

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**COMPARAÇÃO ENTRE TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E TÉCNICAS
CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE
PRÓPOLIS AVALIADOS ATRAVÉS DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

DANIELLE BISCAIA
Engenheira de Alimentos

Florianópolis – SC
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**COMPARAÇÃO ENTRE TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E TÉCNICAS
CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE
PRÓPOLIS AVALIADOS ATRAVÉS DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

DANIELLE BISCAIA
Engenheira de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a. Sandra R.S. Ferreira

Florianópolis – SC

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**COMPARAÇÃO ENTRE TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E TÉCNICAS
CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE
PRÓPOLIS AVALIADOS ATRAVÉS DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dra. Sandra R.S. Ferreira

DANIELLE BISCAIA
Engenheira de Alimentos

Florianópolis – SC

2007

**“COMPARAÇÃO ENTRE TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E TÉCNICAS
CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE
PRÓPOLIS AVALIADOS ATRAVÉS DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS”**

Por

DANIELLE BISCAIA

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de 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.

Prof.^a Dra. Sandra R.S. Ferreira
Orientadora

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus
Coordenador do CPGEA

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Sandra R.S. Ferreira

Prof.^a Dra. Maria Ângela de Almeida Meireles

Prof. Dr. Artur Smânia Júnior

Prof. Dr. Haiko Hense

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Às minhas irmãs Ronicéia, Rosângela e Simone, aos meus cunhados José Luis e Luciano, à minha querida tia Dilma, pelo apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Prof^ª Sandra R. S. Ferreira pela orientação, incentivo e contribuições para este trabalho.

Ao Sr. Henrique Breyer (Breyer & Cia Ltda) pela doação da matéria-prima.

À prof^ª. Dra. Rozângela Curi Pedrosa e ao prof. Dr. Artur Smânia pelas contribuições para o presente trabalho.

Ao Dr. Haiko Hense e ao Dr. Julian Martinez pelas orientações técnicas.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina Marcucci pela atenção disponibilizada e conhecimento compartilhado.

Às amigas do mestrado Jaqueline, Solange, Fernanda e Sandra pela amizade e compreensão.

Aos amigos do LATESC: Gustavo, Jéferson, Aline, Daniel, Eliane, Aziza e Érika pela amizade e momentos compartilhados.

Aos amigos Júnior, Felipe, Saulo, Leandro, Kaká e Murilo pela amizade, convivência, companheirismo, palavras de incentivo e momentos de descontração.

Ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos pelo apoio e suporte fornecidos para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

"Toda nossa ciência comparada à realidade é primitiva e infantil, e ainda assim, é a coisa mais preciosa que temos". ([Albert Einstein](#))

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS E QUADROS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Mercado e Aplicações da Própolis	4
3.2. A Própolis	5
3.2.1. Atividades Biológicas da Própolis	8
3.3. Atividade Antioxidante	12
3.4. Atividade Antimicrobiana	14
3.5. Métodos de Extração	16
3.6. Extração Supercrítica (ESC)	18
3.6.1. O Fluido Supercrítico	19
3.6.2. Extração Supercrítica Sequencial	21
3.6.3. Utilização de Co-Solvente	22
3.6.4. Extração Supercrítica da Própolis	23
3.6.5. Curvas de Extração	25
3.6.6. Modelagem	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Caracterização da Matéria-Prima	30
4.1.1. Padronização do Diâmetro de Partículas	30
4.1.2. Determinação de Umidade e Voláteis	31
4.2. Extrações Convencionais	31
4.2.1. Extração Soxhlet	32
4.2.2. Maceração	32
4.2.3. Tratamento dos Extratos e Eliminação dos Solventes	33
4.3. Caracterização do Leito de Partículas	33
4.3.1. Determinação do Diâmetro Médio de Partículas	34
4.3.2. Determinação da Densidade Real e Aparente	35
4.3.3. Porosidade total do Leito e Partículas	35
4.4. Determinação da Densidade do Solvente	35
4.5. Extração com CO ₂ Supercrítico (ESC)	35
4.5.1. Equipamento de Extração Supercrítica 1 (ESC 1)	37
4.5.2. Equipamento de Extração Supercrítica 2 (ESC 2)	39
4.5.3. Experimentos de Rendimento Global (X ₀)	41
4.5.4. Experimentos Cinéticos – Curvas de Extração	42
4.6. Determinação da Atividade Antioxidante	43
4.7. Determinação do Teor de Fenólicos Totais	45
4.8. Determinação da Atividade Antimicrobiana	47
4.8.1. Método de Difusão em Ágar	47
4.8.2. Método de Microdiluição em Caldo de Cultivo	48
4.9. Análise Estatística	48
4.10. Determinação do Perfil Químico	49

4.11. Modelagem Matemática	49
4.12. Resumo dos Ensaios	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. Ensaios Prévios	53
5.1.1. Caracterização da Matéria-Prima	53
5.1.2. Testes Preliminares	55
5.2. Avaliação dos Extratos de Própolis Obtidos com Diferentes Técnicas de Extração em Termos de Rendimento Global.	58
5.2.1. Introdução	58
5.2.2. Materiais e Métodos	58
5.2.3. Resultados	59
a) Rendimento Global das Extrações Convencionais da Própolis	59
b) Rendimento Global da ESC-U com CO ₂ Puro para Obtenção de Extrato de Própolis (X ₀)	61
c) Rendimento Global da ESC-S da Própolis (X ₀)	64
Etapa	65
d) Avaliação de Diferentes Concentrações de Co-Solvente	66
5.2.4. Conclusão	68
5.3. Avaliação da Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos dos Extratos de Própolis Obtidos com Diferentes Técnicas de Extração	69
5.3.1. Introdução	69
5.3.2. Materiais e Métodos	69
5.3.3. Resultados	70
a) Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos dos Extratos Convencionais	70
b) Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos da ESC-U com CO ₂ Puro	72
c) Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos da ESC Sequencial	73
d) Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos da ESC-U com Co-Solvente	74
e) Perfil Químico dos Extratos Obtidos Através de ESC da Própolis	76
5.3.4. Conclusão	77
5.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Própolis Obtidos com Diferentes Técnicas de Extração	79
5.4.1. Introdução	79
5.4.2. Materiais e Métodos	79
5.4.3. Resultados	80
5.4.4. Conclusão	85
5.5. Estudo da Cinética e Modelagem Matemática da Extração Supercrítica da Própolis	87
5.5.1. Introdução	87
5.5.2. Materiais e Métodos	87
5.5.3. Resultados	88
a) Cinética da ESC da Própolis	88
b) Modelagem Matemática	92
5.5.4. Conclusão	97
6. CONCLUSÕES	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8. APÊNDICES	109
Apêndice I – Modelos Matemáticos	109
Apêndice II – Resultados de atividade antioxidante e curva padrão de ácido gálico.	117
Apêndice III – Curvas de extração ajustadas pelo SAS	119
Apêndice IV – Curva de determinação da solubilidade do extrato de própolis em CO ₂	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Foto da própolis presente na colméia (Natucentro, 2006).	5
Figura 3.2 – Compostos fenólicos da própolis brasileira com atividade antimicrobiana (MARCUCCI <i>et al.</i> , 2001).	10
Figura 3.3 - Diagrama de Fases do Dióxido de Carbono (Wikipedia, 2006).	19
Figura 4.1 – Foto da amostra de própolis pulverizada utilizada nos experimentos.	31
Figura 4.2 – Foto do sistema Soxhlet.	33
Figura 4.3 – Foto do rotaevaporador.	33
Figura 4.4 – Foto do equipamento ESC 1 disponível no LATESC.	38
Figura 4.5 – Diagrama esquemático referente ao equipamento ESC 1.	38
Figura 4.6 – Foto do equipamento ESC 2 disponível no LATESC.	40
Figura 4.7 – Diagrama esquemático referente ao equipamento ESC 2.	40
Figura 4.8 - Foto dos frascos contendo os produtos de reação durante a análise de atividade antioxidante através do método de DPPH.	43
Figura 4.9 – Esquema da determinação da atividade antioxidante através do método DPPH.	44
Figura 4.10 - Esquema do método de Folin-Ciocalteu.	46
Figura 4.11 – Esquema do método de difusão em ágar.	47
Figura 5.1 – Gráfico de influência do tempo estático na ESC da própolis a 150 bar, 40 °C e vazão de 3 g/min.	56
Figura 5.2 – Gráfico da ESC da própolis a 200 bar, 40°C e vazão de 3 g/min.	57
Figura 5.3 – Gráfico do ponto de inversão das isotermas de rendimento para a ESC da própolis.	63
Figura 5.4 – Gráfico de superfície de resposta para o rendimento global da ESC em etapa única da própolis em função das temperaturas e pressões de operação.	64
Figura 5.5 – Gráfico de rendimento em função da concentração de etanol utilizado como co-solvente na ESC da própolis a 150 bar e 40 °C.	67
Figura 5.6 – Gráfico de atividade antioxidante (EC ₅₀) e conteúdo de fenólicos totais para os extratos obtidos através de extrações convencionais.	72
Figura 5.7 – Gráfico da CMB dos diferentes extratos de própolis avaliados para as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus cereus</i> .	85
Figura 5.8 – Gráfico de influência da vazão na ESC da própolis a 150 bar e 40 °C.	89
Figura 5.9 – Gráfico de influência da pressão na ESC da própolis a 40 °C e vazões de 3 e 5 g/min.	89
Figura 5.10 – Gráfico de influência da temperatura na ESC da própolis a 100 bar e vazão de 3 g/min.	90
Figura 5.11 – Gráfico das ESC seqüenciais e ESC-U da própolis para a temperatura de 40°C, vazão de 5 g/min e pressões de 250, 100/250; 150/250 e 100/300 bar.	91
Figura 5.12 – Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de própolis para a condição de 250 bar, 40°C e 5,00 gCO ₂ /min.	95
Figura 5.13 – Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de própolis para a condição de 100 bar, 40°C e 5,00 gCO ₂ /min.	96
Figura 5.14 – Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de própolis para a condição de 150 bar, 40°C e vazões de 3,00 e 5,00 gCO ₂ /min.	97
Figura 5.15 - Curvas experimentais e modeladas para a ESC seqüencial da própolis na condição de 40 °C, vazão de 5,00 gCO ₂ /min e pressões de 100 e 250 bar.	97
Figura I – Gráfico da curva padrão de ácido gálico utilizada na análise de conteúdo de fenólicos totais.	118
Figura II – Gráfico SAS da dispersão para ESC 100 bar, 40°C e 5gCO ₂ /min.	120
Figura III- Gráfico SAS de ajuste para ESC 100 bar, 40°C e 5gCO ₂ /min.	120
Figura IV- Gráfico SAS da dispersão para ESC 150 bar, 40°C e 5gCO ₂ /min.	122
Figura V - Gráfico SAS de ajuste para ESC 150 bar, 40°C e 5gCO ₂ /min.	122

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 3.1: Resumo das atividades biológicas da própolis e pesquisas relacionadas.	12
Quadro 4.1 – Resumo dos Ensaio realizados com a própolis do sul do Brasil.....	51
Tabela 5.1. Características físico-químicas da própolis.....	53
Tabela 5.2 – Perfil químico da própolis determinado através de CLAE.	54
Tabela 5.3 – Tabela de rendimento global das extrações convencionais da própolis.	59
Tabela 5.4 – Tabela de rendimento global (X_0) da ESC-U com CO_2 puro da própolis em função das diferentes condições de operação empregadas.....	61
Tabela 5.5 – Tabela de rendimento global (X_0) da ESC-S com CO_2 puro da própolis em função das diferentes condições de operação empregadas.....	65
Tabela 5.6 – Tabela de rendimento global (X_0) da ESC-Uco da própolis em função das diferentes concentrações de etanol empregadas.	66
Tabela 5.7 – Tabela de atividade antioxidante (A.A. e EC_{50}) e conteúdo de fenólicos totais para as extrações convencionais da própolis.	71
Tabela 5.8 – Tabela de atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais para as diferentes condições de ESC-U com CO_2 puro da própolis.	73
Tabela 5.9 – Tabela de atividade antioxidante (A.A. e EC_{50}) e conteúdo de fenólicos totais para as diferentes condições de ESC-S da própolis.	74
Tabela 5.10 – Tabela de atividade antioxidante (A.A. e EC_{50}) e conteúdo de fenólicos totais para as diferentes condições de ESC-U com co-solvente da própolis.	75
Tabela 5.11 : Quantidade em mg/g de cada um dos compostos identificados na análise por CLAE dos extratos referentes aos ensaios 10 e 23.	77
Tabela 5.12 – Atividade antibacteriana pelo teste de difusão em ágar para os diferentes extratos de própolis.	81
Tabela 5.13 – Determinação das concentrações mínimas inibitórias e bactericidas dos extratos de própolis para as bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus cereus</i>	83
Tabela 5.14 – Características do leite de partículas.....	88
Tabela 5.15 – Parâmetros de processo do modelo de Sovová na modelagem da ESC da própolis.....	93
Tabela 5.16 - Parâmetros ajustáveis: Modelo de difusão (D); Modelo LM (b, tm) e Modelo SSP (Dm).....	94
Tabela 5.17 – Erros médios quadráticos entre os resultados experimentais e modelados das curvas de ESC da própolis.....	94

NOMENCLATURA

b	Parâmetro ajustável do modelo LM (min^{-1})
D_m	Difusividade na matriz sólida - modelo SSP (m^2/min)
CER	Período de taxa constante de extração
D_{AB}	Coefficiente de difusão da segunda Lei de Fick, (m^2/min)
D	Coefficiente de difusão - modelo de difusão (m^2/min)
\bar{D}_s	Diâmetro médio superficial das partículas (cm)
\bar{D}_i	Diâmetro médio de partículas da peneira i (cm)
d_r	Densidade real das partículas (g/cm^3)
d_a	Densidade aparente do leito (g/cm^3)
h	Coordenada axial (m)
H	Comprimento total do leito de extração (m)
$J(x,y)$	Taxa de transferência de, massa interfacial ($\text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$)
k_{Ya}	Coefficiente de transferência de massa na fase fluida (s^{-1})
k_{Xa}	Coefficiente de transferência de massa na fase sólida (s^{-1})
m_{ext}	Massa de extrato (g)
m_0	Massa total inicial de soluto na coluna de extração (g)
M_{CER}	Taxa de extração na etapa CER (kg/s)
m_i	Massa de amostra retida na peneira i (g)
n	Número inteiro
N	Massa de sólido inerte (g)
p	Pressão de extração (bar)
O	Massa de soluto extraível (g)
P	Massa de soluto de fácil acesso (g)
K	Massa de soluto de difícil acesso (g)
Q_{CO_2}	Vazão do solvente (g/min ou kg/s)
r	Raio da partícula sólida (m)
T	Temperatura de extração ($^{\circ}\text{C}$)
t	Tempo de extração (s)
t_{CER}	Duração da etapa de taxa constante de extração - CER (s)
t_{FER}	Duração da etapa de taxa decrescente de extração - FER (s)
t_m	Parâmetro ajustável do modelo LM (min^{-1})
U	Velocidade superficial do solvente (m/s)
U	Velocidade intersticial do solvente (m^3/s)

x_p	Razão mássica de soluto de fácil acesso ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido inerte}}$)
x_k	Razão mássica de soluto de difícil acesso ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido inerte}}$)
X_0	Rendimento global (%)
x_0	Razão mássica inicial de soluto extraível ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido inerte}}$)
X	Razão mássica de soluto na fase sólida ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido}}$)
W	Parâmetro para o período de taxa de extração lenta
Y	Razão mássica de soluto na fase fluida ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{solvente}}$)
Y_{CER}	Razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER ($\text{kg}_{\text{extrato}}/\text{kg}_{\text{CO}_2}$)
Y^*	Concentração de equilíbrio (solubilidade) ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{solvente}}$)
Y	Concentração normalizada de soluto na fase solvente
Z	Parâmetro do período CER
ρ_s	Densidade da fase sólida ($\text{kg}_{\text{sólido}}/\text{m}^3$)
ρ	Densidade da fase fluida ($\text{kg}_{\text{solvente}}/\text{m}^3$)
δ	Espessura das partículas (m)
ε	Porosidade total do leito de extração
α	Coefficiente de transferência de calor ($^{\circ}\text{C}^2/\text{min}$)

RESUMO

A própolis é um produto natural utilizado durante séculos pela humanidade com objetivo medicinal. A própolis possui diversas atividades biológicas comprovadas, entre elas antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral e anti-HIV. Os extratos de própolis são utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Aspectos como qualidade e composição destes produtos estão relacionados com a técnica de extração empregada na obtenção dos extratos naturais. A extração de compostos com atividade biológica pode ser realizada através de técnicas convencionais como a extração soxhlet e a maceração com solvente, ou através de métodos alternativos como a extração supercrítica (ESC), utilizando dióxido de carbono (CO₂) como solvente. Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar os extratos de própolis obtidos através de diferentes técnicas, como a extração soxhlet, maceração com solvente, ESC em estágio único utilizando CO₂ puro ou CO₂ com co-solvente e ESC em duas etapas seqüenciais. A comparação entre as técnicas foi realizada em termos de rendimento do processo, atividade antioxidante e antimicrobiana, conteúdo de fenólicos e perfil químico. As técnicas convencionais foram realizadas com os seguintes solventes: etanol absoluto, acetato de etila, clorofórmio, hexano, água destilada e misturas de água/etanol. O maior rendimento foi obtido através da extração soxhlet com clorofórmio (73 ± 2 %) e a melhor atividade antioxidante através da maceração com a mistura etanol/água 50 % (v/v). O co-solvente utilizado na ESC foi o etanol absoluto, o qual foi selecionado com base nos resultados de rendimento e atividade antioxidante obtidos para os extratos convencionais. As condições operacionais da ESC em etapa única com CO₂ puro foram: temperaturas de 30, 40 e 50 °C e pressões variando de 100 a 250 bar. A ESC com co-solvente foi realizada a 150 bar, 40 °C e concentrações de etanol absoluto de 2, 5 e 7 % (m/m). Na ESC em duas etapas seqüenciais foram utilizadas pressões de 100 e 150 bar para a primeira etapa, 250 e 300 bar para a segunda etapa, na condição isotérmica de 40 °C. O maior rendimento para a ESC foi $24,8 \pm 0,9$ % obtido com 5 % de etanol como co-solvente. Somente os extratos obtidos através de ESC nas pressões de 100 e 150 bar apresentaram atividade contra a *Escherichia coli* enquanto extratos convencionais foram suscetíveis a esta bactéria. Os extratos convencionais apresentaram os melhores resultados de rendimento, atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos que os extratos obtidos através de ESC. Porém, a ESC resultou em extratos com melhor atividade antimicrobiana quando comparados aos extratos convencionais. Os modelos de transferência de massa disponíveis na literatura utilizados para descrever as curvas de ESC de própolis foram: Sovová (1994), Martínez *et al.* (2003), Crank (1975) apud Reverchon (1997) e Gaspar *et al.* (2003). O modelo Martínez *et al.* (2003) apresentou o melhor ajuste para as curvas de ESC da própolis.

ABSTRACT

Propolis is a natural product used during centuries by humanity with medical aim. Propolis possesses various proved biological activities, such as: antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory, antitumor and anti-HIV. The extracts from propolis are used in food, pharmaceutical and cosmetic industries. Aspects as quality and composition of these products are related to the extraction technique used for obtainment of natural extracts. Extraction of compounds with biological activity can be performed by conventional techniques, such as soxhlet extraction and solvent maceration, or by alternative methods like supercritical fluid extraction (SFE), using carbon dioxide (CO₂) as solvent. Thus, the aim of this work was to compare propolis extracts obtained by different techniques, such as soxhlet extraction, solvent maceration, SFE in one stage using pure CO₂ or CO₂ with co-solvent and SFE in two sequential stages. The comparison between the techniques was performed in terms of process yield, antioxidant and antimicrobial activity, phenolics content and chemical profile. Conventional techniques were performed with the following solvents: absolute ethanol, ethyl acetate, chloroform, n-hexane, distilled water and mixtures of water/ethanol. The highest yield was obtained with chloroform soxhlet extraction (73 ± 2) and the best antioxidant activity was achieved through maceration with ethanol/water 50 % (v/v). The co-solvent used in SFE was absolute ethanol, which was selected based in the yield and antioxidant activity obtained for conventional extracts. The operational conditions for SFE in one stage with pure CO₂ were: temperatures of 30, 40 and 50 °C; and pressures from 100 to 250 bar. The SFE with co-solvent was performed at 150 bar, 40 °C and ethanol concentrations of 2, 5 and 7 % (w/w). For SFE in two sequential stages there were used pressures of 100 and 150 bar in the first stage, 250 and 300 bar in the second stage at isothermal condition of 40 °C. The highest yield for SFE was 24.8 ± 0.9 %, obtained with ethanol at 5 % as co-solvent. Only the extracts obtained by SFE at 100 and 150 bar presented activity against *Escherichia coli*, while conventional extracts were susceptible at this bacterium. Conventional extracts showed better yield results, antioxidant activity and phenolics content than SFE extracts. However, SFE produced extracts with better antimicrobial activity when compared to conventional extracts. The mass transfer models available in the literature used to fit propolis SFE curves: Sovová (1994), Martínez *et al.* (2003), Crank (1975) apud Reverchon (1997) and Gaspar *et al.* (2003). The model of Martínez *et al.* (2003) provided the best adjustment for propolis SFE curves.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe um grande interesse em compostos naturais com atividades biológicas, que possam substituir substâncias sintéticas as quais são utilizadas na indústria de alimentos e farmacêutica. Esta idéia é sustentada por consumidores preocupados com a segurança destas substâncias, já que estas moléculas sintéticas são suspeitas de causar ou promover efeitos negativos à saúde. Sendo assim, pesquisas sobre diferentes extratos de plantas e produtos naturais, como a própolis, que possuem uma ampla variedade de compostos com efeitos benéficos à saúde, estão sendo intensificadas.

A própolis é um material resinoso de consistência viscosa elaborado pelas abelhas que coletam matéria-prima de diversas partes de plantas como brotos, cascas e exsudatos, transformando-as dentro da colméia pela adição de secreções salivares e cera. É um produto natural utilizado durante séculos pela humanidade com objetivo medicinal e possui diversas atividades biológicas já comprovadas como antioxidante (KUMAZAWA *et al.*, 2004; NAGAI *et al.*, 2003, PARK e IKEGAKI, 1998; WANG *et al.*, 2004); antimicrobiana (MARCUCCI *et al.*, 2001; PARK e IKEGAKI, 1998); antiinflamatória (PARK e IKEGAKI, 1998); anti-HIV (ITO *et al.*, 2001) e antitumoral (KIMOTO *et al.*, 1999).

A atividade biológica da própolis está diretamente relacionada à sua composição química que depende da flora vegetal utilizada pelas abelhas para a coleta de material. Devido à grande diversidade de plantas no Brasil existem diversos tipos de própolis com diferentes atividades biológicas. A caracterização de todas estas atividades biológicas associada à tendência de utilização de produtos naturais tem resultado em um aumento da demanda de própolis e produtos derivados da própolis (BURDOCK, 1998; PEREIRA *et al.*, 2002).

Os extratos de própolis encontraram aplicação em uma grande variedade de nutracêuticos e cosméticos. A própolis brasileira é extensivamente utilizada como ingrediente em alimentos e bebidas especialmente no Japão, com o objetivo de manter ou melhorar a saúde humana (CATCHPOLE *et al.*, 2004, MARCUCCI *et al.*, 2001).

Aspectos como qualidade e composição destes produtos estão relacionados com a técnica de extração empregada na obtenção dos extratos de produtos naturais. As indústrias farmacêutica e de alimentos geralmente realizam a extração de compostos com atividade biológica através de processos a baixa pressão como a extração soxhlet e a maceração. Estes métodos de extração denominados de convencionais, quando realizados a altas temperaturas por tempo prolongado, podem induzir à degradação térmica dos compostos de interesse e

ainda apresentar problemas de toxicidade devido à presença de solventes orgânicos residuais nos produtos.

A extração supercrítica (ESC) é uma tecnologia de interesse para as indústrias como uma alternativa aos processos convencionais de extração já que esta técnica elimina os problemas de solventes residuais, dispensa a etapa de separação solvente/extrato e permite o uso de baixas temperaturas proporcionando uma menor degradação de compostos termossensíveis. Isto é fundamental para a extração de produtos naturais onde a qualidade do produto final é de grande importância.

A ESC utiliza um fluido supercrítico como solvente para a extração dos compostos de interesse a partir de uma matéria-prima. O solvente supercrítico mais empregado é o dióxido de carbono (CO_2) o qual, devido a sua característica apolar, dissolve preferencialmente compostos apolares. Uma alternativa viável para o emprego da ESC visando a extração de compostos polares e o aumento do rendimento da extração, é a utilização de co-solvente em baixas concentrações. Os co-solventes, ou modificadores, são solventes orgânicos com polaridade intermediária entre o CO_2 e o soluto de interesse, que podem aumentar o poder de solubilização da mistura.

Desta forma, esse trabalho tem como objetivo estudar a extração supercrítica em etapa única e em duas etapas sequenciais da própolis do sul do Brasil utilizando CO_2 puro e CO_2 adicionado de co-solvente, como solventes de extração. A validação das técnicas de extração é obtida através da comparação dos extratos obtidos na ESC e nas extrações convencionais em termos de rendimento, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e composição química.

A modelagem matemática de curvas de ESC é empregada por vários autores com o objetivo de reproduzir dados experimentais existentes, e a partir deles ajustar parâmetros com os quais se possam simular processos de extração em outras escalas e condições operacionais. Também é objetivo deste trabalho a aplicação dos seguintes modelos de transferência de massa disponíveis na literatura como os apresentados por Sovová (1994), Martínez *et al.* (2003), Crank (1975) apud Reverchon (1997) e Gaspar *et al.* (2003), para a descrição das curvas de extração de própolis com tecnologia supercrítica.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é a comparação de técnicas convencionais de extração e da ESC em etapa única e em duas etapas seqüenciais, utilizando CO₂ supercrítico puro e CO₂ com co-solvente, para a obtenção de extratos de própolis avaliados em termos de rendimento da extração, atividade biológica e perfil químico.

2.1. Objetivos Específicos

- Utilização de técnicas convencionais de extração do tipo soxhlet e maceração, com solventes orgânicos de diferentes polaridades para a obtenção de extratos de própolis;
- Definição de técnicas para determinação da atividade biológica (atividade antioxidante e antimicrobiana) dos extratos obtidos;
- Determinação do rendimento e atividade biológica dos extratos convencionais visando a seleção de co-solvente para a extração supercrítica;
- Padronização dos procedimentos de ESC da própolis através da determinação de parâmetros de processo como vazão de solvente (Q_{CO_2}), tempo de extração e faixas de aplicação de temperatura (T) e pressão (P);
- Avaliação dos efeitos de temperatura e pressão no rendimento e atividade biológica dos extratos obtidos na ESC em etapa única utilizando CO₂ supercrítico puro;
- Determinação das condições de operação (T e P) para a primeira etapa da ESC seqüencial (extração em duas etapas, com condições diferentes de T e P) com base nos resultados de rendimento e atividade biológica da ESC em etapa única visando a extração de compostos cerosos presentes na própolis;
- Determinação das condições de operação (T e P) da segunda etapa da ESC seqüencial visando o enriquecimento dos extratos em compostos com atividade antioxidante;
- Avaliação dos extratos obtidos através da ESC seqüencial em termos de rendimento e atividade biológica;
- Determinação do perfil químico dos extratos com melhor atividade biológica através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Modelagem das curvas de extração de própolis utilizando os seguintes modelos disponíveis na literatura: Sovová (1994), Martinez *et al.* (2003), Crank (1975) apud Reverchon (1997) e Gaspar *et al.* (2003).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Mercado e Aplicações da Própolis

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de própolis, atrás apenas da Rússia e China. Embora seja responsável por cerca de 10 a 15 % da produção mundial de própolis, o Brasil atende cerca de 80 % da demanda japonesa (PEREIRA *et al.*, 2002).

A produção brasileira de própolis não apresenta dados precisos. Segundo dados do IBGE fornecidos para a Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíficas Europeias (APACAME), a produção de própolis em 2005 foi de 100 ton. De janeiro a setembro de 2006 foi exportado o total de 36,934 ton. com uma receita de US\$ 3.521.301,00 (ALICEweb, 2006). Porém, segundo dados do Ministério da Agricultura fornecidos para a empresa Natucentro, o Brasil exporta 7 ton/ mês de própolis e o consumo interno é de 4 ton./ mês, totalizando uma produção mensal de 11 ton. com uma produção anual de 132 ton de própolis.

Dados da Federação de Apicultores de Minas Gerais revelam que a própolis produzida no estado é considerada a melhor do mundo no mercado japonês, onde o quilograma do produto passou de US\$ 5,00 para US\$ 200,00 nos últimos anos. Dois pontos se destacam na preferência japonesa pela própolis brasileira, além das propriedades farmacológicas que esta apresenta: o primeiro está relacionado com as suas características organolépticas e o segundo devido ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais presentes na própolis brasileira, quando comparada com as de outras origens (PEREIRA *et al.*, 2002).

A crescente demanda por produtos naturais resultou em um aumento no consumo de própolis. Especialmente no Japão, a própolis brasileira é extensivamente usada em alimentos e bebidas com o objetivo de manter ou melhorar a saúde humana (MARCUCCI *et al.*, 2001). Os extratos de própolis encontraram aplicação em uma grande variedade de nutracêuticos, como suplementos alimentares, e cosméticos, como produtos de higiene dental, cremes cicatrizantes e sabonetes (CATCHPOLE *et al.*, 2004).

A cera da própolis é largamente utilizada na indústria farmacêutica para melhorar a consistência de produtos, sendo que inúmeros cosméticos disponíveis no mercado possuem a cera de própolis em sua composição. Uma vantagem adicional dos ésteres das ceras é que eles estabilizam o óleo essencial e retardam a evaporação de fragrâncias. Esta vantagem é muito importante no desenvolvimento de produtos de aromaterapia e em cosméticos (SIMANDI *et al.*, 1998).

3.2. A Própolis

Ao longo da história, o homem aprendeu a utilizar os produtos naturais na medicina. Das várias formas de utilização destacam-se as plantas brutas como as ervas, além das tradicionais preparações Galênicas como os extratos. Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade é a própolis administrada sob diversas formas. No primeiro texto médico conhecido por "Livro de produção de Medicamentos para todas as partes do Corpo Humano", narrado no papiro de Ebers e escrito a cerca de 1.700 a.C. se faz menção à própolis como produto medicinal (PEREIRA *et al.*, 2002; APICULTURA, 2006).

