTTI, Simone. **Extração de compostos com importância biológica provenientes de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* através de técnicas ambientalmente seguras.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, Santa Catarina. 2016.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research: PTR**, v. 15, n. 2, p. 127-30, mar. 2001.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10-16, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6615-6623, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z. Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* d.c.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689-1699, 2013.

MIGUEL, A. H.; DE ANDRADE, J. B. Rapid Quantitation of Ten Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Aerosols by Direct Hplc Separation After Ultrasonic Acetonitrile Extraction. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 35-41, jan. 1989.

MIJANGOS RICÁRDEZ, O. F. et al. Fast Ultrasound-assisted Extraction of Polar (phenols) and Nonpolar (lipids) Fractions in *Heterotheca inuloides* Cass. **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 6, p. 484-491, 2011.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**, 13 ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1510 p. 1996.

MOTHANA R. A. A. & LINDEQUIST U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 177-181, 2005.

MOURA, M. J.; FIGUEIREDO, M. M. Aplicação das técnicas de picnometria de gás e deposimetria de mercúrio à caracterização da madeira de *E. globules*. **Silva Lusitana**, v. 10(2), p. 207-216, 2002.

MUKHOPADHYAY, Mamata. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. **CRC Press**, 2000.

NJOKU, P. C.; AKUMEFULA, M. I. Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias mombin* Leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 6, p. 613-615, 2007.

NWAOGU, L. A. et al. Phytochemical and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Landolphia owariensis* leaf. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 7, 2007.

NWORU, C. S. et al. The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide (NO). **Journal of Immunotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 10-16, 24 mar. 2011.

OKOLI, R. I. et al. Medicinal Herbs Used for Managing Some Common Ailments among Esan People of Edo State, Nigeria. **Asian Network for Scientific Information**, v. 6, 2007.

OLIVEIRA, D. A. et al. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 423-432, 2013.

OLIVEIRA, D. A. et al. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55-62, 2016.

OMOREGIE, E. S.; OIKEH, E. I. Comparative studies on the phytochemical composition, phenolic content and antioxidant activities of methanol leaf extracts of *Spondias mombin* and *Polyathia longifolia*. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 145-149, 2015.

PALMA, M. et al. Fractional Extraction of Compounds from Grape Seeds by Supercritical Fluid Extraction and Analysis for Antimicrobial and Agrochemical Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 5044-5048, dez. 1999.

PAULY, G.; FLEURY, M. **Cosmetic containing plant extracts**, 2002. Disponível em: <<https://www.google.ch/patents/US20030072820>>. Acesso em: 5 abr. 2017

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340-372, 3 jun. 2010.

PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, N. S. Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827-839, maio 2011.

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

PRIDEAUX, Lani et al. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. **Inflammatory bowel diseases**, v. 18, n. 7, p. 1340-1355, 2012.

PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 644-653, out. 2004.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, jul. 2006.

RAYNE Sierra; MAZZA, Giuseppe. Biological activities of extracts from sumac (*Rhus* spp.): a review. **Plant Foods Hum Nutr.** v. 62, p.165-75. 2007.

RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146-166, set. 2006.

RIZVI, S.S.H. et al. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technol.**, v. 40, n. 6, p. 55, 1986.

RODRIGUES S.; PINTO G.A.S.; FERNANDES F.A.N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (Cocos nucifera) Shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n.1, p. 95-100, 2008.

RODRIGUES, Joana Abreu. **Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor**. 143f. Dissertação de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2011

RUFINO M.S.M; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado técnico. **Embrapa Agroindústria Tropical**, nº 128, p. 1-4, 2007a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado técnico. **Embrapa Agroindústria Tropical**, nº 127, p. 1-4, 2007b.

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F. X. Cajá (*Spondias mombin* L.) Jaboticabal: Funep. **Série Frutas Nativas**, v. 4, p. 42, 2000.

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F. X. Fruticultura Tropical espécies regionais e exóticas. 1a ed. Brasília, DF: **EMBRAPA**, 2009.



SAGDIC, O. et al. RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1749-1758, jun. 2011.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, 2004.

SCALBERT, Augustin. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30. p. 3875-3883. 1991.

SHITTU, O. B. et al. Evaluation of *Spondias mombin*, *Senna occidentalis* and *Musa sapientum* against *Vibrio cholerae* O1 in experimental mice. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 975-995, 2014a.

SHITTU, O. B. et al. Phytochemical and antimicrobial screening of *Spondias mombin*, *Senna occidentalis* and *Musa sapientum* against *Vibrio cholerae* O1. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 948-961, 2014b.