A palavra própolis tem origem grega, onde "pró" quer dizer à frente, antes e "pólis" significa cidade. Seria então a defesa "à frente da cidade" ou no caso, a colméia. Própolis é um nome geral para o material resinoso coletado a partir de várias fontes de plantas e transformado pelas abelhas. A resina coletada é misturada com enzimas salivares e a este material parcialmente digerido é adicionado cera de abelha completando assim o processo de fabricação da própolis pelas abelhas (CUNHA *et al.*, 2004; MARCUCCI *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2002). A Figura 3.1 apresenta uma foto da própolis presente na colméia.



Figura 3.1 – Foto da própolis presente na colméia (Natucentro, 2006).

A própolis é utilizada pelas abelhas para as mais diversas finalidades, tais como: cobrir frestas e rachaduras da colméia; reduzir as aberturas de acesso, evitando a entrada de frio, predadores e visitas indesejáveis; revestir os alvéolos antes da postura da rainha, mantendo-os livres de agentes microbianos e patogênicos; embalsamar para mumificar restos de animais dentro da colméia quando são muito grandes ou pesados para serem retirados, evitando assim a contaminação por agentes patológicos e sua putrefação; revestir internamente toda a colméia, funcionando também como isolante térmico (APICULTURA, 2006).

A própolis, também conhecida como cola de abelha possui característica elástica, com consistência viscosa e cores variando desde o verde pardo, castanho, marrom claro ou escuro, negro, amarelado (dependendo de origem botânica) com sabor adstringente, acre, por vezes levemente amargo, com cheiro agradável e adocicado (APICULTURA, 2006; CATCHPOLE *et al.*, 2004). A composição química é altamente complexa e variada, estando intimamente relacionada com a flora da região visitada pelas abelhas para a coleta de material (SAWAYA *et al.*, 2004). De forma geral a composição da própolis consiste de 50-60 % de resinas e bálsamos, 30-40 % de ceras, 5-10 % de óleos essenciais, 5 % de grãos de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (GHISALBERTI, 1979 apud PARK *et al.*, 2002).

Com o avanço das técnicas cromatográficas, inúmeros compostos da própolis foram isolados e identificados, elevando o número de compostos conhecidos para mais de uma centena. Além disto, a composição química complexa da própolis é frequentemente atualizada devido às variações regionais encontradas. Cerca de 200 compostos já foram identificados em diferentes amostras de própolis, com mais de 100 em cada uma delas (SAWAYA *et al.*, 2004; MARCUCCI *et al.*, 2001). Em termos de ação farmacológica, a principal classe de constituintes da própolis é a dos compostos fenólicos. Essas substâncias caracterizam-se pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado a um anel aromático (MARCUCI *et al.*, 1998).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte dominante de própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus sp.*). Entretanto na América do Sul, a espécie vegetal do gênero *populus* não é nativa e em seu lugar existe uma grande diversidade vegetal empregada pelas abelhas como fonte de resina para a produção de própolis. Esta diversidade vegetal dificulta a correlação da própolis com a fonte produtora (PARK *et al.*, 2002).

Ainda relacionado com a variedade de plantas do Brasil observa-se que a composição da própolis brasileira é distinta do restante do mundo e altamente variável, qualitativamente e quantitativamente. Várias tentativas têm sido feitas para tipificar a própolis brasileira conforme a sua origem regional. Segundo Marcucci *et al.* (2000) *Baccharis spp.* e a *Araucaria spp.* são provavelmente as espécies vegetais nativas mais visitadas pelas abelhas *Apis mellifera* para a coleta da resina de própolis nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. Uma menor variação da composição química é observada nas própolis originárias de regiões temperadas do planeta, como por exemplo, a Europa onde seus principais compostos bioativos são os flavonóides como flavonas, flavonóis e flavanonas (SAWAYA *et al.*, 2004; MARCUCCI *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2002).

Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos com anéis aromáticos apresentando a estrutura C6-C3-C6, onde os dois anéis C6 são necessariamente aromáticos e conectados por uma ponte de três carbonos que geralmente contém um átomo de oxigênio (NOTHENBERG, 1997).

Segundo o regulamento técnico de identidade e qualidade da própolis do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2001), a própolis é classificada quanto ao teor de flavonóides em: a) Baixo Teor: até 1,0 % (m/m); b) Médio Teor: >1,0 – 2,0 % (m/m) e c) Alto teor: > 2,0 % (m/m). Segundo Pereira *et al.* (2002) os ácidos fenólicos são abundantes nas amostras de própolis brasileira, sendo os responsáveis por suas atividades biológicas, enquanto que o teor de flavonóides é baixo se comparado à própolis européia.

Na literatura existe controvérsia em relação ao teor de flavonóides presentes em amostras de própolis brasileiras (PEREIRA *et al.*, 2002). Segundo BANKOVA *et al.* (1995) as própolis brasileiras têm uma baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, possuindo altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos.

Kumazawa *et al.* (2004) determinaram o teor de flavonóides dos extratos etanólicos obtidos de própolis de várias origens. O conteúdo de flavonóides foi determinado através do método colorimétrico de $AlCl_3$ e os resultados expressos em mg /g de EEP (extrato etanólico de própolis). Os maiores teores de flavonóides foram apresentados pelas própolis da Hungria ($176,0 \pm 1,7$ mg/g), Uruguai ($168,0 \pm 6,4$ mg/g) e China ($158,0 \pm 10,8$ mg/g) sendo que, a própolis brasileira apresentou $51,9 \pm 2,4$ mg/g.

Os principais ácidos aromáticos encontrados na própolis brasileira são o 3-prenil-4-hidroxicinâmico e o 6-propenóico-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano, dentre outros. Vários outros compostos bioativos vêm sendo isolados na própolis brasileira conforme explicado no item 3.2.1 (BANSKOTA *et al.*, 1998).

O composto DHCA (ácido 3,5 –diprenil-4-hidroxicinâmico) também conhecido como Artepillin C é o principal componente na própolis brasileira avaliada por CLAE (MARCUCCI *et al.*, 2001). As própolis brasileiras são rotuladas como um produto único *Brazilian própolis* e a grande procura tem se dado em função da presença de Artepilin C um composto químico prenilado inicialmente isolado de própolis brasileira por AGA *et al.* (1994). No Japão, há grande procura por própolis que contenham Artepilin C o qual tem despertado interesse devido às suas propriedades biológicas com maior ênfase ao seu potencial antimicrobiano (AGA *et al.*, 1994), atividade antitumoral (KIMOTO *et al.*, 1998

apud GUZMÁN, 2005) e atividade antioxidante (SHIMIZU *et al.*, 2004 apud GUZMÁN, 2005).

Park *et al.* (2002) avaliaram a composição química e a origem botânica da própolis de *Apis mellifera* da região Sul do Brasil, Argentina e Uruguai, totalizando 150 amostras. Após o processamento e análise das amostras de própolis coletadas na região Sul do Brasil, quanto ao perfil cromatográfico em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM), foi possível a classificação em 5 grupos distintos. Em estudos anteriores Park *et al.* (2000) relataram a existência de 12 grupos de própolis brasileira, sendo que na região Sudeste foi encontrado apenas um grupo. Isto demonstra que a região Sul do Brasil apresenta uma maior diversidade vegetal para a retirada de resina pelas abelhas ocasionando a existência de cinco grupos distintos de própolis do Sul, muito embora apenas um grupo pôde ter sua origem vegetal elucidada.

Sawaya *et al.* (2004) relacionaram amostras de própolis originárias da África, Europa, América do Norte e do Brasil com sua origem botânica. As amostras de própolis brasileira provenientes do Sul e Sudeste do Brasil apresentaram coloração verde e marrom. Dois grupos de própolis marrom (B1 e B2) foram diferenciados dentre as amostras provenientes do Sul do Brasil. O grupo 1 (B1) com quatro amostras provenientes do estado do Paraná apresentou compostos similares aos das própolis provenientes da Europa e América do Norte, onde a principal fonte botânica é a espécie *Populus*. Os resultados das amostras do grupo B2, todas provenientes do estado do Paraná, indicaram que estas amostras foram obtidas de mais de uma importante fonte vegetal provavelmente devido a uma superposição da vegetação que originou ambas as amostras dos grupos G e B1.

Segundo Bankova (2005) a única forma de padronizar um produto tão variável como a própolis é formular diferentes tipos de própolis de acordo com sua fonte botânica e o correspondente perfil químico. A caracterização da fonte botânica determina a composição química da própolis que combinada com o conhecimento dos princípios ativos possibilita a padronização e o controle de qualidade dos produtos. Sendo assim, para a própolis ser aceita oficialmente como fármaco é necessária uma padronização química que garanta sua qualidade, segurança e eficácia.

3.2.1. Atividades Biológicas da Própolis

O interesse sobre própolis tem duas justificativas: a primeira relacionada com as suas características de panacéia, ou seja, por possuir dezenas de atividades biológicas

simultaneamente e segundo devido ao alto valor agregado da própolis e seus derivados (PEREIRA *et al.*, 2002).

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas a sua composição química (PEREIRA *et al.*, 2002). Devido a sua vasta aplicação na medicina popular, a própolis tornou-se objeto de intensos estudos farmacológicos e químicos nos últimos 30 anos (BANKOVA, 2005).

Entre as atividades biológicas da própolis já comprovadas podemos citar: antioxidante (PARK e IKEGAKI, 1998; KUMAZAWA *et al.*, 2004; NAGAI *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004); antimicrobiana (MARCUCCI *et al.*, 2001; PARK e IKEGAKI, 1998; LU *et al.*, 2005); antiinflamatória (PARK e IKEGAKI, 1998); anti-HIV (ITO *et al.*, 2001) e antitumoral (KIMOTO *et al.*, 1999).

A própolis possui atividade antibacteriana especialmente contra bactéria gram-positiva. Esta atividade é atribuída a flavonóides e ácidos aromáticos presentes na resina, mas a relação entre a estrutura e a atividade antimicrobiana dos constituintes da própolis é desconhecida (MARCUCCI *et al.*, 2001).

Ito *et al.* (2001) isolaram da própolis brasileira um novo triterpenóide chamado melliferona, três triterpenóides e quatro compostos aromáticos conhecidos dos quais foram testados a atividade anti-HIV em linfócitos H9. O ácido morônico apresentou significativa atividade anti-HIV.

Aga *et al.* (1994) testaram a atividade antibacteriana do Artepilin C contra 18 tipos de microrganismos. Este composto mostrou atividade relativamente forte contra *Microsporum gypseum* e *Arthroderma benhamiae* (fungos cutâneos) e bactérias como *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras.

Marcucci *et al.* (2001) isolaram e identificaram quatro compostos da própolis brasileira, conforme a Figura 3.2: (1) ácido 3- prenil-4- hidroxicinâmico (PHCA), (2) 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN), (3) ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA), e (4) 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopiran (DPB). Todos os compostos foram testados contra *Trypanosoma cruzi* e as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Os compostos de (1) a (3) foram ativos contra *Trypanosoma cruzi* e com exceção do composto (1), todos os compostos apresentaram atividade contra as bactérias testadas.

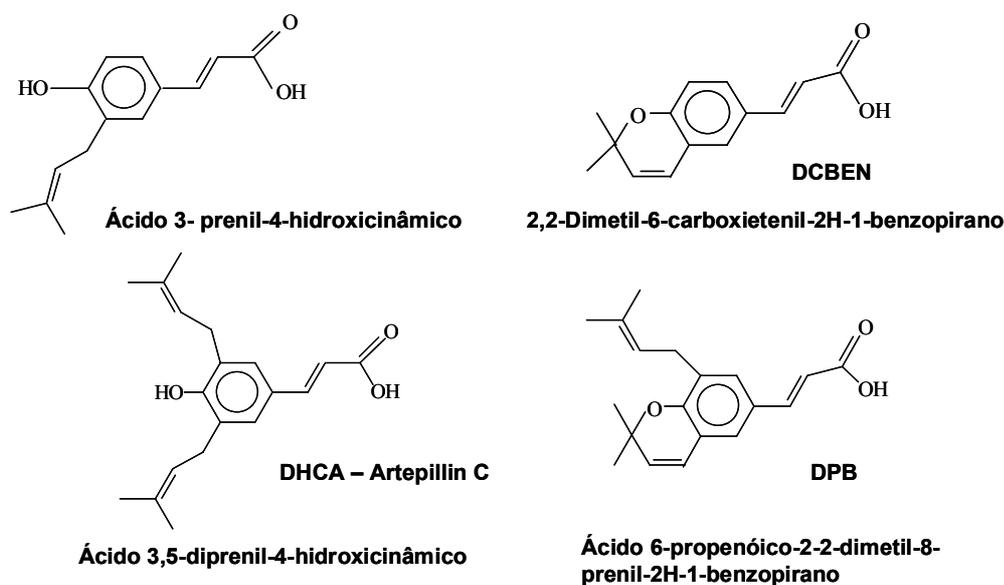


Figura 3.2 – Compostos fenólicos da própolis brasileira com atividade antimicrobiana.

(MARCUCCI *et al.*, 2001)

Kumazawa *et al.*, (2004) avaliaram a atividade antioxidante de própolis de várias origens geográficas. Os EEP foram preparados e suas atividades antioxidantes foram determinadas pelo método do β -caroteno e do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Foram determinados também o teor de flavonóides através do método colorimétrico de AlCl_3 e o de fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu. Os EEP provenientes da Argentina, Austrália, China, Hungria e Nova Zelândia apresentaram as melhores atividades antioxidantes, acima de 60% para a concentração final de extrato de 10 $\mu\text{g/mL}$. A atividade antioxidante parece estar correlacionada com o conteúdo total de flavonóides dos EEP. O efeito sobre o radical livre DPPH dos compostos constituintes das própolis foi avaliado, sendo que o composto Artepillin C, apresentou forte atividade seqüestraste do radical livre DPPH, acima de 60 % para a concentração final de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Park e Ikegaki (1998) avaliaram as atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória de extratos etanólicos e aquosos de própolis de Minas Gerais. Os extratos foram obtidos com diversas concentrações de etanol. Os extratos aquosos não apresentaram flavonóides, não inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e a atividade da hialuronidase. Já os extratos de etanol 80 % apresentaram a maior concentração de kaempferina, acacetina e isoramnetina e a maior inibição da atividade da hialuronidase que

está relacionada com o processo inflamatório do tecido animal. Extratos etanólicos de 60 a 80% inibiram fortemente o crescimento microbiano. Todos os extratos etanólicos e aquosos mostraram atividade antioxidante sendo que os extratos obtidos com 70 e 80 % de etanol apresentaram a maior atividade.

Nagai *et al.* (2003) determinaram a atividade antioxidante e o efeito contra os radicais livres ânion superóxido, hidroxil e DPPH, do extrato aquoso de própolis brasileira. O extrato aquoso foi diluído em concentrações de 1 a 100 mg/mL de água e utilizado para os testes. As atividades antioxidantes dos extratos aquosos foram determinadas através do sistema modelo do ácido linoléico, e nas concentrações de 1 e 5 mg/mL foram maior que aquela apresentada pelo ácido ascórbico 5 mM. Os extratos nas concentrações de 50 e 100 mg/mL inibiram completamente a produção dos radicais superóxido e hidroxil.

Banskota *et al.* (2000) avaliaram três diferentes atividades biológicas, atividade sequestrante do radical DPPH, atividades citotóxica e hepatoprotetiva de extratos aquosos e metanólicos de nove diferentes própolis do Brasil, Peru, Nova Zelândia e China. Os resultados mostraram que extratos aquosos de seis própolis brasileiras apresentam atividade sequestrante do radical livre DPPH mais forte que os correspondentes extratos metanólicos enquanto que estes apresentaram citotoxicidade mais fortes contra carcinoma de cólon 26-L5 e células de fibrosarcoma humano HT-1080.

Sforcin *et al.* (2000) estudaram o efeito da sazonalidade na atividade antimicrobiana “in vitro” da própolis brasileira. As amostras foram coletadas durante as quatro estações do ano na escola de medicina da UNESP em Botucatu – SP. O método utilizado foi o de diluição de EEP em ágar com concentrações variando de 0,4 a 14,0 % (v/v). O crescimento das bactérias gram-positivas é inibida a baixas concentrações de própolis (0,4%) enquanto que as bactérias gram-negativas foram menos susceptíveis a esta substância. Não houve diferença significativa com respeito à sazonalidade para os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo confirmado que a própolis apresenta eficiente ação antimicrobiana principalmente contra bactéria gram-positiva.

O Quadro 3.1 apresenta o resumo de algumas atividades biológicas estudadas para a própolis conforme descritas no item 3.2.1.

Quadro 3.1: Resumo das atividades biológicas da própolis e pesquisas relacionadas.

Atividades Biológicas da Própolis	Pesquisas relacionadas
Antimicrobiana	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2001; PARK e IKEGAKI,1998; SFORCIN <i>et al.</i> 2000
Antioxidante	PARK e IKEGAKI, 1998; KUMAZAWA <i>et al.</i> , 2004; NAGAI <i>et al.</i> , 2003; WANG <i>et al.</i> , 2004; BASKOTA <i>et al.</i> 2000
Antiinflamatória	PARK e IKEGAKI,1998
Anti-HIV	ITO <i>et al.</i> , 2001
Antitumoral	KIMOTO <i>et al.</i> , 1999; BASKOTA <i>et al.</i> 2000

3.3. Atividade Antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, tais como o α -tocoferol, β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e flavonóides (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A importância dos antioxidantes para alimentos e sistemas biológicos é bem conhecida. Os antioxidantes protegem os alimentos e o sistema biológico da oxidação através de diferentes mecanismos como o seqüestro de radicais livres, quelatando metais, ou agindo como eliminadores de oxigênio (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, geralmente formados pela perda ou ganho de elétrons. No meio biológico, a maioria das moléculas não se encontram na forma de radicais, permanecendo com elétrons pareados, entretanto em determinadas situações, os radicais livres são formados e podem causar efeitos fisiológicos e patológicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas através de sucessivas reações de redução parcial do oxigênio até água. Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação das EROs, os organismos aeróbicos foram dotados de distintas defesas antioxidantes. O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema de defesa

antioxidante endógeno é o fator predominante que pode causar uma série de mudanças fisiológicas, denominadas de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres e EROs como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o radical peróxido (ROO^{\bullet}) têm sido responsabilizados como mediadores de várias doenças como diabetes, doença vascular, hipertensão, câncer, declínio do sistema imunológico, doenças neurodegenerativas, entre outras (TSAO e DENG, 2004). No corpo humano, os danos oxidativos causados pelos radicais livres no DNA, lipídeos, proteínas, e em outras moléculas podem contribuir para o desenvolvimento de doenças degenerativas e câncer (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006). Aproximadamente 90 % de todos os casos de câncer estão correlacionados com fatores ambientais e hábitos alimentares (ROGINSKY e LISSI, 2005).

O interesse na atividade antioxidante de produtos naturais foi intensificado a partir de 1990 quando estudos comprovaram que a influência benéfica de alimentos e bebidas como frutas, chás, vinho tinto, café e cação na saúde humana está associada à atividade antioxidante de polifenóis naturalmente presentes nestes alimentos (ROGINSKY e LISSI, 2005). A maioria da atividade antioxidante de frutas e vegetais deve-se a compostos como ácidos fenólicos e flavonóides (TSAO e DENG, 2004).

A atividade antioxidante de compostos naturais como flavonóides e ácidos fenólicos é predominantemente determinada por suas estruturas e em particular pelo deslocamento de elétron sobre um núcleo aromático. Quando estes compostos reagem com um radical livre, é o deslocamento do elétron ganho sobre o antioxidante fenólico e a estabilização pelo efeito da ressonância do núcleo aromático, que previnem a continuação da reação em cadeia do radical livre (TSAO e DENG, 2004).

Nos alimentos, a deterioração oxidativa de gorduras e óleos resulta em odores de ranço, sabor, e formação de compostos secundários potencialmente tóxicos. Os principais antioxidantes utilizados na indústria de alimentos são o BHA (Butil-hidroxi-anisol), o BHT (Butil-hidroxi-tolueno) e o TBHQ (Terbutil-hidroxiquinona) (FKI *et al.*, 2005). Atualmente, existe um grande interesse na investigação de compostos naturais que possam substituir estes antioxidantes visto que são prejudiciais à saúde. Antioxidantes sintéticos como o BHA e o BHT tendem a ter somente um modo de ação, como por exemplo, via seqüestro de radical livre e não são capazes de seqüestrar íons metálicos através da rota catalizada por metal (TSAO e DENG, 2004).

Numerosas técnicas estão disponíveis para avaliar a atividade antioxidante de compostos e misturas complexas. Os métodos mais comuns para determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível envolvem um radical cromóforo que simula as

espécies reativas de oxigênio (EROs). A presença de antioxidantes leva ao desaparecimento da cor destes radicais (ARNAO, 2000). Os radicais mais utilizados são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil ($\cdot OH$), óxido nítrico ($\cdot NO$), alquilperoxil ($ROO\cdot$), N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMDP $^{+}$) e DPPH \cdot (α,α -difênil- β -picrilhidrazil) (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

Embora não deva caracterizar a atividade antioxidante, a determinação do teor de fenólicos totais é um dos melhores métodos para uma estimativa da atividade antioxidante de amostras de alimentos já que esta está associada à presença de compostos como ácidos fenólicos e flavonóides (ROGINSK e LISSI, 2005).

Conforme citado no item 3.2.1. a própolis possui atividade antioxidante comprovada. Porém, no caso do Brasil, onde uma grande variedade de própolis está disponível, mais estudos são necessários a fim de determinar qual tipo de própolis possui melhor atividade antioxidante e qual método de extração é mais adequado para a obtenção dos compostos responsáveis por esta atividade. Dentro deste contexto o presente trabalho visa a determinação da atividade antioxidante dos extratos de própolis obtidos com diferentes técnicas de extração.

3.4. Atividade Antimicrobiana

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas por um microorganismo que têm a capacidade de em soluções diluídas inibir o crescimento, ou, de matar microorganismos. Esta definição exclui os compostos sintéticos que, juntamente com os compostos naturais são denominados antimicrobianos. Os antimicrobianos são substâncias que atuam diretamente sobre microorganismos, agindo sobre sua membrana celular, suas enzimas ou seu DNA, promovendo a inibição do crescimento ou a morte (GINZBURG *et al.*, 2000).

Antibióticos que são suficientemente atóxicos para o hospedeiro são usados como agentes quimioterápicos no tratamento de doenças infecciosas do homem, animais e plantas. Desde a introdução da penicilina, houve um aumento significativo no número de classes de antibióticos disponíveis. Durante as últimas décadas, a utilização indiscriminada de antibióticos em diversos setores da agricultura, bem como na saúde humana, vêm favorecendo o aparecimento de linhagens de microorganismos patogênicos apresentando resistência aos mais variados antibióticos (GINZBURG *et al.*, 2000). Alguns patógenos adquiridos em hospital estão se tornando totalmente resistentes a antibióticos, como exemplos podemos citar: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (KOLLEF, 2000).

Devido à resistência desenvolvida pelos microrganismos houve a necessidade de desenvolvimento de novas classes de antibióticos e diversas pesquisas têm sido realizadas com produtos naturais, como a própolis, visando a detecção de compostos com propriedades terapêuticas, entre elas a antimicrobiana (ADELMAN, 2005).

A própolis tem sido frequentemente rotulada como “antibiótico natural” devido à sua comprovada atividade antimicrobiana contra diversas linhagens de microrganismos conforme citado anteriormente no item 3.2.1. Durante os últimos anos tem sido relatada a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis que provavelmente se deve à presença de compostos como os flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural. O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo e provavelmente baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana, podendo decorrer de um efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995).

A atividade antimicrobiana dos extratos de produtos naturais pode ser determinada através de vários métodos disponíveis na literatura. Os diferentes métodos não são igualmente sensíveis e os resultados passam a ser influenciados pelo método selecionado, pelos microrganismos utilizados e pelas características de solubilidade dos extratos. Devem ser utilizadas cepas padrão provenientes de coleções de cultura como ATCC (American Type Culture Collection) para que seja possível a comparação com outras pesquisas (VANDEN BERGHE, 1991).

O método de difusão em ágar é um método qualitativo, amplamente utilizado na triagem dos extratos dos quais se deseja determinar a atividade antimicrobiana. Através deste método pode-se verificar se o extrato testado é capaz de inibir ou não o crescimento do microrganismo de interesse. As vantagens deste método são a pequena quantidade das amostras usadas e a economia na utilização de apenas uma placa de Petri para testar cinco extratos (VIEIRA, 2005).

Os extratos que apresentam atividade contra os microrganismos no método de triagem devem ser submetidos a testes quantitativos de atividade antimicrobiana. A concentração mínima inibitória (CMI) consiste na concentração mínima da substância testada capaz de inibir o microrganismo de interesse e pode ser determinada através de três técnicas: diluição em caldo, diluição em ágar e microdiluição em caldo de cultivo (SMÂNIA, 2003).

A técnica de microdiluição em caldo de cultivo é a mais usada e utiliza diferentes concentrações do extrato em uma série de orifícios em placas de microdiluição contendo uma suspensão padronizada do microrganismo a ser testado. A partir das diluições do extrato que não apresentam crescimento, pode-se repicar para placa de ágar e verificar a concentração

mínima bactericida (CMB) que é a concentração de extrato que não só inibe o crescimento mas também inativa o microrganismo (VIEIRA, 2005).

3.5. Métodos de Extração

Aspectos como qualidade e composição dos produtos fitoterápicos estão fundamentalmente relacionados com a técnica de extração empregada na preparação dos extratos de produtos naturais. O procedimento de extração é determinado pela família de compostos a ser extraída e se o objetivo é quantitativo ou qualitativo. Compostos polares como os ácidos fenólicos são geralmente extraídos utilizando água, etanol ou uma mistura de água e etanol (TSAO e DENG, 2004).

A extração de substâncias biologicamente ativas pode ser realizada através de técnicas convencionais de extração como a maceração e a extração Soxhlet. Nestas extrações são utilizados diversos tipos de solventes como álcoois metílico, etílico e propílico; hexano; clorofórmio; acetato de etila; acetona; entre outros. Estas técnicas são comumente aplicadas nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos para a produção de extratos diversos.

O processo de maceração consiste em deixar a matéria-prima em contato com o solvente por um determinado tempo, à temperatura ambiente, para extrair os compostos de interesse. Este processo, mesmo utilizando agitação, pode resultar em longos períodos de extração. No sistema Soxhlet a matéria-prima é extraída através do solvente aquecido em refluxo contínuo. Para estes dois tipos de extração é necessária uma etapa posterior de eliminação do solvente a qual exige um grande dispêndio de energia. Este tipo de extração resulta em grande quantidade de resíduo prejudicial ao meio ambiente, além de produzir extratos não totalmente livres de solvente orgânico. O uso de grande quantidade de solventes orgânicos altamente purificados, com alto custo de obtenção e disposição, e seu uso por período prolongado pode desenvolver problemas de saúde (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006; ÖZCAN, A. e ÖZCAN, A.S., 2004).

Na literatura são reportadas diferentes técnicas de extração para a obtenção de extratos de própolis, como a extração soxhlet e maceração, sendo que esta última é a técnica mais utilizada. Os procedimentos adotados em cada trabalho visam objetivos diferentes, tais como avaliação de atividades biológicas, de rendimento, de origem botânica entre outros.

Cunha *et al.* (2004) avaliaram os fatores que influenciam no rendimento e composição dos extratos de própolis verde da região sudeste do Brasil. A maceração foi realizada utilizando etanol absoluto e diluído a 70 %, 50 % e 30 % (v/v) com água destilada, além de

álcool comercial de cereais (96° GL), por períodos de 7, 10, 20 e 30 dias, com e sem luz. Na extração soxhlet foi utilizado etanol absoluto e água destilada como solventes por um período de 24 h a 60 °C. O rendimento do extrato de própolis aumentou com o conteúdo etanólico no solvente sendo que, este aumento estabilizou usando solventes com 70 % ou mais de etanol. O uso da extração soxhlet diminuiu o tempo de extração e aumentou o rendimento.

Park e Ikegaki (1998) obtiveram extratos de própolis do estado de Minas Gerais – Brasil através da maceração, utilizando misturas de água destilada e etanol contendo de 0 a 95% (v/v) de etanol, com agitação a 70 °C por 30 min. Os extratos foram avaliados em termos de atividade antioxidante, antimicrobiana e inibição da atividade da hialuronidase. Os extratos obtidos com 60 a 80 % de etanol apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante e antimicrobiana.

Sforcin *et al.* (2000) utilizaram a maceração de 30 g de própolis em 100 mL de álcool etílico 95° GL, com agitação moderada, à temperatura ambiente, por uma semana. Os extratos foram utilizados para avaliar o efeito da sazonalidade na atividade antibacteriana da própolis brasileira.

Kumazawa *et al.* (2004) utilizaram a maceração com etanol absoluto à temperatura ambiente por um período de 24 h para obter EEP de várias origens geográficas. Os extratos foram avaliados em termos de atividade antioxidante, conteúdo de fenólicos totais e flavonóides.

Nagai *et al.* (2003) obtiveram extratos aquosos de própolis brasileira através de maceração de 50 g de própolis com 5 volumes de água destilada, com agitação a 20 °C por 24 horas. Foram determinados a atividade antioxidante e o efeito contra os radicais livre ânion superóxido, hidroxil e DPPH dos extratos obtidos.

Park *et al.* (2002) extraíram 2 g de própolis com 15 mL de etanol 80 % (v/v), a 70 °C por 30 min. e sob agitação constante para obter EEP do sul do Brasil, Argentina e Uruguai. Os extratos foram utilizados para determinar evidências fitoquímicas da origem vegetal das própolis analisadas.

Banskota *et al.* (2000) extraíram própolis de diversas origens com água a 80 °C por 3 h. Após a filtração o filtrado foi liofilizado resultando no extrato aquoso e o resíduo foi novamente extraído com metanol em refluxo por 3 h para obter o extrato metanólico. Os extratos foram utilizados para determinar a atividade seqüestrante do radical DPPH, atividade citotóxica e hepatoprotectiva.

3.6. Extração Supercrítica (ESC)

O aumento da demanda por antioxidantes alimentícios naturais e a necessidade de novos compostos com atividade antimicrobiana tem estimulado pesquisas relacionadas à extração de substâncias biologicamente ativas de uma variedade de materiais (DÍAZ-REINOSO, 2006). A ESC pode ser considerada um dos métodos novos de extração mais potencialmente útil no isolamento e obtenção de compostos a partir de matrizes naturais (AGHEL *et al.*, 2004).

A ESC caracteriza-se por utilizar como solvente de extração um fluido em temperaturas e pressões próximas ao ponto crítico (DÍAZ-REINOSO, 2006). Uma das aplicações mais difundidas dos fluidos supercríticos é a extração ou eliminação de uma ou mais famílias de compostos a partir de uma matriz natural sólida (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

A seletividade na ESC pode ser manipulada pela escolha do FSC, ou pelo controle de parâmetros de processo como temperatura, pressão, tempo de extração, vazão de solvente e o uso de modificadores (AGHEL *et al.*, 2004).