SILVA, A. et al. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 406–413, 2011.

SILVA, Danielle Cotta de Mello Nunes. **Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* less)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, Santa Catarina. 2004.

SILVA, Gabriel Araújo da. **Avaliação da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana, antinoceptiva, antiinflamatória e toxicidade do extrato metanólico e frações de folhas de *Spondias* sp. (*Anacardiaceae*)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Natal, Rio Grande do Norte. 2012.

SILVA, R. P. **Utilização de vibrações ultra-sônicas para o refino de celulose kraft de eucalipto**. 77 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: KLEIN-JÚNIOR, L.C.; HENRIQUES, A.T. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre. Artmed, ed. 2, 2017. p. 305-316.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SMÂNIA JR, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 3, p. 177-181, 1995.

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118-122, 1998.

SOTILLO, D. RODRIGUEZ; HADLEY, M.; HOLM, E. T. Potato peel waste: stability and antioxidant activity of a freeze-dried extract. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 5, p. 1031-1033, 1994.

SOUZA, F. X. de. **Crescimento e desenvolvimento de clones enxertados de cajazeira na Chapada do Apodí**, 80 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

STARMANS, Dick AJ; NIJHUIS, Herry H. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 6, p. 191-197, jun. 1996.

SUCUPIRA, Natália Rocha et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

SUDJANA, A. N. et al. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 5, p. 461-463, maio 2009.

SUFLUX. **Supercritical Extraction Process**. Disponível em: <<http://suflux.com/>>. Acesso em: 19 mar. 2017.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, set. 2010.

TATSUMI, D. et al. Ultrasonic treatment to improve the quality of recycled pulp fiber. **Journal of Wood Science**, v. 46, n. 5, p. 405-409. 2000.

TAVEIRA, M. et al. *Lycopersicon esculentum* Seeds: An Industrial Byproduct as an Antimicrobial Agent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 9529-9536, 8 set. 2010.

TCHABO, W. et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 214-225, 2015.

TIAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 173-179, 2009a.

TIAN, F. et al. Identification and structure–activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 1289-1295, 2009b.

TOMAZIN JUNIOR, Celso. **Extração de óleo de soja com etanol e transesterificação etílica na miscela**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 2008.

TSAO, Rong; DENG, Zeyuan. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 85-99, 5 dez. 2004.

VIEIRA, Gladys Rosane Thomé. **Otimização das condições de cultivo de polyporus tricholoma mont. visando a produção de substâncias antibacterianas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, Santa Catarina. 2005.

VILLEGAS, L. F. et al. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 193-200, 1997.

VON GADOW, Astrid; JOUBERT, Elizabeth; HANSMANN, C. F. Effect of extraction time and additional heating on the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1370-1374, 1997.

WANG, Y. S.; HE, H. P.; YANG, J. H.; DI, Y. T.; HAO, X. J. New Monoterpenoid Coumarins from *Clausena anisum-olens*. **Molecules**, v. 13, p. 931–937, 2008.

WONGHIRUNDECHA, Suchanuch; SUMPAPAPOL, Punnanee. Antibacterial activity of selected plant by-products against food-borne pathogenic bacteria. In: **International Conference on Nutrition and Food Sciences**, IPCBEE. 2012.

YOU, G-S.; LIN, S-C.; CHEN, C-R.; TSAI, W-C; CHANG, C.J.; HUANG, W-W. Supercritical Carbon Dioxide Extraction Enhances Flavonoids in Water-Soluble Propolis. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**. v. 33, n. 3, p. 233-241, 2002.

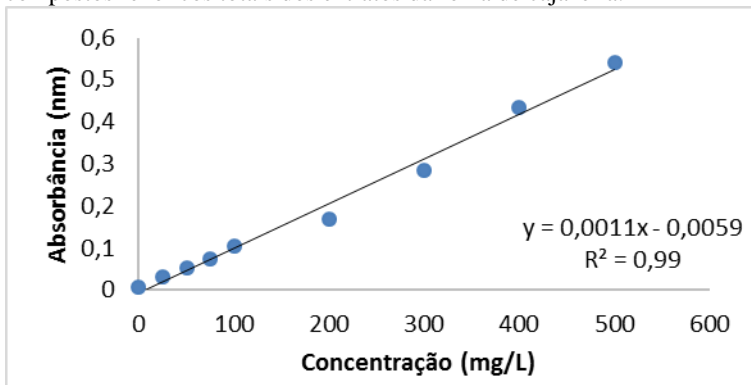
ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Standardized low-cost batch SFE units for university education and comparative research. In: **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**. 2003. p. 577-581.