A extração supercrítica de uma matriz sólida consiste de duas etapas de processo: a) a extração e b) a separação do extrato do solvente. Num esquema básico de extração, o solvente supercrítico flui através de um extrator com o leito fixo de partículas sólidas e solubiliza os componentes extraíveis do sólido. O solvente sai carregado do extrator, passa através de uma válvula de despressurização e devido a menor pressão, o extrato é liberado do meio gasoso e coletado (BRUNNER, 1994; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

A ESC possui vantagens sobre as técnicas convencionais de extração: é um processo flexível devido à possibilidade de ajuste contínuo do poder de solvatação e seletividade do solvente; não utiliza solventes orgânicos poluentes; não necessita do dispendioso pós-processamento dos extratos para a eliminação do solvente; a degradação térmica e decomposição de compostos voláteis podem ser evitadas através do emprego de baixas temperaturas e a ausência de luz e oxigênio previne reações de oxidação (REVERCHON e DE MARCO, 2006; DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

Um extrato obtido com tratamento supercrítico de CO₂ pode ser considerado como totalmente natural e os produtos permitidos para aplicação alimentícia possuem *status* GRAS (**Generally Recognized As Safe**). O alto gradiente de pressão durante a despressurização pode produzir extratos livre de microrganismos vivos e seus esporos, com uma maior vida de

prateleira que extratos convencionais obtidos com solventes orgânicos (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

3.6.1. O Fluido Supercrítico

Um componente puro é considerado no estado supercrítico se sua temperatura e pressão estão acima dos valores críticos. No estado supercrítico a distinção entre as fases líquida e gasosa desaparece, o fluido não pode ser liquefeito através do aumento de pressão e o gás não pode ser formado com o aumento da temperatura. A temperatura crítica é a temperatura mais alta na qual um gás pode ser convertido em líquido pelo aumento de pressão. Já a pressão crítica é a pressão mais alta na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura (BRUNNER, 1994). A Figura 3.3 apresenta o diagrama de fases do dióxido de carbono.

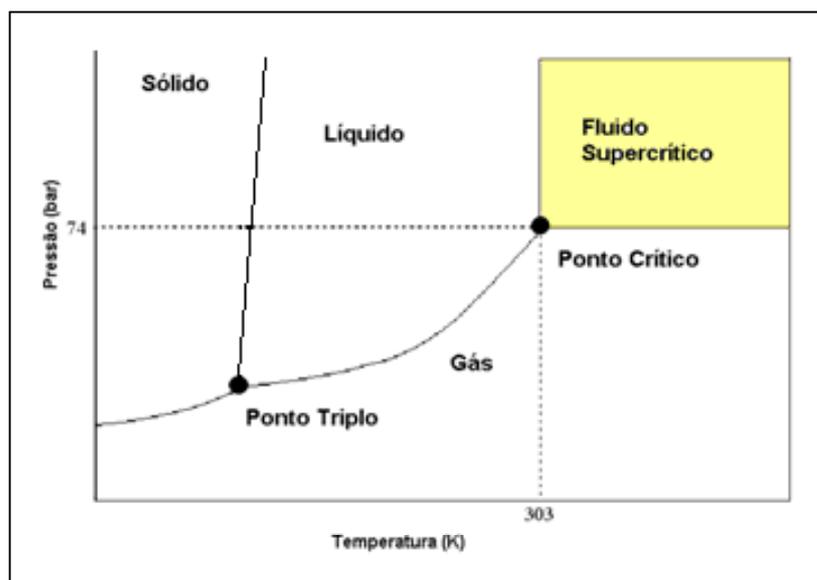


Figura 3.3 - Diagrama de Fases do Dióxido de Carbono (Wikipedia, 2006).

O fluido supercrítico apresenta características de gases e de líquidos, sendo que suas propriedades podem variar em ampla faixa através da mudança nas condições de temperatura e pressão ao qual são submetidos. As densidades apresentadas por estes fluidos são próximas às de líquidos, com valores de 0,6 à 1,6 g/cm³ e a difusividade é intermediária entre valores de gases de 0,1 à 0,4 cm²/s e de líquidos de 0,2 x 10⁻⁵ à 2 x 10⁻⁵ cm²/s. Já os dados de viscosidade são baixos, característicos de gases, com valores de 1 x 10⁻⁴ à 3 x 10⁻⁴ g/cm.s.

Comparados aos solventes orgânicos líquidos convencionais, os fluidos supercríticos têm uma maior difusividade e menor densidade, viscosidade, e tensão superficial (DÍAZ-REINOSO, 2006). As características de baixa viscosidade e alta difusividade facilitam a transferência de massa durante a extração (AGHEL *et al.*, 2004). As características de gás ajudam na difusão do fluido para a matriz e o acesso aos compostos de interesse enquanto que as características de líquido proporcionam um bom poder de solvatação do soluto (TSAO e DENG, 2004).

Vários compostos têm sido examinados como solventes da extração supercrítica, entretanto, o CO₂ (Pc= 7,28 MPa; Tc= 304,1 K) é o solvente mais frequentemente usado devido as suas vantagens práticas, incluindo suas características de não-toxicidade e não-inflamabilidade, segurança ao meio ambiente, disponibilidade e baixo custo (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006; ÖZCAN, A. e ÖZCAN, A.S., 2004; TSAO e DENG, 2004). Ele permite operações supercríticas em pressões relativamente baixas e em temperaturas próximas à ambiente (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

O CO₂ supercrítico tem encontrado mais e mais aplicações como um solvente para a extração de compostos de alto valor agregado de produtos naturais (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006; SIMÁNDI *et al.*, 1998). Devido à propriedade apolar do CO₂ ele é mais apropriado para a extração de antioxidantes como carotenóides e outros antioxidantes relativamente lipofílicos (TSAO e DENG, 2004). Compostos mais polares como flavonóides e ácidos fenólicos, responsáveis pela atividade biológica da própolis são menos solúveis no CO₂ supercrítico necessitando assim da utilização de um co-solvente junto ao fluido supercrítico para melhorar a extração destes compostos.

A solubilidade do soluto no fluido supercrítico (FSC) está relacionada diretamente à sua densidade e então pode ser controlado pela mudança da pressão de extração ou temperatura (em menor grau) (AGHEL *et al.*, 2004). A densidade do CO₂ pode variar de aproximadamente 0,15 a 1,0 g/cm³. A solubilidade do soluto aumenta com a pressão de operação a uma temperatura constante devido ao aumento da densidade do solvente. A regra geral é: quanto mais alta a pressão, maior é a solubilidade do soluto (e conseqüentemente maior o rendimento da extração) e menor é a seletividade (REVERCHON e DE MARCO, 2006). O aumento da temperatura a uma pressão fixa reduz a densidade do SC-CO₂ reduzindo então a solubilidade; mas ao mesmo tempo aumenta a pressão de vapor dos compostos a serem extraídos. Sendo assim, a tendência destes compostos passarem para a fase fluida é aumentada. Estes dois efeitos contrários resultam na inversão das isotermas de rendimento, fenômeno conhecido como retrogradação. Em pressões abaixo do ponto onde ocorre a

inversão, o efeito dominante é o da densidade do solvente, ou seja, o aumento da temperatura diminui a solubilidade dos compostos no FSC diminuindo o rendimento da extração. Porém, em pressões acima do ponto de inversão o efeito dominante é o da pressão de vapor do soluto cuja elevação com a temperatura resulta em aumento da solubilidade e consequentemente do rendimento da extração. (CAMPOS *et al.*, 2005; MICHIELIN *et al.*, 2005).

3.6.2. Extração Supercrítica Seqüencial

Uma possível variação do esquema de extração supercrítica é a extração em estágios múltiplos ou extração seqüencial. As operações multi-estágios são obtidas variando pressão e/ou temperatura em cada etapa do processo. Esta estratégia pode ser usada quando se requer a extração de várias famílias de compostos a partir da mesma matriz, os quais apresentam diferentes solubilidades em CO₂ supercrítico (SC-CO₂). Por exemplo, é possível realizar uma primeira extração operando a baixa densidade de CO₂ (baixa pressão) seguida por uma segunda etapa de extração com alta densidade de CO₂ (alta pressão). Os compostos mais solúveis são extraídos durante a primeira etapa (por exemplo, óleos essenciais) e os menos solúveis na segunda (por exemplo, antioxidantes) (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Ibáñez *et al.* (1999) propôs a extração com fluido supercrítico em duas etapas das folhas de alecrim em condições selecionadas de pressão e temperatura para dividir a oleoresina em duas frações com diferentes composições: compostos pesados com atividade antioxidante e óleo essencial. A amostra foi extraída usando um método em duas etapas, a primeira fração foi obtida a 10 MPa e 40°C e a segunda fração a 40 MPa e 60°C para obter óleo essencial e compostos antioxidantes, respectivamente. Os resultados demonstraram que o processo de ESC em duas etapas proporcionou uma seletividade aceitável em termos de obtenção de frações com propriedades claramente diferenciadas: a fração 1 contém o óleo essencial (caracterizado por CG/EM) e a fração 2 o extrato com propriedades antioxidante caracterizado pelo método do radical livre.

Sementes de uvas brancas foram submetidas à extração seqüencial com fluido supercrítico. Com o aumento da polaridade do fluido supercrítico usando metanol como modificador do CO₂ foi possível fracionar os compostos extraídos. A primeira fração foi obtida utilizando CO₂ puro e continha principalmente ácidos graxos, aldeídos alifáticos e esteróis. A segunda fração, obtida com CO₂ modificado com metanol, possuía compostos fenólicos, principalmente catequina, epicatequina e ácido gálico. A atividade antimicrobiana

foi avaliada em patógenos humanos e um alto grau foi obtido com a fração lipofílica (PALMA *et al.*, 1999).

Simándi *et al.* (1998) realizaram a extração com SC-CO₂ das folhas de orégano (*Origanum vulgare L.*) de duas formas. Extrações com etapas diversas de precipitação do extrato foram realizadas para obter óleo essencial e produtos pastosos. Outra forma de ESC utilizada foi a extração fracionada com etapas de pressão de extração crescente, a qual foi realizada para obter porções de extratos com diferentes qualidades. Os rendimentos dos produtos separados foram os mesmos que na extração fracionada obtida por etapas de pressão crescente daquelas obtidas pela extração total usando vários estágios de precipitação.

Yepez *et al.* (2002) obtiveram diferentes frações de extrato de sementes de *Coriandrum sativum* através da extração com SC-CO₂. Inicialmente o óleo essencial foi removido da matéria prima utilizando a extração com baixa densidade de CO₂ (0,60 g/mL) e posteriormente as sementes foram extraídas com alta densidade (0,73-0,83 g/mL). A atividade antioxidante das frações foi determinada medindo-se a habilidade de remover o radical livre presente na solução metanólica de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Os resultados indicaram que a extração supercrítica é um processo promissor para a produção de frações com atividade antioxidante.

3.6.3. Utilização de Co-Solvente

O SC-CO₂ comporta-se como um solvente lipofílico (apolar), portanto, ele tem uma baixa afinidade com compostos polares. O uso de co-solventes ou modificadores foi proposto como um método para melhorar a solubilidade dos compostos desejados e/ou aumentar a seletividade da extração, permitindo operações com baixa pressão. Os co-solventes são solventes orgânicos que são utilizados na ESC em baixas quantidades (se comparados à extração convencional). Estes co-solventes atuam aumentando o rendimento e alterando a seletividade do processo através da mudança das características do solvente como a polaridade e promovendo interações específicas com o soluto como pontes de hidrogênio (REVERCHON e DE MARCO, 2006; DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006; CATCHPOLE *et al.*, 2004).

Diversos solventes orgânicos podem ser utilizados como co-solventes na ESC. O etanol é o solvente mais empregado, pois atende as exigências legais para o uso de solventes orgânicos em insumos para a indústria de alimentos.

Santoyo *et al.* (2006) realizaram a extração de compostos antioxidantes e antimicrobianos das folhas de *Laurus nobilis L.* a 250 bar e 60 °C utilizando 4 % de etanol como co-solvente. Dois estágios de separação foram utilizados para obter duas frações (F1 e F2) as quais foram avaliadas em termos de atividade antioxidante e antimicrobiana. As duas frações apresentaram atividade antioxidante moderada e similar, porém apenas a fração 2 apresentou atividade antimicrobiana.

Cavero *et al.* (2005) determinaram a atividade antioxidante de extratos fracionados de alecrim obtidos através de ESC a 40 e 60 °C, pressões variando de 150 a 350 bar e utilizando como co-solvente 4 e 7 % de etanol. Os rendimentos das extrações variaram no primeiro separador de 0,03 a 0,13 % (m/m) quando não foi utilizado co-solvente e de 3,93 a 6,78 % (m/m) para as extrações nas quais etanol foi utilizado como co-solvente. No segundo separador os rendimentos variaram de 0,03 a 1,19 % (m/m) para as extrações realizadas sem co-solvente e de 3,95 a 10,03 % (m/m) quando o co-solvente foi utilizado. A atividade antioxidante foi determinada através dos métodos de DPPH (1,1 – difenil-2- picrilhidrazil) e β -caroteno, e posteriormente correlacionada com o perfil químico dos extratos. O ácido carnosínico parece ser o principal composto responsável pela atividade antioxidante na maioria dos extratos de alecrim analisados. O uso do co-solvente teve um importante efeito na extração de compostos antioxidantes em todas as condições testadas.

3.6.4. Extração Supercrítica da Própolis

Poucos estudos sobre a ESC de própolis estão disponíveis na literatura. Apenas You *et al.* (2002) tratam da ESC a partir da própolis sólida enquanto outros estudos relatam o fracionamento supercrítico do extrato de própolis (WANG *et al.*, 2004; CATCHPOLE *et al.*, 2004). Os trabalhos You *et al.* (2002) e Wang *et al.* (2004) utilizam a própolis brasileira mas não especificam de qual região a própolis é proveniente nem a origem botânica, o que dificulta a correlação dos resultados, visto que existem diversos tipos de própolis brasileiras com as mais variadas características.

You *et al.* (2002) utilizaram o SC-CO₂ para melhorar a extração e a solubilidade em água de nove flavonóides da própolis brasileira e da chinesa. Os efeitos da utilização de etanol e água como co-solventes foram examinados. A extração com SC-CO₂ removeu primeiramente compostos voláteis e cerosos presentes na própolis. Compostos mais polares como os flavonóides permanecem na matriz sólida. Sendo assim, o resíduo desta extração foi re-extraído com etanol e água. O pré-tratamento com o SC-CO₂ melhorou a extração dos

flavonóides presentes na própolis brasileira. A utilização de etanol como co-solvente aumentou a eficiência da ESC, porém isto não ocorreu com a utilização de água. Os extratos supercríticos de própolis brasileira apresentaram maior inibição de células cancerígenas de leucemia do que os extratos de própolis chinesa, sugerindo que outros compostos presentes nos extratos supercríticos além dos flavonóides dominaram este efeito inibitório. Este foi o primeiro trabalho reportado sobre a ESC da própolis.

Wang *et al.* (2004) fracionaram o extrato etanólico de própolis (E) com dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) nas seguintes condições: 200, 150, 100 ou 50 bar, em três separadores operando em série para produzir o residual (R), fração (1), fração (2) e fração (3), respectivamente. Os extratos correspondentes a estas quatro frações foram caracterizados em termos de conteúdo total de flavonóides e atividade antioxidante. A capacidade antioxidante das frações F1 e F2 foram mais baixas que aquelas das frações E e R; entretanto 2,0 mg/mL de F1 e F2 inibiram a peroxidação lipídica acima de 50 %. O efeito sequestrante do radical DPPH do extrato de própolis e frações na concentração de 2 mg/mL foram: 93 % (R), 80 % do tocoferol, 75 % (E), 56 % (F1), 47 % (F2) e 27 % (F3). As frações R e F1 tiveram a maior atividade antioxidante, seguida pela F2.

Catchpole *et al.* (2004) propôs um processo de extração supercrítica antisolvente para fracionar a tintura de própolis visando obter frações de flavonóides e óleo essencial, e remover componentes de alta massa molecular através da precipitação antisolvente. Na primeira etapa o SC-CO₂ é usado como antisolvente para precipitar componentes de alta massa molecular, e como um solvente para extrair o etanol e os componentes solúveis da própolis. O CO₂ comprimido é misturado cocorrentemente com a tintura de própolis proveniente de um tanque pulmão seguindo para uma câmara de precipitação onde a fração da tintura de própolis que não é solúvel em SC-CO₂ e etanol precipita. A fração solúvel é fracionada em duas etapas para produzir o concentrado em flavonóides como produto primário e a fração óleo essencial/etanol como produto secundário. Frações de extrato com uma concentração de flavonóides de 20-35 % (m/m) foram produzidas. A concentração da tintura de própolis é o parâmetro com maior efeito no rendimento e na concentração de flavonóides no produto, mas outros parâmetros como a proporção do fluxo de tintura de própolis e de CO₂ utilizado, a concentração de flavonóides na própolis e a pressão do fracionamento antisolvente também são importantes.

Assim, devido aos poucos estudos presentes na literatura sobre a ESC da própolis e dada a importância do estudo do extrato de própolis, o presente trabalho visa a avaliação das propriedades biológicas dos extratos obtidos através de ESC e métodos convencionais de

extração. Os extratos supercríticos também foram obtidos a partir da própolis sólida como You *et al.* (2002), utilizando uma própolis do sul do Brasil a qual apresenta poucos estudos na literatura. Além da utilização da ESC em etapa única, no presente trabalho a ESC em duas etapas sequenciais para a produção de duas frações de própolis foi realizada. Ainda vale ressaltar que se trata do primeiro estudo sobre a avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de própolis produzidos a partir da ESC.

3.6.5. Curvas de Extração

O projeto industrial de processos de extração supercrítica requer o conhecimento termodinâmico do sistema (solubilidade e seletividade) bem como a cinética do processo (taxa de transferência de massa) (FERREIRA e MEIRELES, 2002).

As curvas de extração são obtidas através do método dinâmico conforme descrito no item 4.5, pela relação entre a massa acumulada de soluto obtido e massa de solvente consumido ou tempo de extração. As operações de ESC podem ser relacionadas ao tempo de extração através da avaliação da curva de extração. Segundo Sovová (1994), Ferreira *et al.* (1999) e Ferreira e Meireles (2002) as curvas de extração podem ser divididas em três etapas:

I. Etapa de taxa constante de extração (CER) onde a superfície externa das partículas está coberta com soluto e a resistência à transferência de massa está na fase solvente;

II. Etapa de taxa decrescente de extração (FER) onde aparecem falhas na superfície externa da camada de soluto que envolve as partículas;

III. Etapa controlada pela difusão onde a transferência de massa ocorre somente através da difusão no leito e dentro da partícula sólida.

A distribuição inicial das substâncias extraíveis dentro do substrato sólido é de grande importância. As substâncias podem estar adsorvidas na superfície externa, na superfície de poros, igualmente distribuídas dentro do sólido ou dentro das células da planta. Cada uma destas diferentes distribuições têm alguma influência no curso da extração (BRUNNER, 1994).

A taxa de extração a partir de materiais sólidos é limitada pela solubilidade do soluto no SC-CO₂. Sendo assim, o conhecimento da solubilidade dos compostos a serem extraídos e dos compostos indesejáveis que devem ser evitados na co-extração é uma informação fundamental no processo de ESC. A solubilidade é um dado de equilíbrio e pode ser determinada através da curva de extração desde que o equilíbrio entre as fases sólida e fluida seja garantido. No método dinâmico, o solvente supercrítico flui continuamente através do

soluto e um longo tempo de contato é estabelecido no sistema a fim de que condições próximas do equilíbrio possam ser obtidas (REVERCHON, 1997; FERREIRA *et al.*, 1999; DANIELSKI *et al.*, 2007).

3.6.6. Modelagem

A modelagem matemática de curvas de ESC é empregada por vários autores com o objetivo de reproduzir dados experimentais existentes, e a partir deles ajustar parâmetros de processo que permitam a simulação das operações de extração em outras escalas e em outras condições operacionais (MARTÍNEZ, 2005).

Um modelo não deve ser apenas um instrumento matemático, mas deve refletir a visão física da estrutura sólida e das observações experimentais. Modelos matemáticos os quais não têm correspondência física com o material e o processo estudado são de validade limitada embora possam ser usados para ajustar alguns dados experimentais. Para a modelagem da extração supercrítica têm sido propostas três abordagens diferentes: (1) empírica, (2) baseada na analogia da transferência de calor e massa, (3) integração do balanço de massa diferencial. A partir da integração das equações diferenciais de balanço de massa os perfis de concentração em função do tempo são obtidos para as fases fluida e sólida. A curva de extração é calculada a partir da concentração na fase fluida na saída do extrator (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

O leito de extração compreende duas fases: (a) uma fase sólida, formada pelo material de onde o extrato é obtido, e (b) uma fase fluida, composta pelo solvente supercrítico com o extrato dissolvido nele (BRUNNER, 1994).

O modelo apresentado por Sovová (1994) é baseado no balanço de massa no leito de extração. A curva de extração é dividida em três etapas: etapa de taxa constante de extração (CER), etapa de taxa decrescente de extração (FER) e etapa difusional. Este modelo considera que o conteúdo total de soluto extraível (x_0) é dividido em duas partes: soluto de fácil acesso (x_p) e soluto de difícil acesso (x_k). Isto ocorre devido a presença de células rompidas durante a trituração da matéria prima (soluto de fácil acesso) e a presença de células intactas que não foram rompidas durante a trituração (soluto de difícil acesso). Assim, a primeira etapa do processo é caracterizada pelo coeficiente de transferência de massa na fase fluida e a segunda etapa pelo coeficiente de transferência de massa na fase sólida. As equações que descrevem as curvas de extração para as três etapas do processo estão representadas pelas Equações 3.1, 3.2 e 3.3.

Para $t < t_{\text{CER}}$: período (CER)

$$m_{\text{ext}} = Y^* [1 - \exp(-Z)] Q_{\text{CO}_2} \cdot t \quad \text{Eq. 3.1}$$

Para $t_{\text{CER}} \leq t < t_{\text{FER}}$: período (FER)

$$m_{\text{ext}} = Y^* [t - t_{\text{CER}} \cdot \exp(z_w - Z)] Q_{\text{CO}_2} \quad \text{Eq. 3.2}$$

Para $t \geq t_{\text{FER}}$: período difusional

$$m_{\text{ext}} = N \left\langle x_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp\left(\frac{W x_0}{Y^*}\right) - 1 \right] \exp\left[\left(\frac{W \cdot Q_{\text{CO}_2}}{N}\right)(t_{\text{CER}} - t)\right] \frac{x_k}{x_0} \right\} \right\rangle \quad \text{Eq. 3.3}$$

Sendo Z dado pela Equação 3.4.

$$Z = \frac{N \cdot k_{ya} \cdot \rho}{Q_{\text{CO}_2} \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \rho_s} \quad \text{Eq. 3.4}$$

Onde: m_{extr} é a massa de extrato (g), t_{CER} é a duração da etapa constante de extração (s), t_{FER} é o período de taxa decrescente de extração (s), N é a massa de matéria-prima livre de soluto (g), Y^* é a solubilidade (g/g), Q_{CO_2} é a vazão média do solvente (kg/s), x_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida, x_k é a razão mássica de soluto no interior de células intactas e W é um parâmetro para o período de taxa de extração lenta.

Nas equações do modelo de Sovová (1994) pode-se dizer que a quantidade Z é um parâmetro para o período CER porque esta quantidade (Z) é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{ya}) e este coeficiente controla a taxa de extração no período CER.

Martínez *et al.* (2003) propôs um modelo matemático que pode ser aplicado considerando o extrato como um único pseudocomposto ou como uma mistura de substâncias ou grupos de compostos de estrutura química similar. O acúmulo e a dispersão na fase fluida são negligenciados porque esses fenômenos não têm influência significativa no processo quando comparados aos efeitos de convecção. O modelo proposto foi aplicado para a extração

supercrítica de oleoresina de gengibre. Quando o soluto é considerado como um pseudocomponente, a massa de soluto pode ser descrita conforme a Equação 3.5.

$$m_{\text{ext}}(h = H, t) = \frac{m_0}{\exp(bt_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(bt_m)}{1 + \exp[b(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad \text{Eq. 3.5}$$

Sendo: $m_0 = x_0 m_t$

Onde: m_{ext} é a massa de extrato (g), m_0 é massa inicial total de soluto no leito de extração(g), x_0 é a razão mássica inicial de soluto extraível, m_t é a massa total de sólido na coluna de extração, t é o tempo de extração (s), b e t_m são parâmetros ajustáveis do modelo.

O modelo de difusão, proposto por Crank (1975) apud Reverchon (1997) considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor, considerando-se cada partícula sólida como um corpo quente que perde calor com o tempo para o meio, e supondo que as substâncias a serem extraídas encontram-se uniformemente distribuídas na partícula sólida. Este modelo considera que a transferência de massa se dá unicamente devido a difusão do soluto que está contido no interior das partículas sólidas para a fase supercrítica. A curva de extração é representada pela Equação 3.6.

$$m_{\text{ext}} = m_0 \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D.t}{r^2}\right) \right] \quad \text{Eq. 3.6}$$

Onde: m_{ext} é a massa de extrato (g), m_0 é massa inicial total de soluto no leito de extração(g), D é o coeficiente de difusão, r é o raio da partícula sólida e n é um número inteiro.

O modelo de placa (SSP), proposto por Gaspar *et al.* (2003) também considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor como o modelo de difusão. A diferença entre estes dois modelos é que no modelo SSP as partículas sólidas são consideradas como placa enquanto que no modelo de difusão as partículas são consideradas esféricas.

$$m_{ext} = m_0 \left[1 - \sum_0^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2} \exp\left(\frac{-D_m (2n+1)^2 \pi^2 t}{\delta^2}\right) \right] \quad \text{Eq. 3.7}$$

Onde: m_{ext} é a massa de extrato (g), m_0 é o conteúdo inicial de soluto na fase sólida (g), D_m representa a difusividade na matriz sólida (m^2/min), δ é a espessura das partículas (placas) (m) e n é um número inteiro.

Os modelos apresentados no item 3.6.6 foram utilizados para descrever as curvas de extração supercrítica da própolis do sul do Brasil e a descrição mais detalhada dos modelos encontra-se no Apêndice I.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção estão apresentados os materiais e métodos utilizados nos experimentos de ESC em etapa única e seqüencial, nas extrações convencionais, bem como nas análises de atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, conteúdo de fenólicos totais e perfil químico dos extratos obtidos da própolis proveniente do sul do Brasil. Com exceção da análise de atividade antimicrobiana e do perfil químico dos extratos, todos os experimentos anteriormente citados foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.1. Caracterização da Matéria-Prima

A amostra de própolis utilizada nos experimentos foi fornecida pela empresa Breyer & Cia Ltda de União da Vitória – PR, já na forma pulverizada. Esta própolis é proveniente de diversos apiários localizados na região sul do Brasil, possui coloração marrom e origem botânica variada. A amostra foi acondicionada em embalagens plásticas e armazenada em freezer doméstico a -18 °C.

A caracterização da matéria-prima é fundamental para uma melhor compreensão dos resultados e para a comparação com os trabalhos disponíveis na literatura, principalmente no caso da própolis, cuja composição química é altamente variável.

A caracterização química realizada através de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) utilizando o equipamento da Merk-Hitachi acoplado a detector de rede de diodos, a determinação do conteúdo de flavonóides totais e do conteúdo de ceras (Bankova e Marcucci, 2000) da amostra de própolis utilizada nos experimentos foram realizadas pelo laboratório Natural Labor (Campinas, SP) e os resultados disponibilizados pela empresa fornecedora da matéria-prima. A padronização do diâmetro de partículas e determinação da umidade da amostra de própolis foi realizada no LATESC conforme descrito nos itens 4.1.1 e 4.1.2.

4.1.1. Padronização do Diâmetro de Partículas

O diâmetro das partículas de própolis utilizadas nos experimentos foi padronizado através da utilização de uma série de peneiras do tipo Tyler e com o auxílio do agitador mecânico (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda). A padronização foi realizada em bateladas de 50 g de própolis a qual permaneceu em agitação por 20 minutos. A fração intermediária

-16/+65 mesh foi escolhida para ser utilizada em todas as extrações devido ao maior rendimento desta fração no peneiramento e por proporcionar uma compactação adequada e reprodutível do leito de extração supercrítica conforme explicado no item 5.1.2.



Figura 4.1 – Foto da amostra de própolis pulverizada utilizada nos experimentos.

4.1.2. Determinação de Umidade e Voláteis

A determinação da umidade da própolis foi realizada conforme a metodologia descrita em AOAC (1990), cujo método fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis a 105 °C. Cápsulas de alumínio foram previamente aquecidas em estufa a 105 °C por 1 h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. A amostra de própolis (5 g) foi pesada em cápsula de alumínio e posteriormente aquecida em estufa a 105 °C por 3 h, esfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento da amostra em intervalos de meia hora, até peso constante. A determinação da umidade da amostra de própolis foi realizada em triplicata e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

4.2. Extrações Convencionais

As extrações convencionais foram efetuadas com o objetivo de comparar os resultados obtidos com os da extração supercrítica, em termos de rendimento, atividade antioxidante, conteúdo de fenólicos totais e atividade antimicrobiana. Estas extrações foram realizadas em duplicata e os resultados obtidos foram utilizados também para a seleção do co-solvente a ser utilizado na extração supercrítica.

4.2.1. Extração Soxhlet

As extrações soxhlet (Sox) foram realizadas utilizando diferentes solventes: hexano P.A. (Hex), clorofórmio P.A. (CHCl_3), acetato de etila P.A. (EtAc), etanol P.A. (EtOH) (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) e água destilada (H_2O); com polaridades em ordem crescente de $0,0 < 4,1 < 4,4 < 5,2 < 9,0$ (Byers, 2006), respectivamente. A extração soxhlet da própolis foi realizada conforme o procedimento de Cunha *et al.* (2004).

O sistema soxhlet consiste de um extrator que é acoplado na extremidade inferior a um balão de 250 mL e na extremidade superior a um condensador. Para cada extração, cerca de 5 g de amostra foi pesada e envolvida em papel filtro, formando um cartucho o qual foi inserido no extrator. Foram utilizados 150 mL do solvente selecionado o qual foi acondicionado no balão e aquecido na temperatura de ebulição com uma manta de aquecimento. Com o aquecimento o solvente evapora, sobe pelo braço do extrator, entra no condensador, volta à forma líquida e goteja sobre o cartucho com a amostra. O solvente fica em contato com a amostra extraíndo os compostos solúveis até que o extrator encha na altura do sifão e a mistura solvente/soluto retorne ao balão. O solvente é novamente aquecido, evapora e deixa no balão os compostos extraídos. Este processo de refluxo se repete até que todo o material solúvel presente amostra seja extraído. As extrações foram realizadas em duplicata por um período de 6 h. Os extratos brutos obtidos foram mantidos em freezer a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ para posteriormente passarem pelo processo de eliminação do solvente. A Figura 4.2 apresenta o sistema soxhlet utilizado disponível no LATESC.

4.2.2. Maceração

O processo de maceração (Mac) foi realizado em duplicata, segundo o procedimento descrito por Cunha *et al.* (2004) utilizando etanol P.A. (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) e etanol diluído com água destilada nas concentrações de 50 % v/v (EtH_2O 50%) e 70 % v/v (EtH_2O 70%), baseado nos resultados obtidos por Park e Ikegaki (1998). Foram pesados 10 g de própolis em um balão de fundo chato e a esta mistura foram adicionados 40 mL de solvente. A mistura de própolis e solvente foi mantida ao abrigo da luz por um período de 7 dias, a temperatura ambiente e com agitação manual diária. A separação da amostra e extrato foi realizada através de filtração por gravidade à temperatura ambiente. Os extratos brutos obtidos foram mantidos em refrigerador doméstico a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ para posteriormente passarem pelo processo de eliminação do solvente.

4.2.3. Tratamento dos Extratos e Eliminação dos Solventes

Todos os extratos obtidos através de maceração e extração Soxhlet foram primeiramente filtrados a frio para então serem submetidos ao processo de eliminação do solvente. Os extratos foram mantidos por 24 h em freezer para solidificação da cera. Esta cera foi então separada através de filtração por gravidade, em freezer a -12 °C, a fim de que a cera presente permanecesse sólida. Para cada extrato, duas filtrações foram realizadas de modo que não se observasse mais a presença de cera no extrato.



Figura 4.2 – Foto do sistema Soxhlet.



Figura 4.3 – Foto do rotaevaporador

Após o processo de filtração os extratos foram evaporados em rota-evaporador apresentado na Figura 4.3 (Fisatom, modelo 802) a 70 °C, sob vácuo de -650 mmHg e rotação de 60 rpm. Os extratos secos foram pesados em balança analítica (Ohaus, modelo AS200) e o rendimento calculado em termos de quantidade de própolis utilizada. Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer a -18 °C.

4.3. Caracterização do Leito de Partículas

A caracterização do leito de partículas é fundamental para a compreensão da cinética do processo de extração supercrítica. Parâmetros como o diâmetro das partículas utilizadas na formação do leito, a porosidade do leito e a densidade do sólido influenciam diretamente no processo de extração. A determinação destes parâmetros é necessária para a modelagem das curvas de extração.

Testes de empacotamento do leito de extração foram realizados utilizando diferentes quantidades de própolis (20 e 30 g) e formas de compactação. A forma de empacotamento utilizada em todos os experimentos foi padronizada com 20 g de própolis e completando o volume do extrator com esferas de vidro de 4 mm conforme descrito nos ensaios prévios (item 5.1).

4.3.1. Determinação do Diâmetro Médio de Partículas

A determinação do diâmetro médio de partículas foi efetuada através do agitador mecânico (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda) e de uma série de peneiras Tyler de aberturas 10, 16, 20, 32, 48, 65 e 80 mesh, sendo esta a seqüência de peneiras do topo para o fundo do sistema.

Cerca de 100 g de própolis foi colocada na peneira de maior abertura e o sistema ficou em agitação por 30 min. Posteriormente as frações retidas em cada peneira foram pesadas em balança analítica (OHAUS, modelo AS200) e o diâmetro médio de partículas foi calculado conforme a Equação 4.1 e 4.2 (Gomide, 1983).

$$\bar{D}_s = \sqrt{\frac{\sum_1^n \frac{\Delta \ell_i}{\bar{D}_i}}{\sum_1^n \frac{\Delta \ell_i}{\bar{D}_i^3}}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

$$\Delta \ell_i = \frac{m_i}{M} \quad \text{Eq. 4.2}$$

Onde:

\bar{D}_s = diâmetro médio superficial das partículas (cm)

m_i = massa de amostra retida na peneira i (g)

M = massa total de amostra (g)

\bar{D}_i = diâmetro médio da peneira i (cm)

n = número total de frações

4.3.2. Determinação da Densidade Real e Aparente

A determinação da densidade real (dr) da amostra de própolis foi realizada pelo Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais da Universidade de São Carlos – UFScar/UNESP utilizando o método de picnometria com gás hélio através do equipamento Ultrapycnometer 1000 da Quantachrome.

A densidade aparente (da) foi calculada através da massa de própolis utilizada para a formação do leito e o volume ocupado por esta no extrator (g/cm^3).

4.3.3. Porosidade total do Leito e Partículas

A porosidade total do leito de extração e partículas foi determinada através da densidade real e aparente da amostra de própolis utilizando a Equação 4.3.

$$\varepsilon = 1 - \frac{da}{dr} \quad \text{Eq. 4.3}$$

Onde ε é a porosidade do leito, dr é a densidade real e da a densidade aparente.

4.4. Determinação da Densidade do Solvente

A determinação da densidade do CO_2 supercrítico nas condições de operação utilizadas foi realizada através da equação de Angus *et al.* (1976) baseada em dados experimentais. Estes valores são utilizados para avaliar a influência da temperatura e da pressão na densidade do solvente e conseqüentemente na solubilização do soluto, bem como na modelagem das curvas de extração.

4.5. Extração com CO_2 Supercrítico (ESC)

Antes de iniciar os experimentos de extração supercrítica foram realizados testes preliminares para a determinação da quantidade de própolis a ser utilizada nas extrações, a padronização da forma de empacotamento do leito de partículas e determinação das condições de operação a serem utilizadas conforme explicado no item 5.1.

Os experimentos de extração supercrítica consistiram em experimentos cinéticos (curvas de extração) e de determinação de rendimento global (X_0) os quais foram realizados através do método dinâmico de extração.

O método dinâmico de ESC caracteriza-se pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida. A partir deste método pode-se determinar o rendimento global de extração (X_0) definido como a quantidade percentual de soluto extraível do material sólido para determinadas condições de operação como tempo de extração, vazão do solvente e quantidade de matéria-prima utilizada na extração. Ainda através do método dinâmico podem ser obtidas as curvas de extração que são utilizadas para definir alguns parâmetros de extração como as condições operacionais, a quantidade de matéria-prima para a formação do leito de partículas e o tempo total de extração. Neste caso, o extrato é coletado em diferentes frascos por períodos pré-determinados do processo de ESC.

Os experimentos de rendimento global foram efetuados em duplicata e os extratos obtidos foram utilizados para as análises de atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, conteúdo de fenólicos totais e determinação do perfil químico.

A ESC da própolis com CO_2 puro foi realizada de duas formas: extração em etapa única (ESC-U) e extração seqüencial em duas etapas (ESC-S). A extração supercrítica em etapa única consistiu em utilizar uma condição fixa de pressão, temperatura e vazão durante todo o processo de extração. A extração supercrítica com adição de co-solvente também foi realizada em etapa única (ESC-Uco) conforme descrito no item 4.5.3. Já na extração seqüencial, a temperatura e a vazão foram fixadas e duas condições crescentes de pressão foram utilizadas para a mesma matriz de própolis obtendo assim duas frações. Os resultados de rendimento e atividade antioxidante dos extratos obtidos através de ESC em etapa única foram avaliados para a seleção das condições de operação como temperatura, pressão e tempo de extração a serem utilizadas em cada etapa da ESC seqüencial.

Para a realização destas extrações o LATESC dispõe de dois equipamentos de extração supercrítica. O equipamento de ESC 1 opera a uma pressão máxima de 230 bar e vazões de 0,5 g/min a 5 g/min. Este equipamento de extração foi utilizado na realização dos testes preliminares, determinação do X_0 e curvas de extração para as extrações em etapa única na vazão de $3,0 \pm 0,2$ g/min.

O equipamento de ESC 2 opera a uma pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente de 1,6 g/min a 41,6 g/min. Neste equipamento foram realizados os ensaios de obtenção de X_0 das extrações seqüenciais em duas etapas, da ESC em etapa única para a

condição de pressão de 250 bar e da ESC em etapa única com emprego de co-solvente, bem como as curvas de extração na vazão de $5,0 \pm 0,2$ g/min.

As condições operacionais utilizadas nas ESC da própolis foram selecionadas visando abranger uma ampla faixa de condições de densidade de solvente, buscando evitar a degradação de compostos termossensíveis e levando em conta os limites de operação dos equipamentos utilizados.

4.5.1. Equipamento de Extração Supercrítica 1 (ESC 1)

O equipamento ESC 1 é constituído de um cilindro de CO₂ com tubo pescador (R) o qual alimenta um tanque pulmão (P) de aço inox de 200 cm³ encamisado com PVC (Suprilab, Campinas, SP) através de uma válvula de três vias (Hoke, modelo 7165G4Y). Este tanque é resfriado através de um banho termostático (TC) (Microquímica, modelo MQBTZ99-20) cuja temperatura é programada para 1°C com o objetivo de garantir o estado líquido do solvente antes da sua entrada na bomba (B) (Thermo Separation Products, modelo 3200). O tanque pulmão ainda possui um manômetro (PI2) para o controle da pressão com precisão de 0,5% (IOPE, modelo 01221-40-2). Através de uma válvula globo (Whitey, modelo SS-43S4) é possível a passagem do solvente para bomba que opera no modo de pressão constante fornecendo uma vazão de solvente adequada, normalmente entre 0,63 a 3,78 g/min. A tubulação que liga a bomba ao extrator é mantida submersa em um banho termostático (TC) (Microquímica, modelo MQBTZ99-20) programado para manter constante a temperatura de operação do sistema. Este banho também é responsável por manter constante a temperatura do extrator (E). Na entrada do extrator encontra-se acoplado um manômetro (PI3) (Header, modelo H-11), onde a pressão de extração é monitorada. O extrator (Suprilab) consiste de um cilindro de aço inoxidável encamisado de 40 cm de comprimento, 2,1 cm de diâmetro interno, volume de 138,5 ml e extremidades rosqueadas, onde é formado o leito fixo de partículas. Na saída do extrator é conectada uma válvula agulha micrométrica (VM) (Swagelok, modelo SS-31RS4), onde ocorre a despressurização da mistura soluto/solvente, e sua conseqüente separação. A VM é aquecida com uma fita de aquecimento (Fisatom, modelo 5), sendo que o seu controle de temperatura é feito através de um potenciômetro (Quimis, modelo Q-323.2). Posteriormente à válvula micrométrica o extrato obtido é coletado em frascos de vidro âmbar (C) e, após o ponto de coleta, encontra-se conectado um bolhometro (BL) onde são realizadas as leituras de vazão de solvente (LATESC, UFSC), mediante o deslocamento de coluna de

líquido, conforme descrito por JOCHMANN (2000). A Figura 4.4 apresenta a foto do equipamento ESC 1 e a Figura 4.5 o diagrama esquemático referente ao mesmo equipamento.



Figura 4.4 – Foto do equipamento ESC 1 disponível no LATESC.

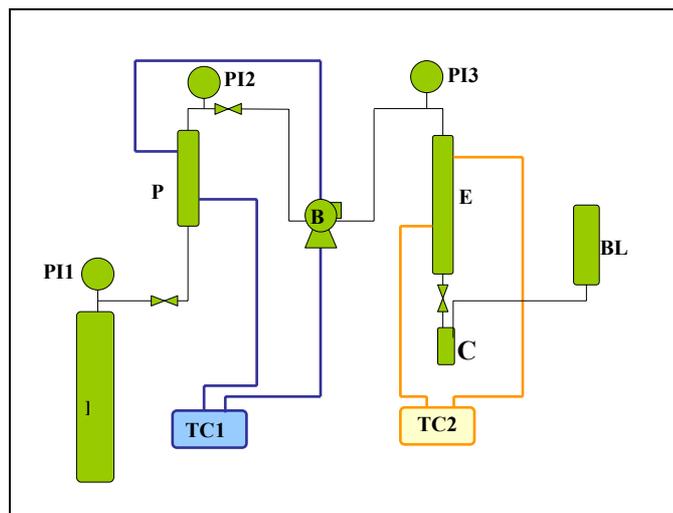


Figura 4.5 – Diagrama esquemático referente ao equipamento ESC 1.

Onde: R – Reservatório de CO₂

B – Bomba

C – Frasco de vidro âmbar

TC1 – Banho termostático 1

PI1 – Manômetro de controle do cilindro de CO₂

PI2 – Manômetro de controle do tanque pulmão

PI3 – Manômetro de controle do extrator

P – Tanque pulmão

E – Extrator

BL – Bolhometro

TC2 – Banho termostático 2

4.5.2. Equipamento de Extração Supercrítica 2 (ESC 2)

O equipamento ESC 2 foi projetado e construído na Alemanha, na Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH), no Laboratório ‘Thermische Verfahrenstechnik’ e doada para o LATESC. Consiste de um cilindro de CO₂ com 99.9% de pureza (White Martins, Brasil) equipado com vara pescadora que alimenta diretamente a linha de extração. O CO₂ segue para um banho termostático (BT1) (Thermo Haake, C10-K10) com temperatura programada para 1 °C. A solução de etileno glicol proveniente do banho termostático (BT1) circula em uma mangueira a qual envolve a bomba (1) (Maximator M111) garantindo que o CO₂ se mantenha no estado líquido. A bomba trabalha alimentada por ar comprimido filtrado mantido na pressão de 5 bar. A válvula globo (V1) (Tescom Cat n°26-1761-24-161) é utilizada para regular a pressão de operação. O extrator (E) consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 31,60 cm de comprimento, 1,02 cm de raio, volume de 103,28 ml e extremidades rosqueadas. A linha que liga a bomba ao extrator bem como a linha após o extrator é mantida submersa em um banho termostático (BT2) (Microquímica, modelo MQBTZ99-20) programado para manter a temperatura constante em 65 °C, de modo a evitar o congelamento da válvula micrométrica (V4). No início do processo de extração a válvula (V2) é mantida fechada e após a pressurização do solvente esta é aberta para permitir a passagem do CO₂ para o extrator. A temperatura do extrator é mantida constante na temperatura de extração desejada através de um banho termostático (BT3) (Thermo Haake, DC30-B30). Na saída do extrator é conectada uma válvula micrométrica (V4) para coleta de amostra. A válvula (V3) também conectada na saída do extrator auxilia a (V4) na despressurização do solvente. O rotâmetro (2) (ABB Automation Products 10 A 61) permite o controle do fluxo de solvente de 1,67 g/min a 41,67 g/min. O soluto é coletado em frascos âmbar (3) conectados após a (V4). A Figura 4.6 mostra a foto do equipamento ESC 2 e a Figura 4.7 o diagrama esquemático referente ao mesmo equipamento.

Para a utilização de co-solvente junto ao CO₂ supercrítico foi necessário acoplar ao equipamento ESC 2 uma bomba de co-solvente (BC) conforme mostra a Figura 4.7. Uma válvula de retenção (VR) foi colocada na saída da bomba de co-solvente de modo a evitar o retorno do solvente orgânico devido à pressão de extração. A bomba de co-solvente opera numa faixa de vazão de solvente de 0,1 a 10 mL/min.



Figura 4.6 – Foto do equipamento ESC 2 disponível no LATESC

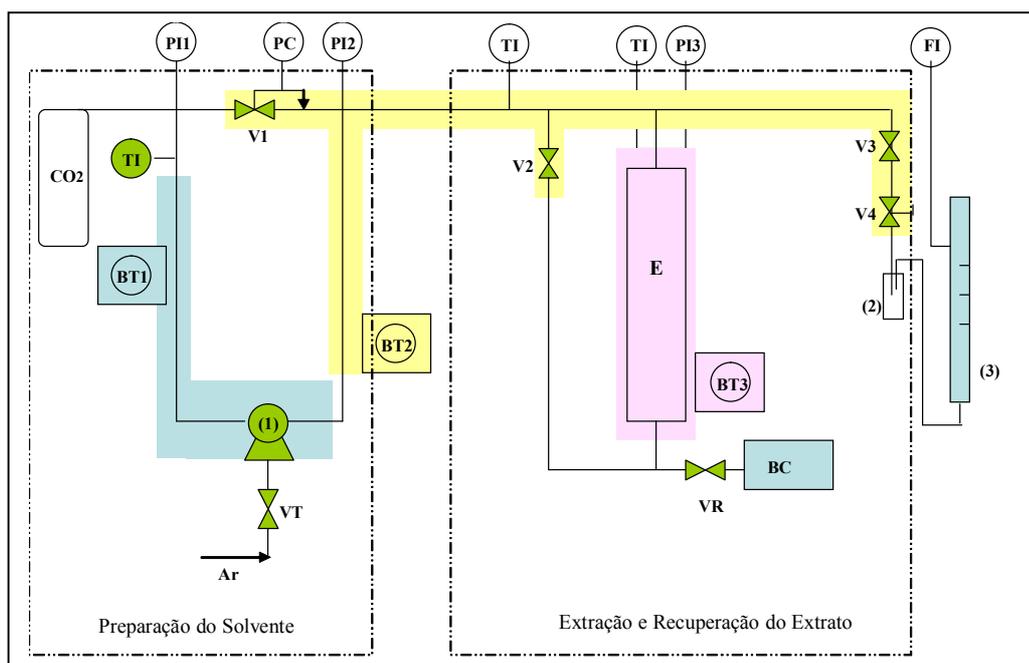


Figura 4.7 – Diagrama esquemático referente ao equipamento ESC 2.

Onde:

E – Extrator

VT – Válvula de controle da frequência da bomba

V1 – Válvula reguladora de pressão

V2 – Válvula da entrada do extrator (Maximator Cat N^o 3710.0104)

V3 – Válvula da saída do extrator (Sitec Shutoff valve 710.3010)

V4 – Válvula micrométrica (Sitec Microvalve 710.3012)

PI1 – Manômetro de controle do cilindro (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10)

PI2 – Manômetro de controle da bomba (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10)

PI3 – Manômetro de controle do extrator (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10)

TI – Controladores de temperatura

VR - Válvula de retenção da bomba de co-solvente

BC – Bomba de co-solvente

4.5.3. Experimentos de Rendimento Global (X_0)

Os experimentos de rendimento global para a ESC-U com CO₂ puro foram realizados no equipamento de ESC 1 através da coleta do material extraído em um único frasco âmbar previamente pesado, por um período de 5 h de extração para as condições de temperatura de 30, 40 e 50 °C, pressões de 100, 150 e 200 bar e vazão fixa de $3,0 \pm 0,2$ g/min. Estes experimentos seguiram um projeto fatorial completo 3² de dois fatores (pressão e temperatura) variados em três níveis e com uma replicação, conforme explicado no item 4.9. O tempo de extração foi definido através da observação da curva de extração obtida a 200 bar, 40 °C e vazão de solvente de 3 g/min conforme explicado no item 5.1, sendo fixado em 5 h o que totaliza um consumo de 900 g de CO₂. Como pode ser observado na Figura 5.2 do item 5.1, em 5 h a extração já alcança a etapa de taxa decrescente (FER).

Com base nos resultados de X_0 obtidos para o projeto fatorial 3² e devido a limitação de pressão do equipamento ESC 1, o experimento de ESC-U com CO₂ puro a 250 bar foi realizado na temperatura de 40 °C utilizando o equipamento de ESC 2, na vazão de $5,0 \pm 0,2$ g/min por um período de 3 h, totalizando um consumo de 900 g de CO₂.

Os frascos com os extratos obtidos foram pesados em balança analítica e armazenados em refrigerador doméstico a -18 °C. O rendimento global (X_0) foi calculado através da razão entre a massa de extrato (M_{extrato}) obtida e a massa de própolis ($M_{\text{própolis}}$) utilizada para formar o leite conforme a Equação 4.4.

$$X_0 = \frac{M_{\text{extrato}}}{M_{\text{própolis}}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.4}$$

Os experimentos de X_0 para a extração supercrítica com co-solvente foram realizados aleatoriamente, no equipamento ESC 2 para condições fixas de pressão de 150 bar,

temperatura de 40 °C e vazão de $5,0 \pm 0,2$ g/min por um período de 3 h de extração. O solvente utilizado foi etanol absoluto nas concentrações de 2, 5 e 7 % (m/m) em relação à massa total de CO₂ consumida de 900 g que correspondem aos volumes de 23, 57 e 80 mL de etanol, respectivamente. As concentrações de etanol utilizadas foram selecionadas visando a utilização de baixos volumes de etanol. Os extratos obtidos foram evaporados em rotaevaporador (Fisatom, modelo 802) e pesados em balança analítica para a determinação do rendimento global através da Equação 4.4.

Na extração supercrítica seqüencial a mesma matriz de própolis foi extraída com duas diferentes condições de operação. A primeira etapa da ESC-S foi realizada em condições amenas de pressão, 100 e 150 bar com temperatura fixa de 40 °C e vazão de CO₂ de $5,0 \pm 0,2$ g/min por um período de 2 h, tempo suficiente para alcançar a etapa FER. A primeira etapa da ESC-S visa a extração de compostos constituintes da cera e do óleo essencial presente na própolis. Na segunda etapa da ESC-S da própolis as pressões utilizadas foram de 250 e 300 bar, por um período de 3 h de extração visando a obtenção de compostos com atividade antioxidante como os ácidos fenólicos e flavonóides. Entre uma etapa e outra a extração foi interrompida por cerca de dois minutos, tempo necessário para o equipamento alcançar a pressão desejada e dar continuidade à extração. Para a coleta dos extratos foram utilizados dois frascos âmbar previamente pesados em balança analítica, um para a primeira etapa e outro para a segunda. Após a extração os frascos foram novamente pesados e o rendimento para cada etapa determinado através da Equação 4.4.

Todos os experimentos de determinação de X_0 da ESC da própolis foram realizados em duplicata e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os extratos obtidos nas extrações de rendimento global foram utilizados para todas as análises referentes à determinação de atividade biológica dos extratos.

4.5.4. Experimentos Cinéticos – Curvas de Extração

Os experimentos cinéticos para a obtenção das curvas de extração da própolis consistiram na determinação da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração. Para a determinação das curvas de extração foram utilizados frascos de coleta previamente pesados em balança analítica e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos em tempos pré-determinados de 10, 15 ou 30 minutos. Após a coleta os frascos são novamente pesados para se obter a massa de extrato em função do tempo de extração. As curvas de extração podem ser construídas através da massa de extrato acumulado em função do tempo

de extração ou da massa de CO₂ consumido; ou ainda pela razão massa de extrato/ massa de sólido versus a massa de CO₂ consumida pela massa de sólido.

Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO₂ puro nas condições de pressão 100, 150, 200 e 250 bar; temperaturas de 30, 40 e 50 °C e vazões de $3,0 \pm 0,2$ e $5,0 \pm 0,2$ g/min para a ESC em etapa única.

Na extração supercrítica seqüencial a mesma matriz de própolis foi extraída com CO₂ puro em duas diferentes condições de operação. Como nos experimentos de X₀ a primeira etapa da extração seqüencial foi realizada em duas condições 100 e 150 bar, com temperatura fixa de 40 °C e vazão de CO₂ de $5,0 \pm 0,2$ g/min por um período de 2 h. Na segunda etapa foram mantidas as condições de temperatura e vazão iguais a da primeira etapa e as pressões utilizadas foram de 250 e 300 bar.

4.6. Determinação da Atividade Antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos extratos de própolis foi realizada no LATESC através do método do radical livre DPPH (1,1- difenil-2- picrilhidrazil), conforme descrito por Mensor *et al.* (2001) e Kitzberger *et al.* (2007).

O DPPH é um radical livre, estável à temperatura ambiente, que apresenta coloração violeta em solução etanólica e tem sua absorção máxima em 517 nm. Na presença de uma molécula antioxidante recebe um elétron ou um radical hidrogênio, o que resulta em uma descoloração da solução etanólica e da absorbância (MENSOR *et al.* 2001). A Figura 4.8 mostra uma foto dos frascos contendo os produtos de reação durante a análise de atividade antioxidante através do método de DPPH.



Figura 4.8 - Foto dos frascos contendo os produtos de reação durante a análise de atividade antioxidante através do método de DPPH.

A determinação da atividade antioxidante através do método de DPPH foi realizada em triplicata e consistiu no preparo de uma solução estoque do extrato de própolis a ser analisado na concentração de 1,0 mg/mL. Para cada extrato, cerca de 10 mL de solução estoque e 25 mL de solução 0,3 mM de DPPH• (Sigma-Aldrich) foram preparadas com etanol P.A (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) e deixadas em banho de ultra-som (Thornton Unique modelo USC1450) por 5 minutos. A solução estoque foi diluída em etanol P.A. em concentrações finais de 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/ml. Em tubos de ensaio adicionou-se 1 mL de solução etanólica de DPPH 0,3 mM às diferentes concentrações da amostra obtendo um volume final de 3,5 mL e estas foram deixadas reagir em temperatura ambiente por 30 minutos (MENSOR *et al.*, 2001). A absorbância foi então medida a 517 nm no espectrofotômetro UV-VIS (Genesys 10Vis) no departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Quanto maior a atividade antioxidante da amostra testada, mais estável o radical DPPH vai se tornar, provocando a descoloração da solução (DPPH e extrato) e diminuindo a absorbância. A Figura 4.9 apresenta um esquema da análise de atividade antioxidante através do método de DPPH.

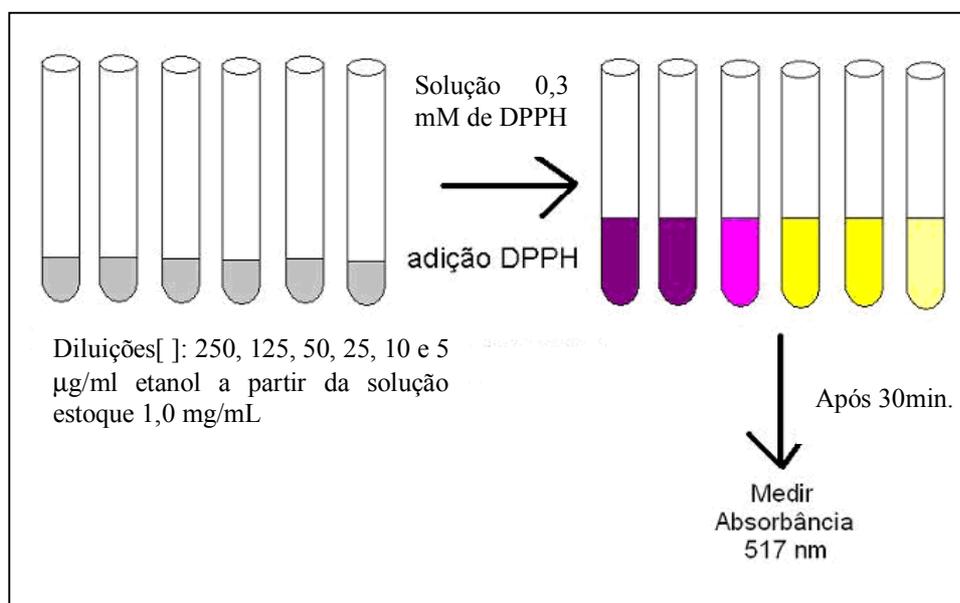


Figura 4.9 – Esquema da determinação da atividade antioxidante através do método DPPH.

A conversão da absorbância em atividade antioxidante (AA) foi realizada através da Equação 4.5. Os resultados de atividade antioxidante são frequentemente expressos em termos de EC₅₀ que significa a concentração mínima de extrato capaz de fornecer 50 % de atividade antioxidante. Para os extratos que alcançaram 50 % de atividade antioxidante nas

concentrações testadas a EC_{50} foi calculada por análise de regressão polinomial e linear, e foram expressas em média \pm desvio padrão.

$$AA\% = 100 - \left\{ \left[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 \right] / Abs_{DPPH} \right\} \quad \text{Eq. 4.5.}$$

4.7. Determinação do Teor de Fenólicos Totais

A determinação do conteúdo total de fenólicos foi realizada no LATESC através do método de Folin-Ciocalteu descrito por Peschel *et al.* (2005). O método de Folin-Ciocalteu está associado ao aparecimento da coloração azul devido a oxidação dos fenólicos em meio básico (PESCHEL *et al.*, 2005). O método de Folin Ciocalteu é amplamente utilizado na avaliação de amostras de própolis já que esta contém muitos tipos de fenólicos (KUMAZAWA *et al.*, 2004). A vantagem deste método é que o resultado está associado ao aparecimento de absorvância. O procedimento associado com o aparecimento de produtos coloridos é mais sensível. Embora não deva caracterizar a atividade antioxidante, este método é um dos melhores para uma estimativa da atividade antioxidante de amostras de alimentos (ROGINSK e LISSI, 2005).

O método de Folin-Ciocalteu é o método mais antigo para a determinação do conteúdo total de fenólicos, então chamados fenóis totais. O sistema de teste é a mistura de tungstato e molibdato em meio altamente básico (Na_2CO_3 aquoso 5-10 %). Os fenólicos são energeticamente oxidados em meio básico resultando na formação do radical superóxido O_2^- , o qual por sua vez, reage com molibdato formando óxido de molibdênio, MoO_4^+ que possui uma absorvância muito intensa próximo a 750 nm. Geralmente os fenólicos determinados pelo teste Folin-Ciocalteu são mais frequentemente expressos em equivalentes em ácido gálico (EAG) (ROGINSK e LISSI, 2005).

Para a construção da curva padrão de ácido gálico foi preparada uma solução estoque de 0,005 g/mL de ácido gálico (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) em água destilada. Esta solução foi diluída em balões volumétricos de 100 mL para a obtenção de soluções com concentrações finais de 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg ácido gálico/L de água destilada. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL transferindo para estes 100 μ L de cada diluição aos quais foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu (Fluka). Após 30 segundos do início da reação e antes de completar 8

minutos foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato sódico (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) a 20 % (m/v). Os balões foram agitados e o volume de 10 mL completado com água destilada. As soluções foram deixadas em repouso ao abrigo da luz e temperatura ambiente por duas horas. A absorbância de cada solução foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (Genesys 10Vis) e o branco realizado com água destilada. A curva padrão de ácido gálico foi apresentada através do gráfico de absorbância versus concentração de ácido gálico (mg/L). A Figura 4.10 apresenta o esquema do método de Folin-Ciocalteu.