ZIAKOVÁ, Alica; BRANDS˘TETEROVÁ, Eva. Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 25, p. 3017-3032, 2002.

## APÊNDICE A – Curvas de calibração

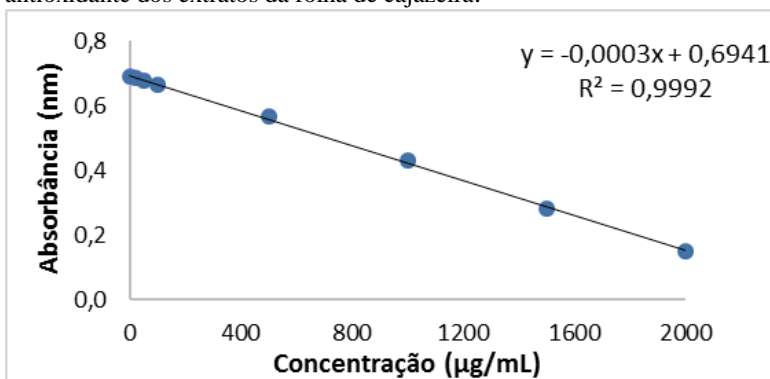
### CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO GÁLICO

Figura 17 - Curva analítica de ácido gálico utilizada na determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos da folha de cajazeira.



### CURVA ANALÍTICA DE TROLOX

Figura 18 - Curva analítica de Trolox utilizada na determinação de capacidade antioxidante dos extratos da folha de cajazeira.





## APÊNDICE B – Cromatogramas CLAE

Figura 19 - Espectros de UV de alguns padrões utilizados. A: Ácido gálico em ensaio isolado; B: Ácido ferrúico em ensaio com todos os padrões analisados; C: Ácido elágico em ensaio isolado; D: Ácido elágico em ensaio com todos os padrões analisados.

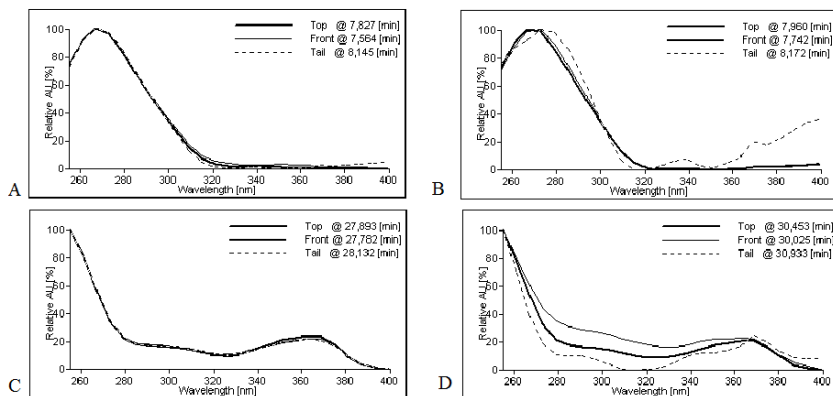
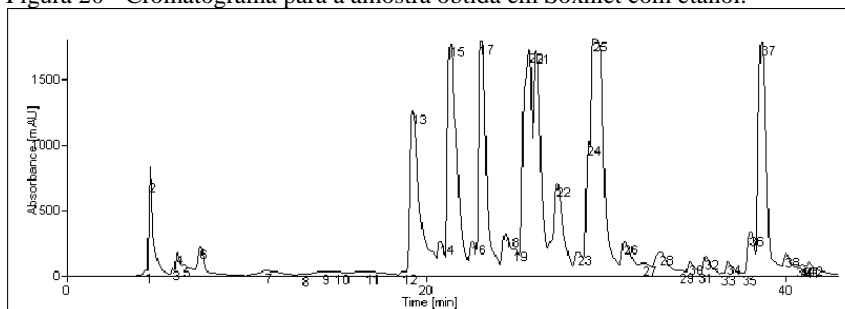
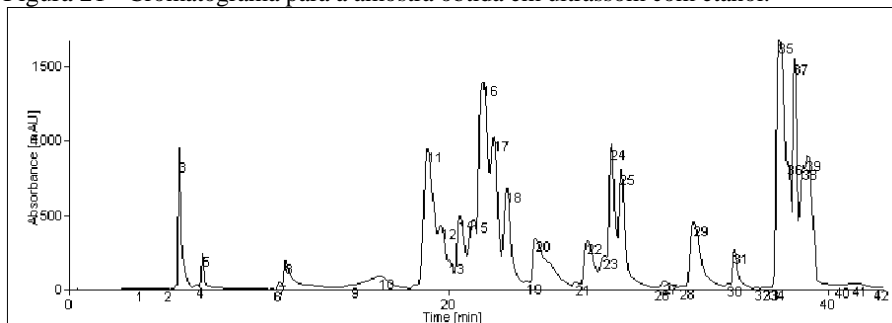