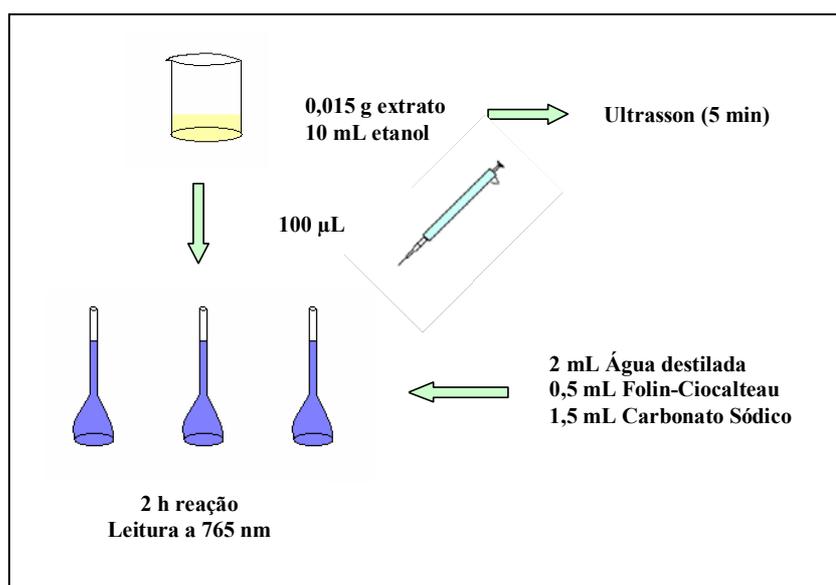


Figura 4.10 - Esquema do método de Folin-Ciocalteu.

Cada extrato foi diluído em etanol P.A. (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) na concentração final de 1500 mg/L e seguiu o mesmo procedimento de reação de oxidação descrita para a curva padrão. Os valores de absorbância obtidos para os extratos de própolis foram correlacionados com a curva padrão de ácido gálico e o conteúdo de fenólicos totais determinado através da Equação 4.6. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em mg EAG/g de extrato, como média \pm desvio padrão.

$$\text{Fenólicos Totais (mg EAG/g}_{\text{ext}}) = \{[\text{EAG} \times 1000] / D_{\text{extratos}}\} \quad \text{Eq. 4.6}$$

Onde: EAG: Equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão (mg EAG/L)

D.: Diluição das amostras (mg_{ext}/L)

4.8. Determinação da Atividade Antimicrobiana

As análises de atividade antimicrobiana foram realizadas no Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos através das diferentes técnicas de extração foi determinada segundo Smânia *et al* (1995) e Kitzberger *et al.* (2007). Como um teste inicial de triagem foi aplicado o método qualitativo de difusão em ágar o qual testa se o extrato inibe ou não o crescimento do microrganismo de interesse. Os extratos que apresentaram os melhores resultados para o teste de difusão foram submetidos ao método de diluição em caldo de cultivo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB). Os microrganismos testados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positivo), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (Gram positivo formador de esporo) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negativo).

4.8.1. Método de Difusão em Ágar

As culturas de interesse foram inicialmente incubadas a 36 °C por 18 horas e então diluídas em caldo de cultivo na concentração final de 0,5 da escala Mac Farland (10^8 UFC/mL). A pureza das cepas foi comprovada em ágar sangue. O método de difusão em ágar consistiu em inocular os microrganismos de interesse utilizando “swabs” de algodão na superfície de placas com ágar Mueller-Hinton. A Figura 4.11 apresenta o esquema do método de difusão em ágar.

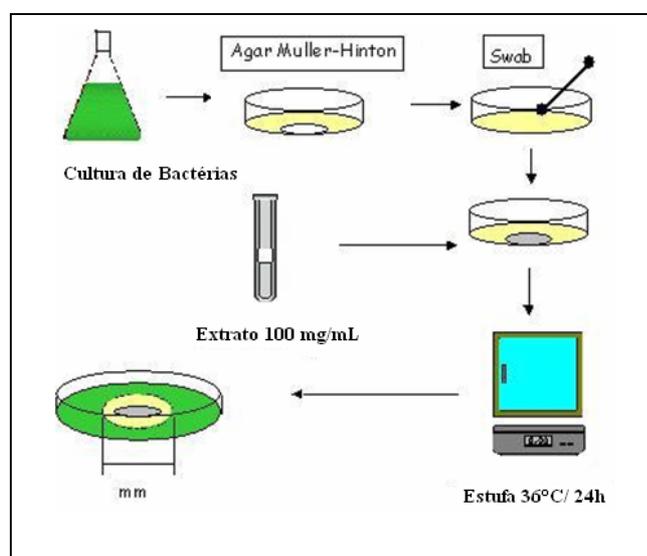


Figura 4.11 – Esquema do método de difusão em ágar.

As placas foram previamente perfuradas com 5 orifícios assépticos de 7 mm de diâmetro em cada placa e após a inoculação dos microrganismos os furos foram preenchidos com 50 μL de extratos de própolis na concentração de 100 mg/mL de DMSO (dimetilsulfóxido). As placas foram incubadas a 36 °C por 24 h e então examinada a inibição das linhagens indicadoras. O halo de inibição foi medido sendo que, uma zona de inibição de 9 mm ou mais em diâmetro de crescimento inibido das linhagens testadas representa um resultado positivo.

4.8.2. Método de Microdiluição em Caldo de Cultivo

Os extratos que apresentaram os maiores halos de inibição foram submetidos ao método de microdiluição em caldo de cultivo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB). Os extratos de própolis foram diluídos na proporção de 4 mg de extrato em 400 μL de DMSO e 1600 μL de caldo Muller-Hinton. A partir desta solução, utilizando placas de microdiluição, foram preparadas diluições seriadas com concentrações variando de 2,0 a 0,0156 mg/mL, as quais foram distribuídas no volume final de 200 μL nos orifícios das placas. Como controle de crescimento foi utilizado o caldo Muller-Hinton e o controle de esterilidade a mistura de extrato e caldo Muller-Hinton. Em cada orifício teste e de controle de crescimento foram adicionados 5 μL de inóculo bacteriano. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas incubadas por 24 h a 36 °C. Após a incubação, cada diluição foi inoculada em placas de ágar sangue para determinar a CMB. Para a determinação da CMI a leitura das placas foi realizada utilizando um revelador de crescimento microbiano, o iodonitrotetrazolium chloride (Sigma-Aldrich). A CMI é a menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento do microrganismo e a CMB é a menor concentração de extrato capaz não só de inibir o crescimento mas também de inativar o microrganismo após a incubação, sendo que ambos os resultados são expressos em mg/mL (SMÂNIA, 2003; VIEIRA, 2003).

4.9. Análise Estatística

Os resultados de rendimento obtidos na ESC-U com CO₂ puro, na ESC-U utilizando co-solvente, na segunda etapa da ESC seqüencial e nas extrações convencionais da própolis foram avaliados separadamente através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância com o auxílio do software STATISTICA 6.0. Os experimentos de ESC em etapa única com CO₂ puro seguiram um planejamento fatorial completo de dois fatores (T e P) e

três níveis (30, 40, 50 °C e 100, 150, 250 bar) com uma replicação. A ANOVA para os rendimentos obtidos através de ESC com diferentes concentrações de co-solvente foi realizada considerando estes como experimentos de fator único (concentração de co-solvente) com uma replicação. Para os rendimentos obtidos através das extrações convencionais e na segunda etapa da ESC seqüencial a ANOVA foi realizada considerando o tipo de extração como fator único. Se, segundo a ANOVA existe diferença significativa ao nível de 5 % de significância entre as médias dos tratamentos (tipo ou condição de extração) pode-se dar continuidade à análise aplicando o teste de Tukey o qual avalia as diferenças entre os pares de tratamentos. Sendo assim, o teste de Tukey foi aplicado para verificar quais tratamentos diferem entre si, através da avaliação de pares das médias dos rendimentos obtidos.

4.10. Determinação do Perfil Químico

O perfil químico da amostra de própolis e dos extratos selecionados foi determinado pelo laboratório Natural Labor (Campinas-SP).

Aproximadamente 50 mg da amostra foi solubilizada em 5 mL de metanol (Merck) a quente, filtrada em papel de filtro e passada por um filtro Millipore para posterior análise.

As amostras foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em equipamento Merck-Hitachi modelo D-7100 com rede de fotodiodos e injetor automático. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna em fase reversa Lichrochart 100 RP-18 (12,5 x 0,4 cm, diâmetro de partícula de 5 µm) (Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando-se como fase móvel água-ácido fórmico (Merck) (95:5, solvente A) e metanol (solvente B) (Grau cromatográfico, Merck). A eluição foi desenvolvida em um fluxo de 1 mL/min utilizando-se um gradiente linear. O tempo máximo de análise foi de 50 minutos e a detecção foi efetuada em comprimentos de onda de 280 e 340 nm. O programa utilizado para a análise de dados foi o Merck-Hitachi modelo D-7000 (Chromatography Data Station - DAD Manager) e a quantificação das amostras no programa TIP®.

4.11. Modelagem Matemática

A modelagem das curvas de extração foi realizada utilizando os modelos apresentados por Sovová (1994), Martinez *et al.* (2003), Crank (1975) apud Reverchon (1997) e Gaspar *et al.* (2003) através do programa Mass Transfer desenvolvido por Correia *et al.* (2006) disponível no LATESC.

O pacote estatístico SAS for Windows – versão 8.5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) foi utilizado para determinar os parâmetros t_{CER} , M_{CER} e Y_{CER} necessários para a utilização do modelo de Sovová (1994) conforme apresentado no Apêndice III. Este programa faz o ajuste simultâneo de duas retas à curva de extração obtida através da massa acumulada de soluto versus o tempo de extração. O ponto de intersecção das duas retas determina t_{CER} que é o tempo de duração da etapa de taxa constante de extração. A taxa de extração da etapa CER, o parâmetro M_{CER} , é obtida pelo ajuste de uma reta tangente à etapa de taxa constante de extração. A partir do valor de M_{CER} pode-se obter o valor de Y_{CER} que é a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER através da Equação 4.7.

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq. 4.7}$$

A solubilidade (Y^*), que pode ser representada pela inclinação da curva de extração na etapa de taxa constante de extração (CER) desde que o equilíbrio entre as fases sólida e fluida seja garantido, foi determinada experimentalmente através do método dinâmico de extração. Para vazões suficientemente baixas o equilíbrio de fases é alcançado assumindo-se assim que o solvente esteja saturado com soluto na saída do extrator. Danielski (2002) definiu a faixa de 0,9 g_{CO2}/min à 1,2 g_{CO2}/min como adequada para a determinação da solubilidade de oleoresinas em CO₂ supercrítico, garantindo assim o tempo de contato entre as fases, necessário para alcançar o equilíbrio. A curva de solubilidade foi realizada a 200 bar, 40 °C e vazão de 1,08 g/min e construída através da massa de soluto acumulado versus massa de CO₂ consumido. O ajuste de duas retas a esta curva foi realizado e a solubilidade do extrato de própolis em CO₂ supercrítico foi determinada a partir da inclinação da reta ajustada no período de taxa constante de extração (CER) conforme mostra o Apêndice IV. Se a vazão de CO₂ é adequada, esta inclinação corresponde ao valor de Y_{CER} e é equivalente ao valor de Y^* , para a condição de temperatura e pressão específica quando o solvente está saturado com o soluto. O dado obtido com este procedimento foi considerado apenas na aplicação do modelo de Sovová (1994) para o ajuste das curvas de extração supercrítica da própolis.

4.12. Resumo dos Ensaios

O Quadro 4.1 apresenta o resumo dos ensaios realizados para o estudo dos diferentes extratos obtidos da própolis do sul do Brasil que inclui desde a caracterização da matéria-prima, as diversas técnicas de obtenção dos extratos e as análises realizadas para cada extrato.

Quadro 4.1 – Resumo dos Ensaio realizados com a própolis do sul do Brasil.

Condições de Extração	Análises				Tratamentos		
	A.Antiox.	A.Antimic.	Cont. Fenólicos	Perfil Químico	X ₀	Modelagem	ANOVA X ₀
Extração Soxhlet							
Sox-EtOH	X	X	X		X		X
Sox-EtAc	X	X	X		X		X
Sox-CHCl ₃	X	X	X		X		X
Sox-Hex	X	X	X		X		X
Sox-H ₂ O	X	X	X		X		X
Maceração							
Mac-EtOH	X	X	X		X		X
Mac-EtH ₂ O 70%	X	X	X		X		X
Mac-EtH ₂ O 50%	X	X	X		X		X
ESC-U							
[P(bar)/T(°C)/Q _{CO₂} (g/min)]							
100/30/3	X	X	X		X		X
100/40/3	X	X	X	X	X		X
100/50/3	X	X	X		X	X	X
150/30/3	X	X	X		X		X
150/40/3	X	X	X		X	X	X
150/50/3	X	X	X		X		X
200/30/3	X	X	X		X		X
200/40/3	X	X	X		X		X
200/50/3	X	X	X		X		X
250/40/5	X	X	X		X		X
ESC-Uco							
[P(bar)/T(°C)/co(%)]							
150/40/2	X	X	X		X		X
150/40/5	X	X	X	X	X		X
150/40/7	X	X	X		X		X
ESC-S							
[P(bar)/T(°C)/etapa]							
100/40/1		X			X	X	
250/40/2	X	X	X		X	X	X
150/40/1		X			X		
250/40/2	X	X	X		X		X
100/40/1		X			X		
300/40/2	X	X	X		X		X

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho com a extração da própolis do Sul do Brasil e expostos na forma de artigos. O item 5.1 apresenta os ensaios prévios realizados para definir as condições de extração utilizadas para a própolis incluindo a caracterização da matéria-prima e os testes preliminares de ESC.

O item 5.2 apresenta o artigo 1 intitulado “Avaliação dos extratos de própolis obtidos com diferentes técnicas de extração em termos de rendimento global”. Neste item são apresentados os resultados de rendimento para os extratos de própolis obtidos através de extrações convencionais, ESC-U com CO₂ puro, ESC seqüencial e ESC-U com o emprego de diferentes concentrações de etanol como co-solvente.

A avaliação da atividade antioxidante, o conteúdo de fenólicos e o perfil químico dos extratos de própolis obtidos com diferentes técnicas de extração são apresentados no Artigo 2 (item 5.3). O item 5.4 apresenta o Artigo 3 que trata da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis obtidos com diferentes técnicas de extração. O Artigo 4 apresenta a modelagem matemática das curvas de extração supercrítica da própolis.

5.1. Ensaio Prévios

Os ensaios prévios foram realizados para caracterizar a própolis utilizada como matéria-prima no presente estudo e definir alguns parâmetros do processo de ESC como o tamanho das partículas e quantidade de própolis a ser utilizada para a formação do leito de extração, tempo de extração e a avaliação da utilização do tempo estático.

5.1.1. Caracterização da Matéria-Prima

O conteúdo de ceras e flavonóides presente na amostra de própolis utilizada neste trabalho foi determinado pelo laboratório Natural Labor (item 4.10) e apresentada na forma de laudo pela empresa fornecedora da matéria-prima conforme mencionado no item 4.1. A Tabela 5.1 apresenta os valores do conteúdo de ceras e flavonóides totais da própolis bem como o teor de umidade determinado no LATESC segundo o item 4.1.2.

Tabela 5.1. Características físico-químicas da própolis.

Análise	Resultado % (m/m)
Umidade e voláteis	6,0 ± 0,1
Cera	16,10
Flavonóides totais ^(a)	0,7 ± 0,1

(a) expresso em quercetina.

O regulamento técnico de identidade e qualidade da própolis do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Brasil, 2001) define alguns requisitos mínimos de qualidade a que deve atender a própolis como: teor máximo de cera 25 % (m/m), teor mínimo de flavonóides 0,5 % (m/m) e umidade máxima de 8 % (m/m). Como pode ser observado na Tabela 5.1 a própolis utilizada está de acordo com o regulamento citado. Ainda segundo o mesmo regulamento técnico a própolis é classificada quanto ao teor de flavonóides em: (a) baixo teor: até 1,0 % (m/m); (b) médio teor: >1,0 – 2,0 % (m/m) e (c) alto teor: > 2,0 % (m/m). Sendo assim, a própolis utilizada no presente trabalho é uma própolis de baixo teor de flavonóides (Tabela 5.1).

A Tabela 5.2 apresenta o resultado do perfil químico da própolis utilizada nos experimentos que foi realizada pelo laboratório Natural Labor conforme descrito no item 4.10.

Tabela 5.2 – Perfil químico da própolis determinado através de CLAE.

Nº	Composto ^(a)		mg/g
1	2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano	-	2,98
2	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)	P	7,57
3	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 1)	P	0,14
4	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 2)	P	0,04
5	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 3)	P	0,34
6	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 4)	P	0,25
7	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 5)	P	1,27
8	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 6)	P	0,09
9	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 7)	P	0,34
10	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 8)	P	0,12
11	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 9)	P	0,21
12	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 10)	P	0,25
13	Ácido 3-prenil-4-diidrocinamoil-oxi-cinâmico	-	0,10
14	Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	P	1,85
15	Ácido 6-propenóico-2-2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano	-	1,03
16	Ácido cafeico	P	0,19
17	Ácido cafeoilquínico 1	-	0,49
18	Ácido cafeoilquínico 2	-	2,35
19	Ácido cafeoilquínico 3	-	0,27
20	Ácido cinâmico (derivado 1)	-	0,52
21	Ácido cinâmico (derivado 2)	-	0,29
22	Ácido cinâmico (derivado 3)	-	0,90
23	Ácido p-cumárico	P	5,14
24	Canferide	P/F	2,71
25	Canferol	P/F	0,13
	Total (mg/g)		29,55
	Total (%)		3,00

Onde : ^(a) Resultados expressos em miligramas do composto por grama de própolis.

P - composto fenólico

F - flavonóide

Pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de classificar a própolis brasileira seja por sua origem química ou através de marcadores químicos (compostos químicos específicos). A classificação é essencial para a validação das pesquisas realizadas com própolis visto que se trata de uma matéria-prima extremamente variável o que torna difícil a correlação dos resultados disponíveis na literatura. Através da técnica de CLAE e quantificação dos compostos identificados pela mesma, Marcucci (2006) estabeleceu uma tipificação para a própolis brasileira, baseando-se na presença de marcadores químicos. Segundo a classificação de Marcucci (2006) e utilizando o perfil químico apresentado na Tabela 5.2, o laboratório Natural Labor classificou a própolis utilizada no presente trabalho

como BRP (PR). A própolis BRP (PR) apresenta os compostos DCBEN (2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano), DPB (ácido 6-propenóico-2-2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano) e PHCA (ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico) como marcadores principais (MARCUCCI, 2006).

Segundo a Tabela 5.2 a própolis utilizada apresenta alguns compostos como 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN); ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA); ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C, DHCA) e o ácido 6-propenóico-2-2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB) os quais possuem atividade biológica já comprovada (MARCUCCI, 2001) conforme explicado no item 3.2.1.

Os flavonóides e outros compostos como os ácidos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade biológica da própolis constituindo parâmetros que definem a qualidade da própolis e conseqüentemente o seu valor comercial. A transformação desta matéria-prima na forma de extratos concentrados em compostos com atividade biológica agrega valor ao produto. Estudos neste sentido são fundamentais no Brasil visto que este é um grande exportador de própolis “*in natura*” enquanto possui potencial para se transformar em um grande exportador de produtos industrializados com maior valor agregado.

5.1.2. Testes Preliminares

Os testes preliminares foram realizados para definir as condições de extração supercrítica adequadas para a extração da própolis com CO₂ a alta pressão. O tamanho das partículas de própolis utilizadas para a formação do leito de extração foi referente à fração de -16/+65 mesh conforme explicado no item 4.1.1. Esta fração foi selecionada devido ao maior rendimento no peneiramento e por proporcionar uma compactação adequada e reprodutível do leito de extração supercrítica, sem a formação de canais preferenciais. A observação da matriz sólida após o processo de ESC foi realizada para verificar a possível formação de canais preferenciais sendo que esta apresentou-se com coloração homogênea tanto na direção radial como longitudinal do leito de sólidos, indicando assim a não formação de canais preferenciais (Martínez, 2005). Foram testadas as quantidades de 30 e 20 g de própolis para a formação do leito, sendo que se optou por fixar a quantidade em 20 g visando a economia da matéria-prima e do solvente supercrítico bem como a redução do tempo de extração. O volume ocupado pela massa de 20 g de própolis foi calculado através da altura preenchida por esta massa e o raio do extrator. A quantidade de 20 g de própolis ocupou $21,51 \pm 0,01$ % do volume total do

extrator do equipamento ESC 1 e $28,80 \pm 0,01$ % do equipamento ESC 2, sendo que o restante do volume dos extratores foi completado com esferas de vidro.

A influência do tempo estático (T.E.) na ESC da própolis foi avaliada para a condição de 150 bar, 40 °C e vazão de 3 g/min. A ESC com tempo estático consistiu em deixar a própolis em contato com o fluido supercrítico por 1h nas condições de operação selecionadas antes de iniciar a extração, promovendo assim, um tempo maior de contato entre as fases para a solubilização do soluto pelo fluido supercrítico. A Figura 5.1 as curvas de ESC da própolis a 150 bar, 40 °C e vazão de 3 g/min, com e sem tempo estático. O gráfico foi construído através da massa de extrato acumulado (soluto) por massa de própolis (sólido) versus a massa de CO₂ utilizada por massa de própolis. Conforme pode ser observado na Figura 5.1 o tempo estático de uma hora promove uma inclinação maior na primeira parte da curva de extração que representa a etapa CER. Embora para uma razão mássica de consumo de solvente de 62 (g/g), o tempo estático promova um aumento de 1,38 % no rendimento de extrato, um maior tempo de processo significa também aumento do custo de produção. Sendo assim, para efeito de redução do custo operacional foi definido que as extrações seriam realizadas sem tempo estático.

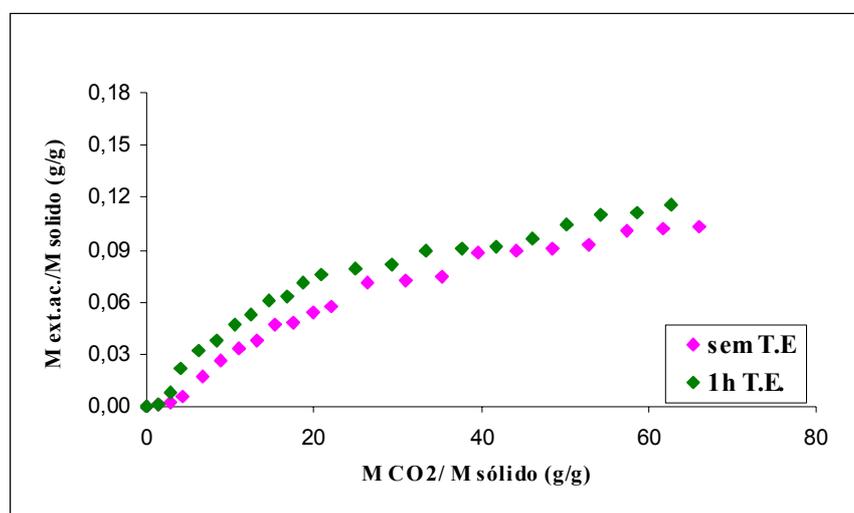


Figura 5.1 – Gráfico de influência do tempo estático na ESC da própolis a 150 bar, 40 °C e vazão de 3 g/min .

A Figura 5.2 apresenta a curva de extração a 200 bar, 40 °C e vazão de 3 g/min representada pela razão mássica de extrato acumulado e sólido, versus o tempo de extração. Como pode ser observado, para um tempo total de extração de 5 h a curva já alcança a etapa de taxa decrescente de extração (FER). Sendo assim, para os experimentos de ESC em etapa

única com CO₂ puro realizados na vazão de 3 g/min o tempo de extração ficou padronizado em 5 h o que resulta em um consumo de 900 g de CO₂. Os experimentos de rendimento global da ESC com CO₂ puro a 250 bar e das ESC com co-solvente foram realizados na vazão de 5 g/min, sendo assim o tempo de extração foi definido como 3 h resultando na mesma massa de CO₂ consumida durante o tempo total de extração (900 g).

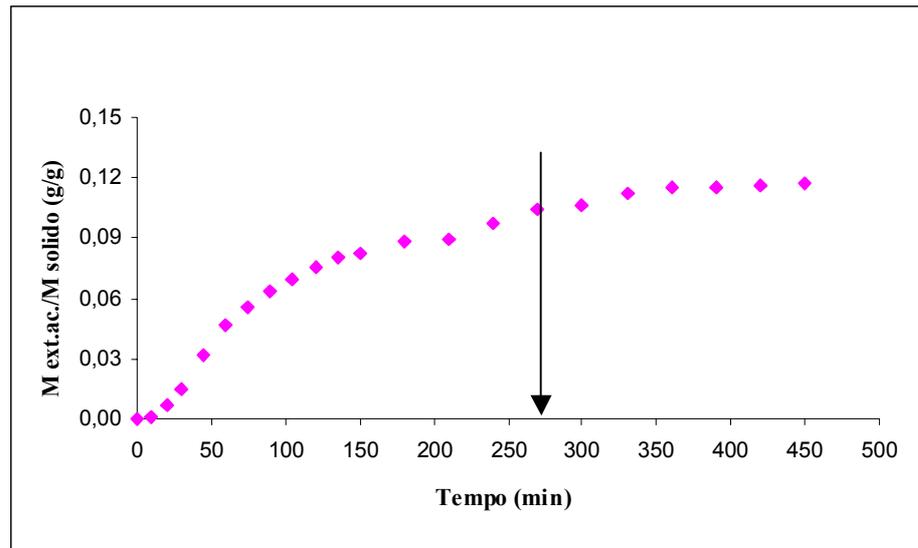


Figura 5.2 – Gráfico da ESC da própolis a 200 bar, 40°C e vazão de 3 g/min .

5.2. Avaliação dos Extratos de Própolis Obtidos com Diferentes Técnicas de Extração em Termos de Rendimento Global.

5.2.1. Introdução

A crescente demanda por produtos naturais resultou em um aumento no consumo de própolis nos últimos anos. Especialmente no Japão, a própolis brasileira é extensivamente usada em alimentos e bebidas com o objetivo de manter ou melhorar a saúde humana (MARCUCCI *et al.*, 2001). Os extratos de própolis encontraram aplicação em uma grande variedade de nutracêuticos, como suplementos alimentares, e cosméticos, como produtos de higiene dental, cremes cicatrizantes e sabonetes (CATCHPOLE *et al.*, 2004).

O extrato de própolis pode ser obtido através de diferentes técnicas de extração e solventes, sendo que o extrato etanólico é o mais comum. A técnica de extração e o tipo de solvente utilizados definem tanto a qualidade do extrato quanto o rendimento da extração. O rendimento da extração é um fator fundamental na elucidação da viabilidade econômica do processo. Nesta seção são apresentados os resultados de rendimento global obtidos para as diversas condições de extração supercrítica da própolis em etapa única e seqüencial, bem como os resultados obtidos nas extrações convencionais.

5.2.2. Materiais e Métodos

O rendimento global das extrações convencionais soxhlet e maceração, realizadas em duplicata com solventes de diferentes polaridades foram determinados conforme descrito no item 4.2.

Os experimentos de rendimento global da ESC da própolis (X_0) foram realizados em duplicata conforme descrito no item 4.5.3. As extrações em etapa única (ESC-U) com CO_2 puro para as condições de pressão de 100, 150 e 200 bar e temperaturas de 30, 40 e 50 °C foram efetuadas no equipamento de ESC 1, a uma vazão de solvente de 3 g/min por um período de 5 h. A determinação do rendimento global a 250 bar foi realizado no equipamento de ESC 2 a uma temperatura fixa de 40 °C e vazão de 5 g/min, por um período de 3 h. A ESC com co-solvente (ESC-Uco) foi realizada a 150 bar, 40 °C e vazão de 5 g/min utilizando como co-solvente 2, 5 e 7 % (m/m) de etanol absoluto. Na extração supercrítica seqüencial (ESC-S) foram utilizadas as condições de 100 e 150 bar para a primeira etapa; 250 e 300 bar para a segunda etapa; na condição isotérmica de 40 °C e vazão de 5 g/min conforme explicado no item 4.5.3. A ESC-S tem como objetivo a extração de compostos constituintes

da cera e do óleo essencial da própolis na primeira etapa, e a extração de compostos com atividade antioxidante como os ácidos fenólicos e flavonóides na segunda etapa.

Os resultados de rendimento para as diferentes técnicas de extração foram avaliados separadamente através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância, com o auxílio do software STATISTICA 6.0. O teste de Tukey foi aplicado para avaliar as diferenças significativas ao nível de 5 % de significância entre os pares de médias dos tratamentos, conforme explicado no item 4.9.

5.2.3. Resultados

a) Rendimento Global das Extrações Convencionais da Própolis

A Tabela 5.3 apresenta os resultados de rendimento obtidos nas extrações soxhlet (Sox) e maceração (Mac) utilizando os solventes hexano (Hex), clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (EtAc), etanol absoluto (EtOH), etanol diluído com água destilada nas concentrações de 50 % v/v (EtH₂O 50%) e 70 % v/v (EtH₂O 70%) e água destilada (H₂O).

Tabela 5.3 – Tabela de rendimento global das extrações convencionais da própolis.

Ensaio	Extração	X ₀ (%)
1	Sox-EtOH	60 ± 2
2	Sox-EtAc	59,7 ± 0,5
3	Sox-CHCl ₃	73 ± 2
4	Sox-Hex	17 ± 3
5	Sox-H ₂ O	14,3 ± 0,5
6	Mac-EtOH	46 ± 6
7	Mac-EtH ₂ O 70%	43,3 ± 0,5
8	Mac-EtH ₂ O 50%	17,4 ± 0,5

O maior rendimento foi obtido na extração soxhlet com clorofórmio o que indica que a própolis utilizada possui grande quantidade de compostos solúveis em solventes com polaridade intermediária como o clorofórmio com polaridade de 4,1 (Byers, 2006). A extração soxhlet com água apresentou o menor rendimento, 14,3 ± 0,5 % (m/m) seguido pela extração soxhlet com hexano, 17 ± 3 % (m/m). A utilização de um solvente polar como a água com polaridade 9,0 (Byers, 2006) prejudica a extração de compostos apolares, o que resulta em um menor rendimento se comparado a um solvente de polaridade intermediária como o

clorofórmio. O mesmo efeito é percebido quando se utiliza um solvente apolar como o hexano de polaridade 0,0 (Byers, 2006) o qual limita a extração dos compostos polares reduzindo assim o rendimento da extração.

Segundo o teste de Tukey os rendimentos dos extratos obtidos através de soxhlet com hexano, soxhlet com água e maceração com 50 % de etanol não diferem significativamente ao nível de 5 % de significância. O mesmo ocorre com os rendimentos obtidos através da maceração com etanol absoluto (46 ± 6 %) e etanol 70 % ($43,3 \pm 0,5$ %), que também não apresentam diferença significativa ao nível de 5 % de significância ($p=0,9345$). Os rendimentos obtidos na extração soxhlet com etanol absoluto (60 ± 2 %) e acetato de etila ($59,7 \pm 0,5$ %) não apresentaram diferença significativa ao nível de 5 % de significância. Sendo assim, pode-se dizer que o etanol absoluto e o acetato de etila solubilizam a mesma quantidade de compostos presentes na própolis através da extração soxhlet.

A extração soxhlet realizada com etanol absoluto apresentou rendimento de 60 ± 2 % que foi superior ao rendimento obtido através de maceração utilizando o mesmo solvente 46 ± 6 %. A extração soxhlet com etanol absoluto ainda proporcionou maior rendimento que as macerações realizadas com etanol diluído nas concentrações de 50 e 70 % (v/v). Cunha *et al.* (2004) também observou maiores rendimentos para a extração soxhlet com etanol absoluto do que para a maceração quando utilizou etanol absoluto e etanol diluído nas concentrações de 70, 50 e 30 % (v/v) na extração de seis amostras de própolis do sudeste do Brasil. Uma possível explicação para este comportamento é que na maceração à temperatura ambiente as ceras presentes na própolis encontram-se no estado sólido dificultando a extração dos compostos solúveis no solvente. Já na extração soxhlet a temperatura de ebulição do solvente acaba fundindo os compostos cerosos presentes na própolis facilitando a penetração do solvente na amostra e conseqüentemente a solubilização dos compostos extraíveis. O refluxo do solvente na extração soxhlet também contribui para aumentar o rendimento em relação ao processo de maceração já que solvente puro entra em contato com a amostra a cada refluxo.

A determinação do rendimento e atividade biológica dos extratos convencionais obtidos com solventes de diferentes polaridades é fundamental para a seleção do co-solvente a ser utilizado na ESC. Neste caso optou-se por escolher como co-solvente o etanol absoluto visto que, entre os solventes polares testados foi o que proporcionou simultaneamente maior rendimento (Tabela 5.3) e também apresentou melhores resultados de atividade antioxidante e fenólicos totais, como descrito no item 5.3, Tabela 5.7.

b) Rendimento Global da ESC-U com CO₂ Puro para Obtenção de Extrato de Própolis (X₀)

A Tabela 5.4 apresenta o rendimento global (X₀) da ESC da própolis em etapa única com CO₂ puro, em função das diferentes condições empregadas de pressão (P), temperatura (T), densidade do CO₂ (d_{CO2}), vazão mássica de CO₂ (Q_{CO2}) e massa total de CO₂ consumido na extração (M_{CO2}).

Conforme pode ser observado na Tabela 5.4 o maior rendimento obtido para a ESC da própolis em etapa única, utilizando CO₂ supercrítico puro, foi de 12 ± 1 % para a condição de 250 bar e 40 °C. Para a condição isotérmica de 30 °C o rendimento aumenta de 6,4 ± 0,4 % para 10 ± 1 % quando as pressões de extração utilizadas são de 100 e 200 bar, respectivamente. O rendimento da ESC da própolis em etapa única aumenta com a pressão de operação para as três isothermas estudadas, devido ao aumento da densidade do solvente supercrítico, conforme explicado no item 3.6.1.

Tabela 5.4 – Tabela de rendimento global (X₀) da ESC-U com CO₂ puro da própolis em função das diferentes condições de operação empregadas.

Ensaio	P/T (bar/°C)	d _{CO2} ^(a) (g/cm ³)	Q _{CO2} (g/min)	M _{CO2} (g)	X ₀ (%)m/m
9	100/30	0,772	3,00	900	6,4 ± 0,4
10	100/40	0,629	3,00	900	4,25 ± 0,05
11	100/50	0,385	3,00	900	1,5 ± 0,1
12	150/30	0,847	3,00	900	9,0 ± 0,1
13	150/40	0,781	3,00	900	8,6 ± 0,4
14	150/50	0,701	3,00	900	7,4 ± 0,7
15	200/30	0,890	3,00	900	10 ± 1
16	200/40	0,840	3,00	900	10 ± 1
17	200/50	0,785	3,00	900	10 ± 1
18	250/40	0,880	5,00	900	12 ± 1

(a) Angus *et al.* (1976)

You *et al.* (2002) utilizaram o CO₂ supercrítico para melhorar a extração e a solubilidade em água de nove flavonóides da própolis brasileira e chinesa. O efeito da pressão no rendimento da ESC da própolis brasileira na condição isotérmica de 45 °C foi avaliado. O rendimento da ESC da própolis aumentou com o aumento da pressão de 276 para 345 bar porém, o rendimento máximo dos nove flavonóides selecionados foi obtido na condição de

pressão de 276 bar. You *et al.* (2002) também avaliaram o efeito da temperatura (35 a 65 °C) no rendimento da ESC da própolis brasileira na condição de pressão de 207 bar utilizando 500 L de CO₂ puro. O maior rendimento obtido foi de 6,60 % (m/m) para a temperatura de 45 °C. No presente trabalho, podemos observar na Tabela 5.4 que para uma pressão de 200 bar maiores rendimentos são obtidos na faixa de temperatura de 40 a 50 °C.

A temperatura influencia tanto na densidade do CO₂ quanto na pressão de vapor do soluto, sendo que estes dois fatores atuam sobre a solubilidade e conseqüente o rendimento da extração de forma contrária. Segundo Brunner (1994) o poder de solvatação do solvente supercrítico aumenta com o aumento da densidade, ou seja, com a diminuição da temperatura, enquanto que a pressão de vapor do soluto aumenta com a temperatura, aumentando assim sua solubilização. Conforme a Tabela 5.4 na condição de pressão de 100 bar o rendimento diminui de $6,4 \pm 0,4$ % para $1,5 \pm 0,1$ % com o aumento da temperatura de extração de 30 para 50 °C, devido a diminuição da densidade do solvente de 0,772 para 0,385 g/cm³. O mesmo comportamento de diminuição de rendimento com o aumento da temperatura é observado para as extrações realizadas a 150 bar. Porém, um comportamento diferente pode ser observado para a pressão de operação de 200 bar, onde o rendimento permanece constante a 10 ± 1 % mesmo com o aumento da temperatura de 30 para 50 °C. Este comportamento ocorre porque a pressões altas a mudança da densidade com a temperatura é moderada, então o aumento na pressão de vapor do soluto é o fator dominante, enquanto que em pressões baixas a perda do poder de solvatação do solvente induzido pela densidade mais baixa prevalece (BRUNNER, 1994). Sendo assim, para a condição de 100 bar ocorre uma maior variação da densidade do solvente supercrítico com a temperatura e o efeito dominante sobre o rendimento da extração é o da densidade do CO₂. Entretanto, na pressão de 200 bar o rendimento de extração permanece constante mesmo com o aumento da temperatura, o que indica que nesta pressão os efeitos contrários da densidade do solvente e da pressão de vapor do soluto, sobre a solubilidade do soluto no solvente supercrítico, tendem a ser equivalentes. A pressão na qual os efeitos da densidade do solvente e da pressão de vapor do soluto se igualam, é conhecida como ponto de inversão das isotermas de rendimento, fenômeno conhecido como retrogradação, conforme explicado no item 3.6.1.

A Figura 5.3 apresenta as isotermas de rendimento global da ESC da própolis em função da pressão de operação conforme os dados da Tabela 5.4. Como pode ser observado na Figura 5.3, existe uma tendência de inversão das isotermas de rendimento da ESC da própolis próximo à pressão de 200 bar. Deste modo, para pressões abaixo do ponto de inversão das isotermas, o efeito da densidade é dominante sobre a solubilidade do soluto no solvente

supercrítico fazendo com que o rendimento diminua com o aumento da temperatura. Porém, para pressões acima do ponto de inversão o efeito da pressão de vapor do soluto tende a dominar fazendo com que o rendimento aumente com o aumento da temperatura. Segundo Danielski *et al.* (2007) nesta região de inversão das isoterms, a solubilidade de alguns componentes do extrato de própolis aumenta, enquanto a solubilidade de outros diminui com a mudança da temperatura em condições isobáricas.

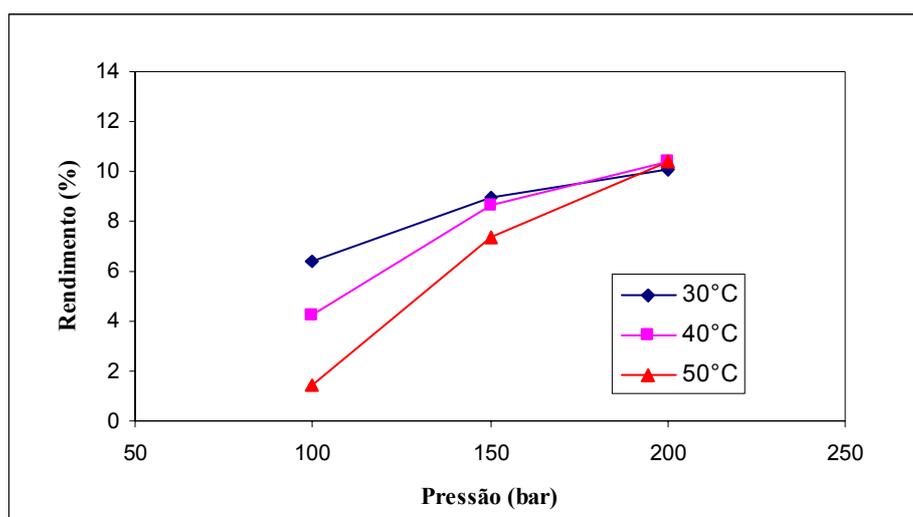


Figura 5.3 – Gráfico do ponto de inversão das isoterms de rendimento para a ESC da própolis.

O mesmo fenômeno foi observado por Michielin *et al.* (2005) para a oleoresina de cavalinha onde a inversão nas isoterms de 30 e 40 °C ocorreu entre 120 e 150 bar. Danielski *et al.* (2007) também observou que a inversão nas isoterms de solubilidade a 20 e 30 °C de oleoresina de cavalinha ocorre a 170 bar. Genena (2005) observou que a inversão das isoterms (30, 40 e 50 °C) para o extrato de alecrim ocorre a 165 bar. Segundo Kitzberger (2005) a inversão das isoterms de 30, 40 e 50 °C para o extrato de cogumelo shiitake ocorre na região de 150 a 200 bar.

Os resultados de rendimento global para a ESC da própolis em etapa única obtidos nas condições de pressão de 100 a 200 bar e temperaturas de 30 a 50 °C foram submetidos à ANOVA, conforme citado no item 4.9. Segundo a ANOVA tanto a temperatura ($p=0,000001$) quanto a pressão ($p=0,022767$) tiveram efeito significativo no rendimento global da ESC-U com CO₂ puro da própolis ao nível de 5 % de significância. O gráfico de superfície de resposta (Figura 5.4) apresenta o comportamento do rendimento global em função da pressão e temperatura de extração, onde a região mais escura representa a região de maior rendimento.

Como pode ser observado na Figura 5.4, os maiores rendimentos são obtidos para a faixa de pressão de 150 a 200 bar e temperaturas de 40 a 30 °C.

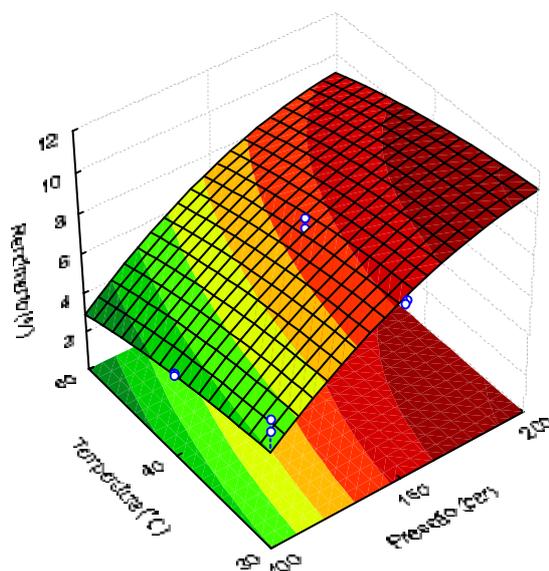


Figura 5.4 – Gráfico de superfície de resposta para o rendimento global da ESC em etapa única da própolis em função das temperaturas e pressões de operação.

Com base nos resultados de rendimento (Tabela 5.4) e atividade antioxidante (Tabela 5.8) obtidos para a ESC em etapa única utilizando CO₂ puro como solvente foram selecionadas as condições de extração a serem utilizadas na ESC seqüencial. Sendo assim, para a ESC seqüencial optou-se por fixar a temperatura de extração em 40 °C já que esta temperatura está dentro da faixa que proporciona maiores rendimentos. Já as pressões utilizadas em cada etapa da ESC-S foram selecionadas com base nos resultados de atividade antioxidante. Conforme apresentado no item 5.3.3 (b) as pressões mais baixas (100 e 150 bar) proporcionaram menores atividades antioxidantes sendo selecionadas para a primeira etapa da ESC-S enquanto que a pressão de 250 bar, com melhor resultado de atividade antioxidante foi utilizada na segunda etapa.

c) Rendimento Global da ESC-S da Própolis (X_0)

Na ESC seqüencial a primeira etapa realizada a baixas densidades de CO₂ tende a extrair preferencialmente compostos constituintes da cera e do óleo essencial presente na própolis. Porém, na segunda etapa uma maior densidade de CO₂ é aplicada com o objetivo de

extrair os constituintes da resina da própolis como os ácidos fenólicos e flavonóides responsáveis pela atividade antioxidante. As frações obtidas na ESC seqüencial da própolis apresentaram características visuais bem distintas. As primeiras frações possuíam aspecto ceroso com coloração esbranquiçada provavelmente devido a presença das ceras constituintes da própolis. Já o aspecto das segundas frações foi resinosa, semelhante a uma cola e com coloração amarela.

Conforme os dados de X_0 para a ESC seqüencial da própolis apresentados na Tabela 5.5, o rendimento para a primeira etapa de extração aumentou de $3,7 \pm 0,3$ % para $8,4 \pm 0,7$ % com a mudança de pressão de 100 para 150 bar nas mesmas condições de temperatura e vazão. Porém, comparando os ensaios 19 e 20, o aumento do rendimento para a primeira etapa de extração ocasionou a diminuição do rendimento da segunda etapa realizada a 250 bar nas mesmas condições de temperatura e vazão, de $8,9 \pm 0,7$ % para $5,1 \pm 0,5$ %. Considerando o rendimento obtido nas duas etapas de extração a seqüência de pressão de 150/250 bar proporciona um maior rendimento que a 100/250 bar.

Segundo a ANOVA existe diferença significativa ao nível de 5 % entre os rendimentos obtidos na segunda etapa de ESC-S ($p=0,0105$). Os rendimentos obtidos para a segunda etapa de extração da ESC-S nas condições de pressão de 100/250 bar ($8,9 \pm 0,7$ %) e 100/300 bar ($8,2 \pm 0,3$ %) não apresentam diferença significativa ao nível de 5 % ($p=0,5323$), devido provavelmente a uma solubilização da mesma quantidade de soluto para as duas pressões utilizadas. Já o rendimento para a segunda etapa da ESC-S na condição de 150/250 bar ($5,1 \pm 0,5$ %) difere significativamente ao nível de 5 % de significância dos obtidos na segunda etapa dos ensaios 19 e 21.

Tabela 5.5 – Tabela de rendimento global (X_0) da ESC-S com CO_2 puro da própolis em função das diferentes condições de operação empregadas.

Ensaio	Etapa	P/T (bar/°C)	$d_{\text{CO}_2}^{(a)}$ (g/cm ³)	Q _{CO₂} (g/min)	M _{CO₂} (g)	X ₀ (%)m/m
19	1 ^a	100/40	0,629	5,00	600	$3,7 \pm 0,3$
	2 ^a	250/40	0,880	5,00	900	$8,9 \pm 0,7$
20	1 ^a	150/40	0,781	5,00	600	$8,4 \pm 0,7$
	2 ^a	250/40	0,880	5,00	900	$5,1 \pm 0,5$
21	1 ^a	100/40	0,629	5,00	600	$4,1 \pm 0,3$
	2 ^a	300/40	0,910	5,00	900	$8,2 \pm 0,3$

Sendo assim, a seqüência de pressão de 150/250 bar proporciona o maior rendimento na primeira etapa de extração enquanto a utilização das seqüências 100/250 bar ou 100/300 bar resultam nos maiores rendimentos para a segunda etapa de extração. Quando somados os rendimentos das duas etapas a seqüência 150/250 bar proporciona a extração de maior quantidade de soluto.

d) Avaliação de Diferentes Concentrações de Co-Solvente

O emprego de co-solvente na ESC da própolis (ESC-Uco) foi realizada para melhorar o desempenho da ESC-U com CO₂ puro em termos de rendimento e qualidade dos extratos. A avaliação da utilização de co-solvente na ESC da própolis foi realizada a 150 bar, 40 °C e vazão de 5 g/min por um período de 3 h que corresponde ao mesmo consumo de CO₂ utilizado na ESC-U com CO₂ puro (900 g). A seleção do etanol absoluto como co-solvente foi baseada nos resultados de rendimento (Tabela 5.3) e de atividade antioxidante obtidos para as extrações convencionais, conforme descrito no item 5.3.3 Tabela 5.7. O etanol e o acetato de etila são os solventes polares que proporcionam os melhores rendimentos de extração, porém o etanol supera o acetato de etila na extração de compostos com atividade antioxidante. A quantidade de etanol foi definida como uma percentagem mássica da massa de CO₂ consumida durante o tempo total de extração. As percentagens de 2, 5 e 7 %(m/m) correspondem aos volumes de 23, 57 e 80 mL de etanol, respectivamente.

A Tabela 5.6 apresenta os resultados de rendimento global (X₀) da ESC-Uco da própolis em função das diferentes concentrações de etanol empregadas.

Tabela 5.6 – Tabela de rendimento global (X₀) da ESC-Uco da própolis em função das diferentes concentrações de etanol empregadas.

Ensaio	P/T/etanol (bar/°C/%)	Q CO ₂ (g/min)	M CO ₂ (g)	X ₀ (%)m/m
22	150/40/2	5,00	900	14,6 ± 0,6
23	150/40/5	5,00	900	24,8 ± 0,9
24	150/40/7	5,00	900	24,2 ± 0,6

O rendimento da ESC da própolis a 150 bar e 40 °C para um consumo de 900 g de CO₂ aumenta de 8,6 ± 0,4 % utilizando CO₂ puro (Tabela 5.4) para 14,6 ± 0,6 % quando 2 % (m/m) de etanol absoluto é utilizado como co-solvente (Tabela 5.6). O aumento no rendimento deve-se a maior solubilização de compostos polares pela mistura etanol/CO₂, já

que estes compostos possuem solubilidade limitada no CO₂ puro. A Figura 5.5 apresenta a influência da concentração de co-solvente no rendimento da extração.

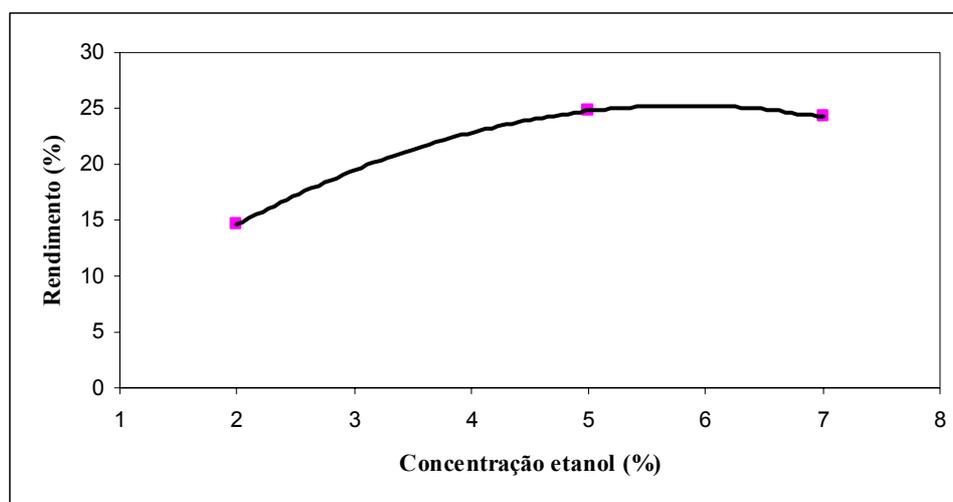


Figura 5.5 – Gráfico de rendimento em função da concentração de etanol utilizado como co-solvente na ESC da própolis a 150 bar e 40 °C.

Como pode ser observado na Figura 5.5 ocorre um aumento no rendimento da extração quando a concentração de etanol aumenta de 2 para 5 % (m/m). Porém, ao aumentar a percentagem de co-solvente de 5 para 7 % (m/m) o rendimento tende a permanecer constante com valores de $24,8 \pm 0,9$ % e $24,2 \pm 0,6$ % respectivamente. Segundo a análise de variância dos rendimentos obtidos com diferentes concentrações de etanol, não existe diferença significativa entre os rendimentos obtidos na ESC da própolis com 5 e 7 % (m/m) de etanol ($p=0,726527$), ao nível de 5 % de significância. Ou seja, aumentando a concentração de co-solvente de 5 para 7 % (m/m) o rendimento da extração é o mesmo, não diferindo significativamente. No caso da própolis, que possui grande quantidade de compostos apolares, isto provavelmente ocorre porque quando a quantidade de etanol utilizada é superior a uma concentração ótima, a extração de compostos apolares fica limitada já que o etanol possui característica polar.

O mesmo comportamento foi observado por Campos (2005) na obtenção de extratos de bagaço de uva através de ESC utilizando etanol como co-solvente nas concentrações de 10, 15 e 20 % em massa, sendo que um rendimento máximo foi obtido com 15 % de etanol.

You *et al.* (2002) avaliou o efeito da utilização dos co-solventes etanol e água na proporção de 1:2 e 1:5 (m/v) na ESC da própolis brasileira. O rendimento mais alto foi obtido com a adição de etanol na proporção de etanol: CO₂ de 1:5 (m/v), ou seja 20 % (m/v) e a utilização da água como co-solvente diminuiu o rendimento da extração.

5.2.4. Conclusão

Os rendimentos das extrações convencionais em geral foram superiores aos obtidos nas extrações supercríticas. Porém, a utilização de 5 % (m/m) de etanol como co-solvente proporcionou um rendimento cerca de três vezes superior ao obtido apenas com CO₂ puro. O solvente clorofórmio de polaridade intermediária proporcionou o maior rendimento o que evidencia que a própolis possui grande quantidade de compostos tanto polares quanto apolares. Sendo assim, a utilização de um solvente de polaridade muito alta como a água ou muito baixa como o hexano resulta em rendimentos inferiores ao obtido com clorofórmio. O rendimento da extração está diretamente relacionado com a viabilidade econômica do processo, porém é necessária a validação do método de extração através da avaliação biológica e composição química do extrato.

5.3. Avaliação da Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos dos Extratos de Própolis Obtidos com Diferentes Técnicas de Extração

5.3.1. Introdução

A própolis apresenta diversas atividades biológicas já comprovadas como: atividade antioxidante (A.A.), antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral, entre outras (item 3.2.1). Porém, estas atividades estão relacionadas à composição química da própolis que no caso do Brasil é altamente variável.

O interesse na atividade antioxidante de produtos naturais foi intensificado a partir de 1990 quando estudos comprovaram que a influência benéfica de alimentos e bebidas como frutas, chás, vinho tinto, café e cação na saúde humana está associada à atividade antioxidante de polifenóis naturalmente presentes nestes alimentos (ROGINSKY e LISSI, 2005). A maioria da atividade antioxidante de frutas e vegetais deve-se a compostos como ácidos fenólicos e flavonóides (TSAO e DENG, 2004).

Sendo assim, a determinação da atividade antioxidante e a correlação com o conteúdo total de fenólicos dos extratos de própolis obtidos com diferentes técnicas de extração é fundamental para avaliar o potencial da cada técnica na obtenção de extratos com atividade biológica.

5.3.2. Materiais e Métodos

Os extratos de própolis foram obtidos através de técnicas convencionais como a extração soxhlet e maceração, ou através da extração supercrítica utilizando CO₂ como solvente. As extrações soxhlet e maceração foram realizadas utilizando solventes de diferentes polaridades conforme descrito no item 4.2. Os extratos supercríticos foram obtidos através da extração supercrítica em etapa única com CO₂ puro (ESC-U), extração supercrítica em etapa única utilizando etanol como co-solvente (ESC-Uco) ou extração supercrítica sequencial (ESC-S) conforme descrito no item 4.5.3.

A determinação da atividade antioxidante dos extratos de própolis foi realizada em triplicata conforme descrito no item 4.6 através do método do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). O conteúdo de fenólicos para os extratos obtidos foi determinado em triplicata, através do método de Folin-Ciocalteu, conforme apresentado no item 4.7. As Tabelas de 5.7 a 5.10 apresentam os resultados de atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais para os extratos obtidos através da extração soxhlet e maceração, ESC-U com

CO₂ puro, ESC sequencial e ESC-U com co-solvente. Os resultados de atividade antioxidante são apresentados para a maior concentração de extrato avaliada (250 µg/mL) e na forma de EC₅₀ o qual representa a concentração de extrato capaz de fornecer 50 % de atividade antioxidante. O conteúdo de fenólicos totais é expresso em mg de equivalente em ácido gálico (EAG) por grama de extrato. A atividade antioxidante para todas as concentrações de extrato testadas (250, 125, 50, 25 e 10 µg/mL) e a curva padrão de ácido gálico utilizada para a determinação do conteúdo de fenólicos totais encontram-se no Apêndice II. O perfil químico dos extratos de própolis obtidos através da ESC-U com CO₂ puro para a condição de 100 bar, 40 °C e vazão de solvente de 3 g/min (Ensaio 10) e da ESC-U com o emprego de 5 % (m/m) de etanol como co-solvente para a condição de 150 bar, 40 °C e vazão de solvente de 5 g/min. (Ensaio 23) foi determinado através de CLAE conforme explicado no item 4.10.

5.3.3. Resultados

a) Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos dos Extratos Convencionais

Com exceção do extrato obtido através de soxhlet com hexano todos os outros extratos provenientes das extrações convencionais alcançaram 50 % de atividade antioxidante tornando possível o cálculo do EC₅₀. Segundo a Tabela 5.7 o extrato obtido através de maceração com etanol 50 % (v/v) apresentou a maior atividade antioxidante com o valor de EC₅₀ de $48,1 \pm 0,2$ µg/mL e também o maior conteúdo de fenólicos totais $138,7 \pm 0,8$ mg EAG/g_{ext.} O segundo melhor resultado de atividade antioxidante foi apresentado pelo extrato obtido através de soxhlet com água destilada o que confirma que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante possuem afinidade por solventes polares como etanol e água. Porém, a mistura de etanol e água destilada na concentração de 50 % (v/v) promove uma melhor extração dos compostos de interesse do que o etanol absoluto ou apenas a água destilada. O extrato obtido através de soxhlet com hexano apresentou a menor atividade antioxidante e o menor conteúdo de fenólicos totais devido a baixa polaridade do solvente que limita a extração dos compostos polares. As extrações soxhlet com etanol absoluto e acetato de etila apresentaram valores de EC₅₀ de 95 ± 3 e 155 ± 5 (µg/mL), respectivamente, o que indica que o etanol absoluto é mais eficiente que o acetato de etila na extração de compostos com atividade antioxidante.

Kumazawa *et al.* (2004) avaliaram o conteúdo de fenólicos totais de própolis de várias origens geográficas sendo que, o extrato etanólico da própolis proveniente do estado de Minas

Gerais apresentou $120 \pm 5,6$ mg EAG/g_{ext}, ou seja, valor semelhante ao obtido neste trabalho para a maceração com etanol 70 % (122 ± 0 mg EAG/gext). Park e Ikegaki (1998) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos obtidos da própolis de Minas Gerais através do método do β -caroteno e concluíram que os extratos com 70 e 80 % de etanol apresentaram a maior atividade.

O etanol absoluto, a água destilada e a mistura etanol/água são os melhores solventes para a extração de compostos antioxidantes. A maceração com etanol 50 % e a soxhlet com água apresentam os melhores resultados de EC₅₀, $48,1 \pm 0,2$ μ g/mL e $62,7 \pm 0,5$ μ g/mL, respectivamente. Porém, os rendimentos da extração apresentados na Tabela 5.3 mostram baixos rendimentos de $17,4 \pm 0,5$ % (m/m) para a maceração com etanol 50 % e $14,3 \pm 0,5$ % (m/m) para a extração soxhlet com água, quando comparados ao rendimento da extração soxhlet com etanol absoluto 60 ± 2 % (m/m), conforme observado no item 5.2.3. (a). Assim, quando se deseja aliar atividade antioxidante e rendimento dos extratos as melhores opções de extração são a soxhlet com etanol e a maceração com 70 % de etanol, visto que apresentam um dos melhores resultados de atividade antioxidante, conteúdo de fenólicos (Tabela 5.7) e rendimento de extração (Tabela 5.3).

Tabela 5.7 – Tabela de atividade antioxidante (A.A. e EC₅₀) e conteúdo de fenólicos totais para as extrações convencionais da própolis.

Ensaio	Extração	A.A. (%)	EC ₅₀	Fenólicos
		250 (μ g/mL)	(μ g/mL)	mg EAG/gext
1	Sox-EtOH	$89,7 \pm 0,3$	95 ± 3	$98,1 \pm 0,8$
2	Sox-EtAc	$68,8 \pm 0,7$	155 ± 5	79 ± 2
3	Sox-CHCl ₃	$53,9 \pm 0,9$	221 ± 12	54 ± 2
4	Sox-Hex	42 ± 1	-	24 ± 1
5	Sox-H ₂ O	$92,2 \pm 0,2$	$62,7 \pm 0,5$	$107,8 \pm 0,4$
6	Mac-EtOH	$85,5 \pm 0,9$	110 ± 3	99 ± 2
7	Mac-EtH ₂ O 70%	$92,5 \pm 0$	$82,0 \pm 0,7$	122 ± 0
8	Mac-EtH ₂ O 50%	$93,1 \pm 0,3$	$48,1 \pm 0,2$	$138,7 \pm 0,8$

A Figura 5.6 apresenta o gráfico de atividade antioxidante expresso em EC₅₀ e o conteúdo de fenólicos para os diferentes extratos obtidos através das extrações convencionais conforme os dados da Tabela 5.7. Como pode ser observado, em geral, quanto maior o conteúdo de fenólicos menor o valor de EC₅₀, ou seja, maior a atividade antioxidante do extrato.

Segundo a Figura 5.6, a extração soxhlet com clorofórmio apresentou o maior valor de EC_{50} , ou seja, a menor maior atividade antioxidante e o menor valor de conteúdo de fenólicos. Ao contrário da maceração com a mistura etanol/água 50 % que apresenta o menor valor de EC_{50} e o maior conteúdo de fenólicos.