Figura 20 - Cromatograma para a amostra obtida em Soxhlet com etanol.



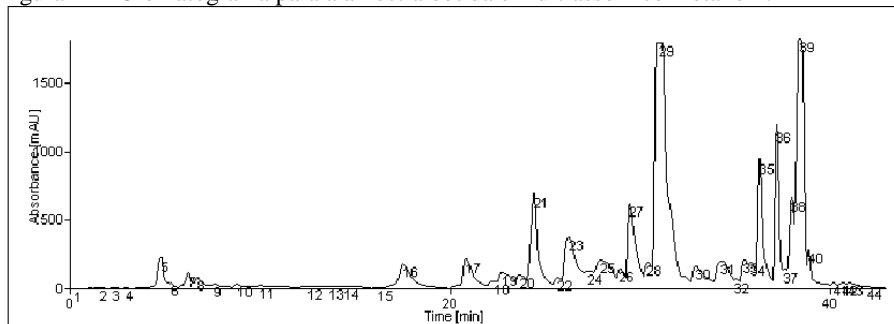
Identificação dos picos: 6- ác. gálico, 14- ác. cafeico, 16- catequina, 21- ác. elágico, 38- rutina.

Figura 21 - Cromatograma para a amostra obtida em ultrassom com etanol.



Identificação dos picos: 7-ác. gálico, 12- ác. cafeico, 22- catequina, 29- ác. elágico, 37- rutina.

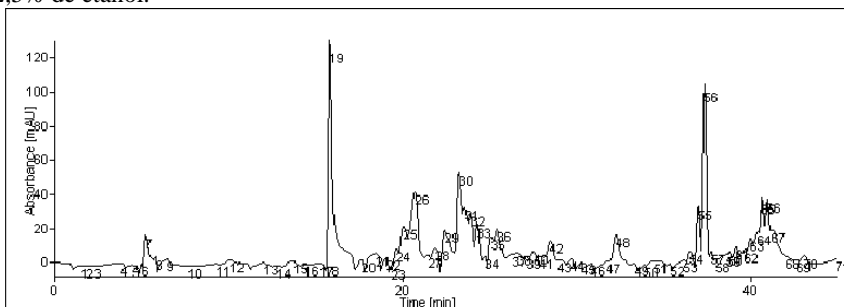
Figura 22 - Cromatograma para a amostra obtida em ultrassom com etanol\*.



Identificação dos picos: 10- ác. gálico, 21- ác. cafeico, 23- catequina, 36- ác. elágico.

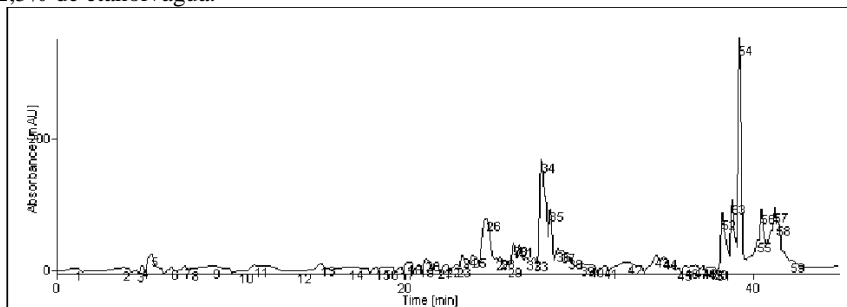


Figura 23 - Cromatograma para a amostra obtida por extração supercrítica com 2,5% de etanol.



Identificação dos picos: 12- ác. gálico, 25- ác. vanílico, 26- catequina, 30- ác. elágico.

Figura 24 - Cromatograma para a amostra obtida por extração supercrítica com 2,5% de etanol+água.



Identificação dos picos: 11- ác. gálico, 26- catequina, 27- ác. vanílico, 34- ác. elágico.