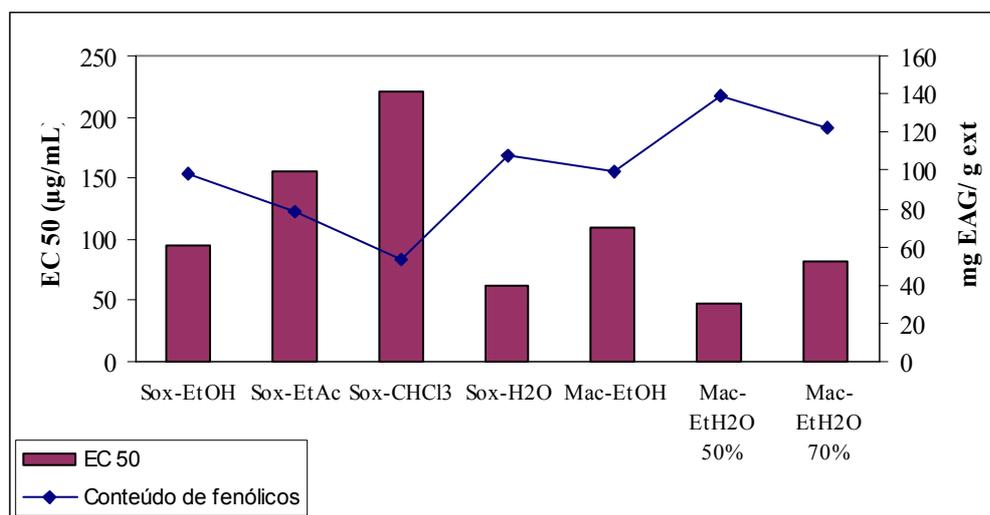


Figura 5.6 – Gráfico de atividade antioxidante (EC_{50}) e conteúdo de fenólicos totais para os extratos obtidos através de extrações convencionais.

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante de extratos de produtos naturais. Embora não deva caracterizar completamente a atividade antioxidante a determinação do conteúdo de fenólicos totais através do método de Folin Ciocalteu representa uma boa estimativa da atividade antioxidante de amostras de alimentos (ROGINSK e LISSI, 2005).

b) Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos da ESC-U com CO₂ Puro

A Tabela 5.8 apresenta os resultados de atividade antioxidante (A.A. e EC_{50}) e conteúdo de fenólicos totais para os extratos obtidos através da ESC-U com CO₂ puro. Conforme pode ser observado, na ESC em etapa única com CO₂ puro existe uma tendência de aumento da atividade antioxidante com o aumento da pressão. A menor atividade antioxidante para a concentração de extrato de 250 µg/mL foi de $21,0 \pm 0,7$ % obtida na condição de 100 bar e 40 °C enquanto que o extrato obtido a 250 bar e 40 °C apresentou 42 ± 1 %.

Os menores valores de atividade antioxidante foram obtidos na pressão de 100 bar sendo este um dos motivos do emprego de baixas densidades de CO₂ na primeira etapa da

ESC seqüencial, já que nesta etapa o objetivo é a extração das ceras que atrapalham a obtenção dos compostos com atividade antioxidante. Como a maior atividade antioxidante foi obtida a 250 bar esta condição foi selecionada para a segunda etapa da ESC seqüencial onde o objetivo é a obtenção de compostos com atividade antioxidante.

Tabela 5.8 – Tabela de atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais para as diferentes condições de ESC-U com CO₂ puro da própolis.

Ensaio	P/T (bar/°C)	Q_{CO2} (g/min)	A.A. (%) 250 (µg/mL)	Fenólicos mgEAG/g_{ext}
9	100/30	3,00	28,9 ± 0,4	49,2 ± 0,8
10	100/40	3,00	21,0 ± 0,7	35,6 ± 0,4
11	100/50	3,00	21,3 ± 0,6	55 ± 0
12	150/30	3,00	32,6 ± 0,3	44 ± 2
13	150/40	3,00	34,8 ± 0,5	40 ± 1
14	150/50	3,00	31 ± 2	39,2 ± 0,8
15	200/30	3,00	35,2 ± 0,2	44 ± 4
16	200/40	3,00	30,8 ± 0,5	46,4 ± 0,8
17	200/50	3,00	34 ± 1	39 ± 2
18	250/40	5,00	42 ± 1	40,8 ± 0,7

O menor conteúdo de fenólicos na ESC-U com CO₂ puro foi de 35,6 ± 0,4 mgEAG/g_{ext} e o maior conteúdo foi de 55 ± 0 mgEAG/g_{ext} obtidos para as condições de extração de 100 bar/40 °C e 100 bar/50 °C. Conforme apresentado na Figura 5.6 para os extratos obtidos através de maceração e extração soxhlet, quanto maior o conteúdo de fenólicos menor o valor de EC₅₀, ou seja, maior a atividade antioxidante do extrato. Porém, na ESC-U com CO₂ puro (Tabela 5.8) este comportamento não foi observado e houve pouca variação do conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante dos extratos se comparado aos extratos convencionais.

c) Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos da ESC Seqüencial

A Tabela 5.9 apresenta os resultados de atividade antioxidante (A.A. e EC₅₀) e conteúdo de fenólicos totais para os extratos obtidos da própolis através da ESC seqüencial. Conforme citado no item 5.2.3 (c) as frações obtidas na ESC seqüencial apresentaram características visuais bem distintas. As primeiras frações possuíam aspecto ceroso com coloração esbranquiçada provavelmente devido a presença das ceras constituintes da própolis.

Já o aspecto das segundas frações foi resinosa, semelhante a uma cola e com coloração amarela.

Tabela 5.9 – Tabela de atividade antioxidante (A.A. e EC₅₀) e conteúdo de fenólicos totais para as diferentes condições de ESC-S da própolis.

Ensaio	Etapa	P/T (bar/°C)	Q _{CO2} (g/min)	A.A. (%) 250 (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	Fenólicos mgEAG/gext
19	1 ^a	100/40	5,00	NT	NT	NT
	2 ^a	250/40	5,00	50,7 ± 0,4	241 ± 2	50,1 ± 0,4
20	1 ^a	150/40	5,00	NT	NT	NT
	2 ^a	250/40	5,00	50,20 ± 0,07	245 ± 2	46,7 ± 0,4
21	1 ^a	100/40	5,00	NT	NT	NT
	2 ^a	300/40	5,00	48,0 ± 0,5	257 ± 3	49,5 ± 0,2

NT – não testada

Como a ESC-S visa a extração de compostos com atividade antioxidante na segunda etapa de extração, apenas os extratos referentes à esta etapa foram avaliados em termos de A.A. e conteúdo de fenólicos, sendo que os extratos obtidos na primeira etapa da ESC-S não foram testados (NT). Segundo a Tabela 5.9 os resultados de atividade antioxidante para a segunda etapa das ESC seqüenciais foram semelhantes mesmo com o aumento de pressão de 250 para 300 bar. Comparando os extratos obtidos na ESC em etapa única e para a segunda etapa da ESC seqüencial ambos obtidos na condição de 250 bar e 40 °C podemos observar um aumento na atividade antioxidante de 42 ± 1 % para 50,7 ± 0,4 % em 250 µg/mL. O aumento da atividade antioxidante provavelmente deve-se à retirada na primeira etapa da ESC seqüencial de compostos cerosos, como hidrocarbonetos e monoésteres, presentes na própolis e que atrapalham a extração de compostos como os ácidos fenólicos e flavonóides responsáveis pela atividade antioxidante (Negri *et al.* 2000).

d) Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos da ESC-U com Co-Solvente

A Tabela 5.10 apresenta os resultados de atividade antioxidante (A.A. e EC₅₀) e conteúdo de fenólicos totais para os extratos obtidos da própolis através da ESC-U com diferentes concentrações de co-solvente.

A utilização de 5 % (m/m) de etanol como co-solvente na condição de 150 bar e 40 °C promoveu um aumento na atividade antioxidante dos extratos de 34,8 ± 0,5 % (Tabela 5.8)

para $63,9 \pm 0,3$ % em $250 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 5.10) ou seja, um aumento de 29,1 %. Já o conteúdo de fenólicos aumentou de $40 \pm 1 \text{ mgEAG/g}_{\text{ext}}$ (Tabela 5.8) para $60 \pm 1 \text{ mgEAG/g}_{\text{ext}}$ que corresponde a 50 %. As atividades biológicas da própolis são atribuídas principalmente à presença dos ácidos fenólicos e flavonóides (Marcucci *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2002) os quais possuem característica polar. Devido a característica polar do etanol sua adição ao CO_2 supercrítico promove a extração de compostos como os ácidos fenólicos e flavonóides que resulta em extratos com maior atividade antioxidante se comparados aos extratos obtidos com CO_2 puro. Segundo You *et al.* (2002) os extratos de própolis obtidos com CO_2 supercrítico puro são constituídos principalmente de compostos de baixa polaridade como materiais cerosos com poucos flavonóides presentes nestes extratos.

Tabela 5.10 – Tabela de atividade antioxidante (A.A. e EC_{50}) e conteúdo de fenólicos totais para as diferentes condições de ESC-U com co-solvente da própolis.

Ensaio.	P/T/etanol (bar/°C/%)	Q CO_2 (g/min)	A.A. (%) 250 ($\mu\text{g/mL}$)	EC 50 ($\mu\text{g/mL}$)	Fenólicos mgEAG/g _{ext}
22	150/40/2	5,00	$47,6 \pm 0,9$	-	$47,9 \pm 0,8$
23	150/40/5	5,00	$63,9 \pm 0,3$	$186,8 \pm 0,4$	60 ± 1
24	150/40/7	5,00	$47,7 \pm 0,2$	-	59 ± 1

Com o aumento da concentração de co-solvente de 5 para 7 % (m/m) houve uma diminuição da atividade antioxidante de $63,9 \pm 0,3$ % para $47,7 \pm 0,2$ % para a concentração de extrato de $250 \mu\text{g/mL}$. Uma possível explicação para isto é que o etanol possui em suas moléculas o grupo OH o que as torna capazes de formar ligações de hidrogênio entre si. Por outro lado, as moléculas dos compostos polares presentes na própolis também formam ligações de hidrogênio entre si. Então, para que o soluto seja solvatado pelo solvente é necessária a formação de novas ligações de hidrogênio, agora entre as moléculas de etanol e as moléculas dos compostos polares da própolis. A energia necessária para a formação dessas novas ligações é proveniente do rompimento das ligações de hidrogênio entre as moléculas do soluto. No entanto, quando a quantidade de co-solvente (% etanol) é muito alta não haverá energia suficiente para romper as ligações entre as moléculas de etanol e conseqüentemente menos compostos polares serão solubilizados pelo solvente ocasionando uma diminuição do rendimento e da atividade antioxidante (MORRISON e BOYD, 1996).

Segundo a Tabela 5.10 o maior conteúdo de fenólicos totais foi de $60 \pm 1 \text{ mgEAG/g}_{\text{ext}}$ obtido com a concentração de 5 % (m/m) de etanol. A utilização de 5 ou 7 % de co-solvente

na ESC-U da própolis promove o mesmo rendimento de extração (item 5.2.3 (d)). Sendo assim, a concentração de 5 % (m/m) de co-solvente promove os melhores resultados de rendimento de extração, atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais simultaneamente.

Os melhores resultados de atividade antioxidante, conteúdo de fenólicos totais e rendimento de todos os extratos obtidos através de ESC da própolis foram com a utilização de 5 % de etanol como co-solvente. A extração de compostos com atividade antioxidante através de ESC com CO₂ puro é limitada pois este solvente apresenta característica apolar extraindo preferencialmente compostos cerosos como hidrocarbonetos e monoésteres presentes na própolis deixando os compostos de interesse na matriz.

e) Perfil Químico dos Extratos Obtidos Através de ESC da Própolis

A Tabela 5.11 apresenta o perfil químico dos extratos de própolis obtidos através da ESC-U com CO₂ puro para a condição de 100 bar, 40 °C e vazão de solvente de 3 g/min (Ensaio 10) e da ESC-U com o emprego de 5 % (m/m) de etanol como co-solvente para a condição de 150 bar, 40 °C e vazão de solvente de 5 g/min. (Ensaio 23). Os extratos selecionados para a avaliação do perfil químico são responsáveis pelo melhor e pior resultado de atividade antioxidante dos extratos obtidos através de ESC.

Como pode ser observado na Tabela 5.11 o perfil químico dos extratos avaliados apresentam compostos como 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN); ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C, DHCA) e o ácido 6-propenóico-2-2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB) os quais possuem atividade biológica já comprovada (MARCUCCI *et al.*, 2001) conforme explicado no item 3.2.1.

Segundo a Tabela 5.11 a ESC realizada com 5 % (m/m) de etanol como co-solvente promove a extração de um número maior de compostos químicos e em maior quantidade (7,06 %) quando comparada com a ESC a 100 bar e 40 °C utilizando CO₂ puro (1,49 %). A ESC com o emprego de 5 % (m/m) de etanol como co-solvente resultou na melhor atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais de todos os extratos obtidos através de ESC devido a extração de maior quantidade de compostos fenólicos, como mostra o perfil químico. Já a extração realizada a 100 bar e 40 °C com CO₂ puro apresentou a menor atividade antioxidante e também menor quantidade de compostos fenólicos extraídos se comparada com a ESC utilizando 5 % (m/m) de co-solvente (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 : Quantidade em mg/g de cada um dos compostos identificados na análise por CLAE dos extratos referentes aos ensaios 10 e 23.

Nº	Composto (a)	Ensaio 10 (mg/g _{ext})	Ensaio 23 (mg/g _{ext})
1	2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN)	1,53	19,62
2	3-Metóxi-4-hidroxicinamaldeído (coniferaldeído)	0,91	1,41
3	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)	-	3,80
4	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 1)**	-	14,61
5	Ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB)	0,43	6,99
6	Ácido cinâmico (derivado 1)*	1,36	4,64
7	Ácido cinâmico (derivado 2)*	5,26	0,60
8	Ácido cinâmico (derivado 3)*	-	17,49
9	Ácido p-cumárico	-	1,45
10	Composto L2**	4,89	-
11	Vanilina	0,52	-
	Total (mg/g)	14,90	70,61
	Total (%)	1,49	7,06

Onde:

(a) Resultados expressos em miligramas do composto por grama de extrato.

* Mesmo espectro UV do ácido cinâmico, com tempo de retenção diferente.

** Mesmo espectro UV do ácido 3,4-diprenil-4-hidroxicinâmico, com tempo de retenção diferente.

O composto Artepillin C o qual possui atividade antioxidante e antimicrobiana comprovada (SHIMIZU *et al.*, 2004 apud GUZMÁN; AGA *et al.*, 1994) foi extraído apenas com a utilização de etanol como co-solvente comprovando a limitação do CO₂ puro na extração deste composto fenólico.

Sendo assim, pode-se dizer que a atividade antioxidante dos extratos de própolis está relacionada à presença de compostos fenólicos como o Artepillin C. Os compostos como o DPB e o DCBEN com comprovada a atividade biológica (Marcucci *et al.*, 2001) são extraídos em maior quantidade com a utilização de etanol como co-solvente da ESC. Já o composto Artepillin C não é extraído com CO₂ puro devido sua característica polar, sendo necessário a utilização de etanol como co-solvente para a extração do mesmo.

5.3.4. Conclusão

A maceração com a mistura etanol/água 50 % (v/v) resultou no extrato com melhor atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais. Os extratos obtidos através das

extrações convencionais apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante e fenólicos totais que os extratos obtidos na ESC. Conforme comentado anteriormente isto ocorre porque os compostos como ácidos fenólicos e flavonóides, responsáveis pela atividade antioxidante da própolis, possuem afinidade por solventes polares como o etanol e apresentam solubilidade limitada em solventes apolares como o hexano e o CO₂ supercrítico. Na ESC em etapa única com CO₂ puro o aumento da pressão de operação proporcionou extratos com maiores atividades antioxidantes. A extração seqüencial da própolis resultou em uma fração com maior atividade antioxidante na segunda etapa de extração se comparada com a ESC em etapa única nas mesmas condições. A utilização de 5 % (m/m) de etanol como co-solvente na ESC em etapa única proporcionou um aumento da atividade antioxidante de 29,1 % e no conteúdo de fenólicos de 50 %. Segundo a análise do perfil químico a ESC com o emprego de 5 % de etanol promove a extração de maior quantidade de compostos fenólicos, como o Artepillin C, os quais estão relacionados à atividade antioxidante do extrato. Estes resultados demonstram a importância do emprego de co-solvente para aumentar o desempenho da extração em termos de atividade antioxidante. Apesar disto, a complexidade do extrato indica que não é possível analisar apenas um atributo dos extratos de própolis, sendo necessário a avaliação de outras propriedades como a atividade antimicrobiana.

5.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Própolis Obtidos com Diferentes Técnicas de Extração

5.4.1. Introdução

A utilização de produtos naturais como antimicrobianos é uma alternativa para minimizar o problema da resistência aos antimicrobianos já disponíveis no mercado. A própolis tem sido frequentemente rotulada como “antibiótico natural” devido à sua comprovada atividade antimicrobiana contra diversas linhagens de microrganismos conforme citado anteriormente no item 3.2.1. Durante os últimos anos tem sido relatada a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis que provavelmente se deve à presença de compostos como os flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural. O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo e provavelmente baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana, podendo decorrer de um efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995).

A atividade antibacteriana da própolis tem sido extensivamente estudada e embora ainda não estejam elucidado todos os compostos responsáveis por tal atividade sabe-se que a própolis constitui um grande potencial como agente antimicrobiano. Sendo assim, a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis obtidos através de diferentes técnicas de extração foi realizada para avaliar o potencial de cada técnica na obtenção de extratos com atividade biológica.

5.4.2 Materiais e Métodos

Os extratos de própolis foram obtidos através de técnicas convencionais como a extração soxhlet e maceração, ou através da extração supercrítica utilizando CO₂ como solvente. As extrações soxhlet e maceração foram realizadas utilizando solventes de diferentes polaridades conforme descrito no item 4.2. Os extratos supercríticos foram obtidos através da extração supercrítica em etapa única com CO₂ puro (ESC-U), extração supercrítica em etapa única utilizando etanol como co-solvente (ESC-Uco) ou extração supercrítica seqüencial (ESC-S) conforme descrito no item 4.5.3.

Os extratos obtidos com as diferentes técnicas de extração foram testados contra os microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Gram positivo), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (Gram positivo formador de esporo) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negativo).

A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos com as diferentes técnicas de extração foi avaliada segundo o procedimento descrito no item 4.8 (SMÂNIA *et al.*, 1995; KITZBERGER *et al.* 2007). Como um teste inicial de triagem foi aplicado o método qualitativo de difusão em ágar descrito no item 4.8.1 o qual testa se o extrato inibe ou não o crescimento do microrganismo de interesse. Os extratos que apresentaram os maiores halos de inibição dos microrganismos no teste de difusão foram submetidos ao método quantitativo de microdiluição em caldo de cultivo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB), conforme explicado no item 4.8.2. A CMI refere-se à menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento de determinado microrganismo. Já a CMB refere-se à menor concentração de extrato capaz não só de inibir o crescimento, mas também de inativar determinado microrganismo (VIEIRA, 2005).

5.4.3. Resultados

Na Tabela 5.12 são apresentados os valores de tamanho dos halos de inibição obtidos através do teste de difusão em ágar, para todos os extratos de própolis em função das diferentes condições empregadas e os extratos selecionados para a análise de microdiluição em caldo de cultivo. Um halo de inibição superior a 9 mm de diâmetro é considerado um resultado positivo. Todos os extratos testados inibiram o crescimento das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Porém, apenas alguns extratos obtidos através de ESC inibiram o crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* sendo que nenhum extrato convencional proporcionou esta inibição. Segundo a Tabela 5.12 os extratos de ESC para as condições de 100 bar nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C e 150 bar a 40 °C inibem o crescimento da *Escherichia coli* enquanto que os obtidos a pressões mais altas como 200 e 250 bar ou utilizando etanol como co-solvente, não inibem. Conforme citado no item 5.3.3 os extratos de ESC com melhores atividades antioxidantes foram obtidos com pressões mais altas ou utilizando etanol como co-solvente. Isto indica que outros compostos, diferentes dos que proporcionam a atividade antioxidante também estão envolvidos com a atividade antimicrobiana dos extratos. Sendo assim, a ESC-S surge como uma opção na obtenção de duas frações de própolis com atividades biológicas distintas. A primeira etapa da ESC-S realizada à baixa pressão pode ser utilizada na obtenção de uma fração com atividade contra a bactéria *Escherichia coli* enquanto a segunda etapa realizada a 250 bar produz um extrato rico em compostos com atividade antioxidante.

Tabela 5.12 – Atividade antibacteriana pelo teste de difusão em ágar para os diferentes extratos de própolis.

Ensaio	Etapa	Técnicas de Extração	Halo (mm)			Selecionados
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	
Extrações Convencionais						
1		Sox-EtOH	0	16	13	X
2		Sox-EtAc	0	14	13	
3		Sox-CHCl ₃	0	14	12	
4		Sox-Hex	0	18	14	X
5		Sox-H ₂ O	0	14	10	
6		Mac-EtOH	0	18	13	
7		Mac-EtH ₂ O 70%	0	14	14	
8		Mac-EtH ₂ O 50%	0	18	19	X
ESC-U com CO ₂ puro*						
9	U	100/30/0	13	19	16	X
10	U	100/40/0	14	15	15	X
11	U	100/50/0	12	12	14	
12	U	150/30/0	0	15	16	
13	U	150/40/0	13	17	20	X
14	U	150/50/0	0	21	20	
15	U	200/30/0	0	16	21	X
16	U	200/40/0	0	15	15	
17	U	200/50/0	0	18	17	
18	U	250/40/0	0	16	18	X
ESC Seqüencial*						
19	1 ^a	100/40/0	14	14	17	
	2 ^a	250/40/0	0	15	17	
20	1 ^a	150/40/0	13	17	15	
	2 ^a	250/40/0	0	18	18	X
21	1 ^a	100/40/0	14	14	17	
	2 ^a	300/40/0	0	18	17	
ESC-U com co-solvente*						
22	U	150/40/2	0	15	18	
23	U	150/40/5	0	17	19	X
24	U	150/40/7	0	17	17	

* Condições de extração: P(bar)/T(°C)/etanol (%)

A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis provavelmente deve-se a um efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995).

Park e Ikegaki (1998) utilizaram a bactéria *Staphylococcus aureus* para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de própolis de Minas Gerais, obtidos com diferentes concentrações de etanol e água destilada. A metodologia utilizada foi a difusão em ágar com o uso de discos de papel filtro impregnados com extratos. Os extratos aquosos e com 10 e 20 % de etanol não inibiram o crescimento enquanto que os extratos obtidos com 60 a 80 % de

etanol apresentaram forte inibição da bactéria *Staphylococcus aureus* possuindo os maiores halos de inibição.

Marcucci *et al.* (2001) testaram os compostos PHCA, DCBEN, Artepillin C e DPB contra *Trypanosoma cruzi* e as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* (item 3.2.1). A metodologia aplicada para a determinação da atividade antimicrobiana foi a difusão em ágar com aplicação dos extratos através de impregnação de discos de papel filtro. O composto DPB foi o mais ativo contra todas as bactérias testadas. Também foi observado que a própolis é menos ativa contra bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli*.

O teste de difusão em ágar utilizado é qualitativo e nem sempre um maior halo de inibição significa uma melhor atividade antibacteriana, embora em muitos casos exista esta relação. Sawaya *et al.* (2004) observaram que os resultados de difusão em ágar são diretamente proporcionais à hidro-solubilidade dos extratos e não avaliam a atividade bactericida corretamente.

Conforme a Tabela 5.12 todos os extratos apresentaram resultado positivo para as bactérias Gram-positivas testadas no teste de difusão em ágar. Sendo assim, a seleção dos extratos a serem avaliados quantitativamente foi baseada no tamanho dos halos de inibição apresentados.

Os extratos selecionados para o teste de microdiluição em caldo de cultivo são apresentados na Tabela 5.13 com os respectivos resultados de CMI e CMB. O extrato supercrítico obtido na condição de 150 bar e 40 °C apresentou o melhor resultado de CMI e CMB para a bactéria *Escherichia coli* já que inibe o crescimento desta na concentração de extrato de 0,5 mg/mL e inativa com 1,0 mg/mL. Os extratos obtidos a 100 bar para as temperaturas de 30 e 40 °C inibem o crescimento da *Escherichia coli* nas concentrações de 1,0 e 0,5 mg/mL, respectivamente, enquanto que a inativação desta bactéria exige concentrações de extrato de 1,0 e 2,0 mg/mL. Conforme comentado anteriormente, nenhum extrato obtido através de técnicas convencionais de extração inibiu o crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* provavelmente devido às condições de extração empregadas como temperatura de extração ou de remoção do solvente que acaba degradando compostos envolvidos na atividade antibacteriana.

O melhor resultado de CMI para a bactéria *Bacillus cereus* foi de 0,25 mg/mL para a maceração com etanol 50 % (v/v) porém, o mesmo extrato apresentou o maior valor de CMB. Isto indica que o extrato obtido através de maceração com etanol 50 % (v/v) é eficiente na inibição do crescimento da bactéria *Bacillus cereus*, mas é limitado na sua inativação.

Menores valores de CMB (0,5 mg/mL) foram apresentados pelos extratos de ESC a 250 bar e 40 °C, ESC seqüencial a 250 bar e 40 °C, ESC a 150 bar e 40 °C com 5 % de etanol, soxhlet com etanol e hexano.

As melhores CMI e CMB para a bactéria *Staphylococcus aureus* (0,0625 mg/mL) foram apresentadas pelos extratos de ESC a 200 bar e 30 °C, ESC a 250 bar e 40 °C, ESC a 150 bar e 40 °C com 5 % de etanol, ESC seqüencial a 250 bar e 40 °C e soxhlet com hexano. O extrato da maceração com etanol 50 % (v/v) foi o menos eficaz contra a bactéria *Staphylococcus aureus* com CMI de 1,0 mg/mL e CMB de 2,0 mg/mL.

Tabela 5.13 – Determinação das concentrações mínimas inibitórias e bactericidas dos extratos de própolis para as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Ensaio	P/T/etanol (bar/°C/%)	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
		CMI (mg/mL)	CMB	CMI (mg/mL)	CMB	CMI (mg/mL)	CMB
Extrações convencionais							
1	Sox-EtOH	NT	NT	0,2500	1,0000	0,5000	0,5000
4	Sox-Hex	NT	NT	0,0625	0,0625	0,5000	0,5000
8	Mac-EtH ₂ O 50%	NT	NT	1,0000	2,0000	0,2500	1,0000
ESC-U com CO ₂ puro*							
9	100/30/0	1,0000	1,0000	0,1250	0,1250	1,0000	1,0000
10	100/40/0	0,5000	2,0000	0,2500	0,2500	1,0000	1,0000
13	150/40/0	0,5000	1,0000	0,1250	0,1250	1,0000	1,0000
15	200/30/0	NT	NT	0,0625	0,0625	1,0000	1,0000
18	250/40/0	NT	NT	0,0625	0,0625	0,5000	0,5000
ESC seqüencial*							
20	S250/40/0	NT	NT	0,0625	0,0625	0,5000	0,5000
ESC-U com co-solvente*							
23	150/40/5	NT	NT	0,0625	0,0625	0,5000	0,5000

NT – não testada

* Condições de extração: P(bar)/T(°C)/etanol (%)

Conforme pode ser observado na Tabela 5.11 o extrato obtido através de ESC-U com emprego de 5 % (m/m) de etanol como co-solvente apresenta maior quantidade de compostos como o DCBEN, Artepillin C e DPB com comprovada atividade antimicrobiana (MARCUCCI *et al.*, 2001), do que o extrato obtido através de ESC-U com CO₂ puro a 100 bar e 40 °C. De acordo com os resultados de atividade antimicrobiana (Tabela 5.13), o extrato obtido através de ESC com 5 % de etanol apresenta resultados melhores de CMI e CMB que

os do extrato obtido através de ESC com CO₂ puro a 100 bar e 40 °C para as bactérias Gram-positivas testadas. Porém, o extrato obtido através de ESC com CO₂ puro a 100 bar e 40 °C inibiu o crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* enquanto que o extrato obtido da ESC com 5 % de etanol não inibiu. Sendo assim, pode-se dizer que os compostos como o DCBEN, Artepillin C e DPB estão envolvidos na atividade contra as bactérias *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Porém outros compostos além dos citados anteriormente que não são detectados através da CLAE, como os sesquiterpenos, podem estar envolvidos na atividade contra a bactéria *Escherichia coli*.

Sawaya *et al.* (2004) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de própolis contra seis linhagens de bactérias Gram positivas entre elas *Staphylococcus aureus*. A amostra de própolis foi proveniente do estado de São Paulo e os extratos de própolis foram obtidos através maceração com diferentes concentrações de etanol (30, 50 e 70 % v/v) e extração soxhlet com etanol absoluto. A atividade bactericida dos extratos foi determinada através das metodologias de difusão em ágar e microdiluição em caldo de cultivo. O teste de microdiluição em caldo de cultivo apresentou os resultados mais consistentes com CBM dos extratos variando entre 2,5 e 20,0 mg/mL. Segundo os resultados do teste de microdiluição a atividade bactericida dos extratos obtidos com 50 % de etanol foi a melhor, seguida por aqueles extraídos com 70 % de etanol e etanol absoluto através de extração soxhlet e maceração.

Comparando os diferentes extratos de própolis obtidos neste trabalho através de ESC com CO₂ puro pode-se dizer que os extratos produzidos a altas pressões como 200 e 250 bar apresentam melhor atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* que os extratos produzidos a baixas pressões como 100 e 150 bar. Porém, apenas os extratos obtidos a 100 e 150 bar com CO₂ puro apresentaram atividade contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (Tabela 5.13).

A Figura 5.7 apresenta os resultados de CMB dos extratos de própolis para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. De uma forma geral os diversos extratos de própolis inativam melhor a bactéria *Staphylococcus aureus* do que o *Bacillus cereus*. Os extratos supercríticos foram os mais eficazes principalmente contra o *Staphylococcus aureus* inativando-o com as menores concentrações de extrato se comparado com os extratos convencionais, o que demonstra a especificidade da tecnologia supercrítica no que se refere à qualidade dos extratos obtidos. Porém, conforme apresentado no item 5.3.3 (a) os extratos convencionais apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos que os extratos obtidos através de ESC. Isto ressalta a importância da definição da

técnica de extração adequada para a obtenção de extratos de própolis com a atividade biológica desejada.

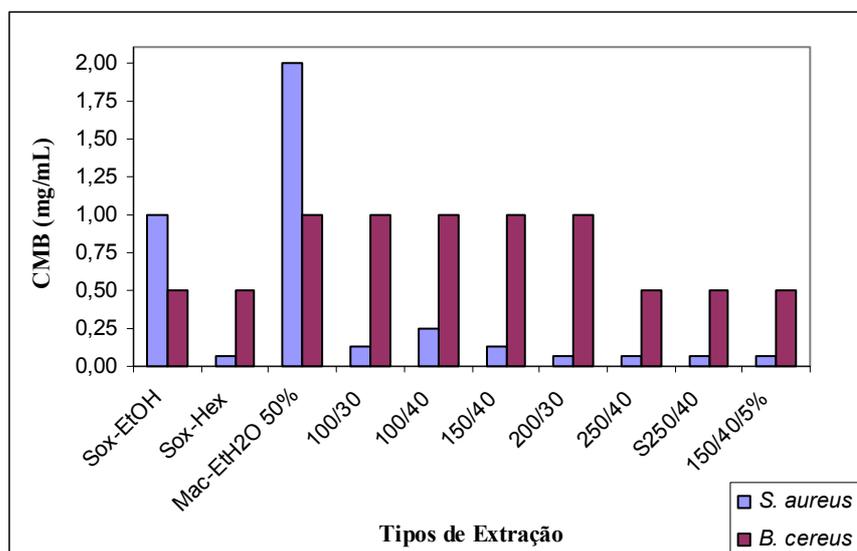


Figura 5.7 – Gráfico da CMB dos diferentes extratos de própolis avaliados para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

KITZBERGER *et al.* (2007) avaliaram a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de cogumelo shiitake obtidos através de técnicas convencionais de extração e da extração supercrítica. Os resultados de atividade biológica dos extratos de cogumelo shiitake indicam que ambos os métodos de extração foram adequados em termos de atividade antioxidante, enquanto que o processo a alta pressão (com CO₂ puro e com co-solvente) foi mais efetivo para obter extratos contra *M. luteus* e *B. cereus* enquanto que os extratos obtidos através de técnicas convencionais de extração não apresentaram atividade antimicrobiana.

5.4.4. Conclusão

As técnicas convencionais de extração produziram extratos susceptíveis ao crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Os extratos obtidos através de ESC com CO₂ puro a altas pressões como 200 e 250 bar apresentam melhor atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* que os extratos produzidos a baixas pressões como 100 e 150 bar. Porém, apenas os extratos obtidos a 100 e 150 bar com CO₂ puro apresentaram atividade contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, sendo que os melhores resultados de CMI e CMB foram obtidos na condição de 150 bar e 40 °C. A

ESC-S é uma alternativa para a obtenção de duas frações de própolis com diferentes atividades biológicas, sendo uma ativa contra a *Escherichia coli* e outra com atividade antioxidante. Os extratos supercríticos foram os mais eficazes principalmente contra o *Staphylococcus aureus* inativando-o com as menores concentrações de extrato. Os compostos DCBEN, Artepillin C e DPB estão relacionados à atividade contra as bactérias *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, porém outros compostos além destes estão envolvidos na atividade contra a bactéria *Escherichia coli*. Sendo assim, a determinação da composição dos extratos de própolis que apresentaram atividade antimicrobiana é fundamental para elucidar quais os compostos estão relacionados a esta atividade.

5.5. Estudo da Cinética e Modelagem Matemática da Extração Supercrítica da Própolis

5.5.1. Introdução

O conhecimento dos efeitos causados pelas variáveis operacionais como pressão, temperatura e vazão de solvente em determinado processo de extração supercrítica é necessário para o projeto e otimização do processo. A modelagem matemática das curvas de extração a partir dos dados experimentais é fundamental para a predição do processo de extração em outras escalas e condições operacionais.

Os seguintes modelos de transferência de massa disponíveis na literatura foram utilizados para a descrição das curvas de extração de própolis com tecnologia supercrítica: Sovová (1994), Martínez *et al.* (2003), Crank (1975) apud Reverchon (1997) e Gaspar *et al.* (2003). As equações dos modelos são apresentados no item 3.6.6 e o detalhamento das equações no Apêndice I.

O modelo apresentado por Sovová (1994) é baseado no balanço de massa no leito de extração. A curva de extração é dividida em três etapas: etapa de taxa constante de extração (CER), etapa de taxa decrescente de extração (FER) e etapa difusional. Martínez *et al.* (2003) propôs um modelo matemático também baseado no balanço de massa no leito de extração que pode ser aplicado considerando o extrato como um único pseudocomposto ou como uma mistura de substâncias. O modelo de difusão, proposto por Crank (1975) apud Reverchon (1997) considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor, considerando-se cada partícula sólida como um corpo quente que perde calor com o tempo para o meio. O modelo de placa (SSP), proposto por Gaspar *et al.* (2003) também considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor, porém no modelo SSP as partículas sólidas são consideradas como placa enquanto que no modelo de difusão as partículas são consideradas esféricas.

5.5.2. Materiais e Métodos

Nesta seção são discutidos os resultados obtidos na cinética da extração bem como os resultados da modelagem matemática das curvas de extração da própolis. As curvas de extração supercrítica da própolis foram obtidas conforme descrito no item 4.5.4 e a modelagem matemática segundo o item 4.11 utilizando o programa Mass Transfer disponível no LATESC, desenvolvido por Correia *et al.* (2006). A determinação do diâmetro das

partículas de própolis utilizadas na formação do leito de extração foi realizada conforme o item 4.3.1 e calculada segundo Gomide (1983). A densidade aparente (da) foi determinada através da massa de própolis utilizada para a formação do leito e o volume ocupado por esta no extrator (g/cm^3) e a densidade real através do método de picnometria em gás hélio, conforme descrito no item 4.3.2. A porosidade do leito foi obtida a partir dos valores da densidade real e aparente de acordo com o procedimento descrito no item 4.3.3.

5.5.3. Resultados

a) Cinética da ESC da Própolis

A massa de própolis utilizada em todas as extrações foi de 20 g a qual ocupou um volume de $29,77 \pm 0,04 \text{ cm}^3$. A Tabela 5.14 apresenta os resultados obtidos na caracterização do leito de partículas os quais foram utilizados para a modelagem dos dados experimentais.

Tabela 5.14 – Características do leito de partículas.

	Diâmetro médio (cm)	Densidade real (g/cm^3)	Densidade aparente (g/cm^3)	Porosidade do leito (ϵ)
Própolis	0,0372	$1,186 \pm 0,001$	0,672	0,433

A Figura 5.8 apresenta o efeito da vazão do solvente supercrítico na curva de extração da própolis a 150 bar e 40 °C. As curvas foram realizadas na vazão de 3 e 5 g/min no equipamento de ESC 1 e 2, respectivamente. Conforme pode ser observado o aumento na vazão do solvente ocasionou uma maior inclinação da primeira parte da curva que corresponde a etapa de taxa constante de extração (CER). A maior disponibilidade de solvente no extrator por unidade de tempo proporciona um maior gradiente de concentração entre o sólido e o solvente, ocasionando uma maior taxa de transferência de massa. Segundo JOCHMANN (2000) o aumento no rendimento da extração com o aumento da vazão deve-se à maior velocidade com que o solvente escoar no leito, diminuindo a espessura do filme que envolve a partícula sólida e conseqüentemente a resistência à transferência de massa.

MICHELIN (2002) observou um efeito similar na extração com CO_2 supercrítico de oleoresina de cavalinha nas vazões de 1,11 e 2,84 g/min. KITZBERGER (2005) também relata um aumento na taxa de extração da etapa CER para a extração de cogumelo shiitake

com CO₂ supercrítico nas vazões de 3,33 e 6,67 g/min. O mesmo comportamento é observado por GENENA (2005) na extração com CO₂ supercrítico de alecrim para as vazões de 5; 8,33 e 11,67 g/min.

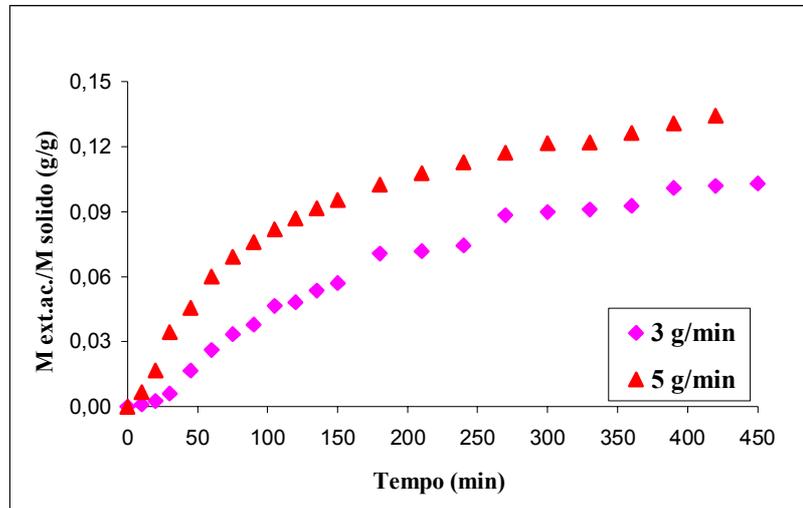


Figura 5.8 – Gráfico de influência da vazão na ESC da própolis a 150 bar e 40 °C.

A Figura 5.9 apresenta o efeito da pressão nas curvas de extração supercrítica da própolis a uma temperatura fixa de 40 °C, vazões de solvente de 3 e 5 g/min para as pressões de 100, 150, 200 e 250 bar. Como pode ser observado, com o aumento da pressão a uma temperatura constante ocorre um aumento da taxa de extração em todas as etapas do processo devido ao aumento da densidade e conseqüentemente do poder de solvatação do CO₂ supercrítico.

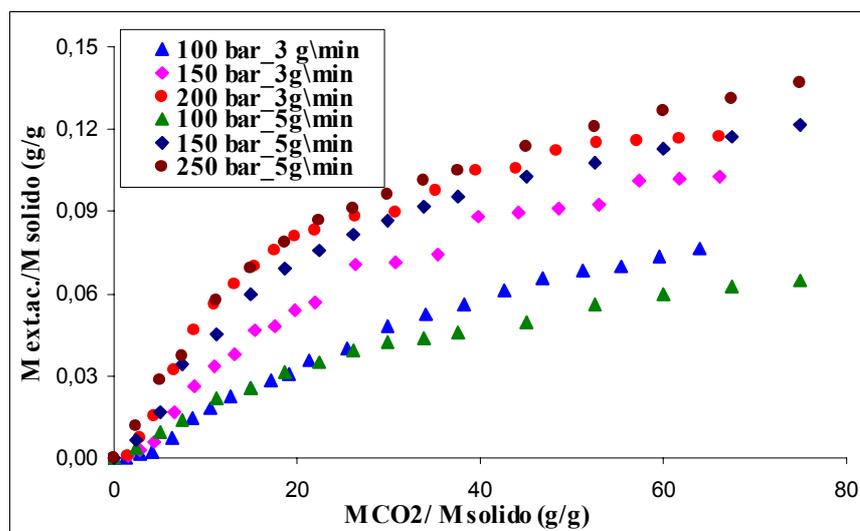


Figura 5.9 – Gráfico de influência da pressão na ESC da própolis a 40 °C e vazões de 3 e 5 g/min.

O efeito da temperatura nas curvas de extração foi avaliado para a condição de pressão de 100 bar e temperaturas de 30, 40 e 50 °C na vazão de solvente de 3 g/min. A temperatura influencia tanto na densidade do CO₂ quanto na pressão de vapor do soluto, sendo que estes dois fatores atuam sobre a solubilidade global do soluto de forma contrária. Segundo Brunner (1994) o poder de solvatação do solvente supercrítico aumenta com o aumento da densidade, ou seja, com a diminuição da temperatura, enquanto que a pressão de vapor do soluto aumenta com a temperatura. Conforme explicado anteriormente no item 5.2.3 (b) estes dois efeitos contrários provocam a inversão das isotermas de rendimento que no caso da ESC da própolis tende a ocorrer próximo à pressão de 200 bar, como mostra a Figura 5.3. O efeito dominante sobre a solubilidade do soluto para pressões abaixo da região de inversão das isotermas é a densidade do solvente enquanto que acima desta região o efeito da pressão de vapor do soluto prevalece sobre a solubilidade.

Conforme pode ser observado na Figura 5.10 o maior rendimento de extração para a pressão de 100 bar é obtido na menor temperatura (30 °C). Este comportamento ocorre porque na pressão de 100 bar, que está abaixo da faixa de inversão das isotermas, a densidade do CO₂ exerce maior influência na solubilidade do soluto do que a pressão de vapor. Sendo assim, com a diminuição da temperatura a densidade do solvente supercrítico aumenta, as moléculas de CO₂ ficam mais próximas e proporcionam uma maior solubilização do soluto aumentando o rendimento da extração.

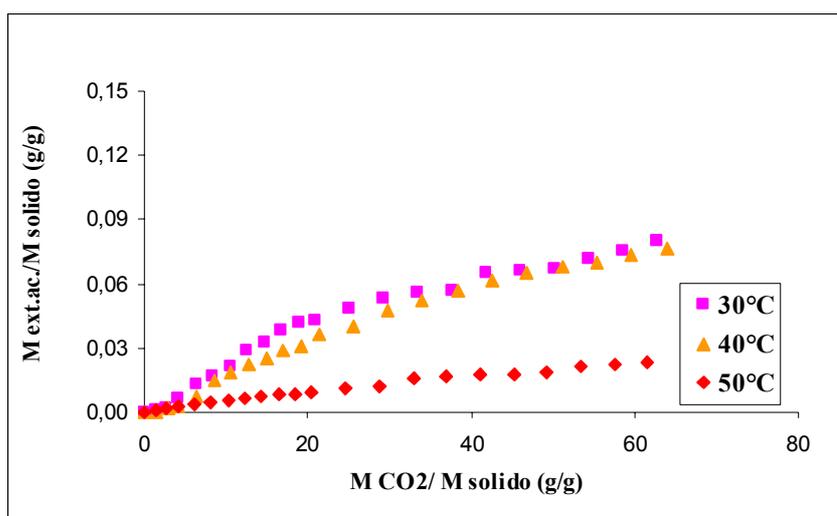


Figura 5.10 – Gráfico de influência da temperatura na ESC da própolis a 100 bar e vazão de 3 g/min.

A Figura 5.11 apresenta as curvas de extração seqüencial da própolis obtidas conforme descrito no item 4.5.4, para seqüências de pressão de 100/250, 150/250 e 100/300 bar, bem como a curva de ESC-U a 250 bar, para as condições de operação de 40 °C e vazão de 5 g/min. As condições para obtenção das curvas de extração foram baseadas nos resultados de atividade antioxidante e rendimento da ESC-U com CO₂ puro conforme explicado no item 5.3.3 (b). Como pode ser observado na Figura 5.11 o tempo de 2 h de duração para a primeira etapa é suficiente para a extração atingir a etapa de taxa decrescente de extração (FER). A utilização da pressão de 150 bar proporciona uma maior taxa de extração para primeira etapa se comparada à condição de 100 bar. Porém, o aumento na taxa de extração da primeira etapa faz com que a taxa de extração na segunda etapa diminua. Isto pode ser observado nas curvas obtidas a 100/250 bar e 150/250 bar onde a inclinação da curva da segunda etapa de extração é mais acentuada quando se utiliza uma condição de 100 bar para a primeira etapa. Com o aumento da pressão de 250 para 300 bar na segunda etapa ocorre uma pequena diminuição da taxa de extração. O mesmo comportamento foi observado nos experimentos de rendimento global onde o rendimento da segunda etapa de extração na condição de 250 bar foi superior ao obtido a 300 bar (Tabela 5.5). A curva da ESC-U da própolis realizada a 250 bar apresenta maior inclinação no início da extração que as curvas da ESC-S. Porém para uma razão de $M_{CO_2} / M_{sólido}$ acima de 40 o rendimento da ESC-U a 250 bar e da ESC-S a 150/250 bar é o mesmo.

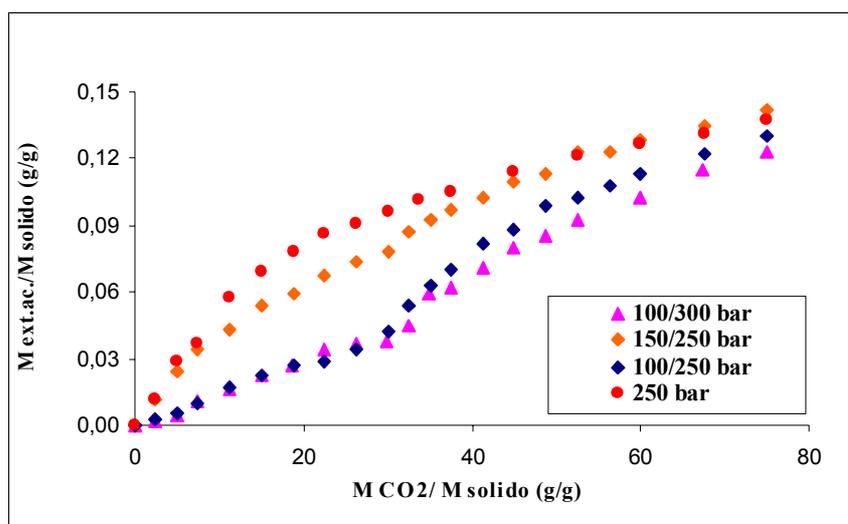


Figura 5.11 – Gráfico das ESC seqüenciais e ESC-U da própolis para a temperatura de 40°C, vazão de 5 g/min e pressões de 250, 100/250; 150/250 e 100/300 bar.

b) Modelagem Matemática

Para a modelagem das curvas de extração da própolis foram utilizados dois modelos de transferência de massa baseados no balanço de massa do leito de extração: o modelo apresentado por Sovová (1994) e o modelo logístico (LM) apresentado por Martínez *et al.* (2003); e dois modelos baseados na analogia à transferência de calor: o modelo difusivo de placa (SSP) apresentado por Gaspar *et al.* (2003) e o modelo de difusão proposto por Crank e apresentado por Reverchon (1997). As equações dos modelos utilizados são apresentadas no item 3.6.6 com detalhamento no Apêndice I.

A aplicação dos modelos exige o conhecimento de algumas variáveis do processo como densidade do solvente (Tabela 5.4); densidade do sólido, diâmetro da partícula e porosidade do leito (Tabela 5.14); altura e raio do leito de extração, solubilidade (Y^*), fração de soluto extraível (x_0), conteúdo total de soluto presente na fase sólida (O) e massa total de sólido presente no extrator (m_t).

A altura e o raio do leito de extração foram de 8,60 e 1,05 cm para o equipamento de ESC 1 e de 9,10 e 1,02 cm para o equipamento ESC 2. A solubilidade foi calculada conforme o item 4.11 para a condição de 200 bar e 40 °C e o valor obtido de 5×10^{-3} g de extrato/g de CO_2 foi utilizado para a modelagem de todas as curvas de extração. O conteúdo total de soluto presente na fase sólida (O) foi determinado considerando que o rendimento obtido no final de cada curva de extração corresponde a 90 % do total de soluto presente na matriz sólida (Michielin, 2005; Ferreira, 1996; Campos, 2005). A fração de soluto extraível (X_0) foi obtida pela razão do conteúdo total de soluto presente na fase sólida (O) corrigido para 100 % pela massa de inerte (N) conforme descrito no Apêndice I.

Os parâmetros t_{CER} (tempo de duração da etapa CER), M_{CER} (taxa de extração da etapa CER) e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) necessários para a aplicação do modelo de Sovová foram determinados utilizando o pacote estatístico SAS for Windows – versão 8.5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) conforme o item 4.11 e são apresentados na Tabela 5.15. As curvas ajustadas pelo SAS para a determinação dos parâmetros estão apresentadas no Apêndice III.

A concentração de soluto na fase solvente Y_{CER} é determinada através da inclinação da parte linear da curva de ESC que representa a etapa CER. Segundo a Tabela 5.15 maiores concentrações de soluto na fase solvente são obtidas com maiores densidades de CO_2 (Tabela 5.4). O maior valor de Y_{CER} foi de $4,28 \times 10^{-3}$ g extrato/g CO_2 para a maior densidade de CO_2

utilizada $0,880 \text{ g/cm}^3$, onde o número de compostos solúveis é maior devido ao aumento do poder de solvatação do solvente supercrítico.

Os coeficientes de transferência de massa para a fase sólida (k_{xa}) e fluida (k_{ya}) e a razão mássica de soluto de difícil acesso (X_k), ajustados pelo modelo de Sovová, são apresentados na Tabela 5.15 em função das condições de pressão (P), temperatura (T) e vazão de CO_2 (Q_{CO_2}) utilizadas para a obtenção das curvas de ESC da própolis.

Tabela 5.15 – Parâmetros de processo do modelo de Sovová na modelagem da ESC da própolis.

P/T/ Q_{CO_2} (bar/°C/g/min)	t_{CER} (min)	$M_{\text{CER}} \times 10^2$ (g/min)	$Y_{\text{CER}} \times 10^3$ (g/g)	$X_k \times 10^2$ (g/g)	$k_{ya} \times 10^2$ (min^{-1})	$k_{xa} \times 10^3$ (min^{-1})
100/40/5	97,38	0,80	1,60	4,54	10,3	4,91
150/40/5	94,07	1,79	3,58	2,69	27,08	5,79
250/40/5	80,97	2,14	4,28	0,55	37,01	6,01
100/50/3	47,09	1,96	0,65	2,21	3,66	4,11
150/40/3	150,00	1,00	3,35	2,31	14,27	3,85

Como pode ser observado na Tabela 5.15 o valor da constante k_{ya} aumenta com o aumento da vazão de solvente já que esta constante representa o coeficiente de transferência de massa na fase fluida o qual é afetado pela velocidade de escoamento do fluido. Os valores obtidos para o coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{xa}) foram inferiores aos valores do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{ya}) o que indica uma maior influência do processo convectivo na ESC da própolis (Martínez *et al.*, 2003).

Os parâmetros ajustáveis do modelo LM (b e t_m), modelo de difusão (D) e modelo SSP (Dm) para as ESC da própolis em uma etapa e seqüencial são apresentados na Tabela 5.16. A curva de ESC seqüencial (S) obtida a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, vazão de $5 \text{ g}_{\text{CO}_2}/\text{min}$ e pressões de 100/250 bar foi modelada considerando as duas etapas independentemente. O conteúdo total de soluto presente na fase sólida (O) para a segunda etapa de extração foi determinado como a diferença entre a massa de soluto acumulada no final da curva de ESC seqüencial e a massa de soluto acumulada para a primeira etapa de extração. O parâmetro ajustável t_m corresponde ao tempo em que a taxa de extração é máxima, porém, para a maioria das curvas de extração modeladas este valor é negativo, perdendo seu significado físico. Nestes casos, a taxa de extração é decrescente, ou seja, atingiu o seu valor máximo no instante inicial da extração, no tempo igual a zero (Martínez, 2003).

Tabela 5.16 - Parâmetros ajustáveis: Modelo de difusão (D); Modelo LM (b, tm) e Modelo SSP (Dm).

P/T/Q_{CO2} (bar/°C/g/min)	D x 10¹¹ (m ² /min)	b x 10³ (min ⁻¹)	tm (min)	Dm x 10¹¹ (m ² /min)
100/40/5	0,95	5,56	-610,39	1,37
150/40/5	1,23	6,73	-6564,05	1,72
250/40/5	1,25	6,73	-6549,05	1,74
100/50/3	0,55	5,60	23,80	0,85
150/40/3	0,91	5,05	-6990,10	1,31
S100/40/5	1,76	25,55	47,36	2,76
S250/40/5	1,71	9,85	-313,03	2,46

O melhor ajuste do modelo de Sovová foi obtido para a curva de extração realizada na condição de 100 bar, 50 °C e 3 g_{CO2}/min conforme pode ser observado pelo valor de erro médio quadrático apresentado na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 – Erros médios quadráticos entre os resultados experimentais e modelados das curvas de ESC da própolis.

P/T/Q_{CO2} (bar/°C/g/min)	Sovová x10 ²	LM (Martínez) x 10 ²	SSP x 10 ²	Difusão (Crank) x 10 ²
100/40/5	1,53	0,18	0,66	1,39
150/40/5	11,20	1,80	1,76	2,93
250/40/5	23,76	2,37	1,19	2,51
100/50/3	0,66	0,02	0,22	0,32
150/40/3	6,07	1,06	2,04	3,41
S100/40/5	-	0,11	1,18	1,54
S250/40/5	-	0,07	1,18	2,54

Para todas as curvas de extração modeladas o modelo de Sovová subestimou a etapa de taxa constante de extração (CER) e superestimou a etapa de taxa decrescente de extração (FER). O comportamento do modelo para a etapa CER deve-se provavelmente ao valor de solubilidade utilizado já que esta varia com as condições de operação e neste trabalho um único valor foi utilizado para todas as condições. Os fenômenos de transporte que ocorrem

durante o processo de extração são bem explicados pelo modelo de Sovová, assim como as características do substrato sólido como o tamanho das partículas e a porosidade. Porém, o modelo de Sovová apresentou os maiores desvios entre os resultados experimentais e modelados em todas as condições utilizadas. Isto ressalta a importância da definição correta dos parâmetros a serem utilizados na modelagem das curvas de extração através do modelo de Sovová.

Martínez *et al.* (2003) obteve bons ajustes para as curvas de ESC de oleoresina de gengibre utilizando o modelo de Sovová e o modelo LM sendo que este último apresentou os menores desvios quadrados médios ou seja, proporcionou os melhores ajustes.

A Figura 5.12 apresenta os dados experimentais obtidos para a ESC da própolis a 250 bar, 40 °C e 5 g_{CO2}/min, bem como as curvas ajustadas para os quatro modelos utilizados. Como pode ser visto, os modelos SSP, Crank e LM apresentaram os melhores ajustes nesta condição de extração, com erros médios quadráticos de $1,19 \times 10^{-2}$, $2,51 \times 10^{-2}$ e $2,37 \times 10^{-2}$, respectivamente (Tabela 5.17). As condições de contorno estabelecidas para os modelos SSP e Crank consideram que a concentração de soluto na superfície da partícula sólida é igual a zero em qualquer tempo de extração. Ou seja, a transferência de massa é infinita na superfície da partícula não existindo resistência à transferência de massa na fase fluida.

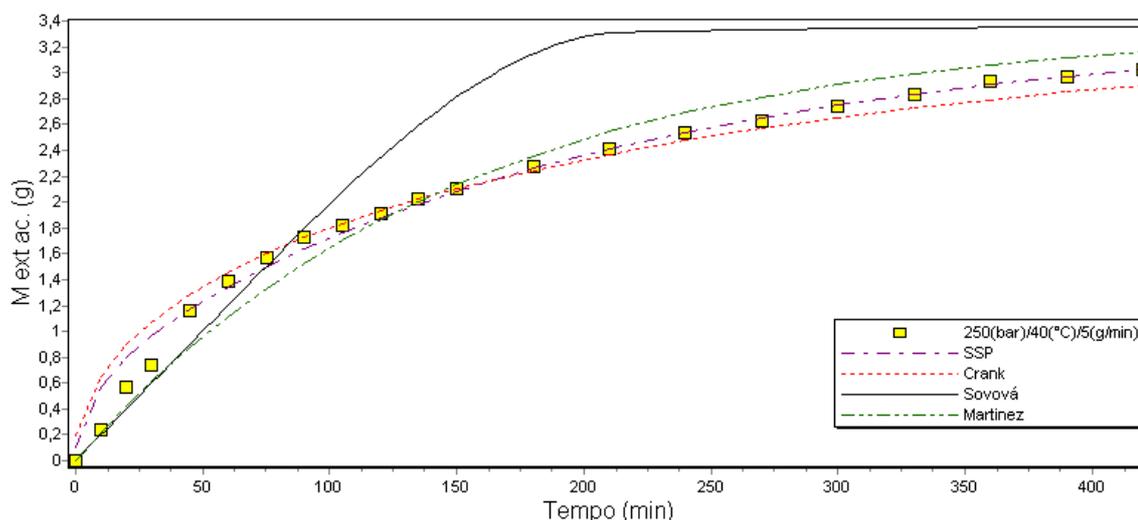


Figura 5.12 – Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de própolis para a condição de 250 bar, 40°C e 5 g_{CO2}/min.

Como pode ser visto na Figura 5.13 o modelo LM apresentou o melhor ajuste para a condição de ESC de 100 bar, 40 °C e 5 g_{CO2}/min com o menor erro médio quadrático

(Tabela 5.17). De todas as curvas modeladas de ESC as obtidas na pressão de 100 bar apresentaram os menores erros médios quadráticos (Tabela 5.17).

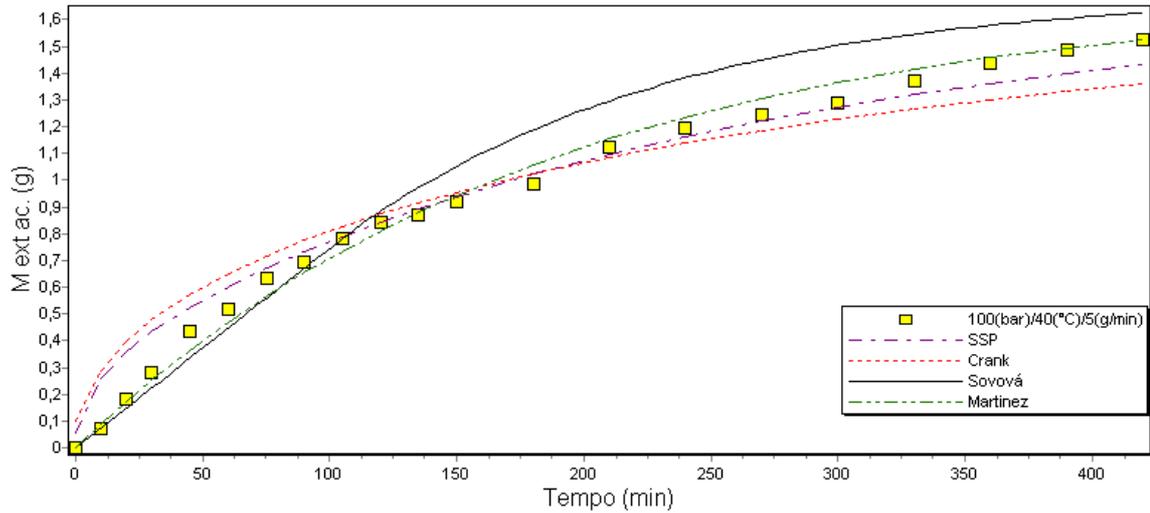


Figura 5.13 – Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de própolis para a condição de 100 bar, 40°C e 5 g_{CO2}/min.

A Figura 5.14 apresenta as curvas experimentais e modeladas para as condições de ESC de 150 bar, 40 °C e vazões de 3 e 5 g_{CO2}/min. O aumento da vazão de solvente de 3 para 5 g_{CO2}/min proporciona um aumento na inclinação da primeira parte da curva de extração que representa a etapa CER. Ou seja, ocorre um aumento da taxa de extração na etapa CER (M_{CER}) e conseqüentemente uma diminuição do tempo de duração desta etapa (t_{CER}) conforme os dados apresentados na Tabela 5.15.

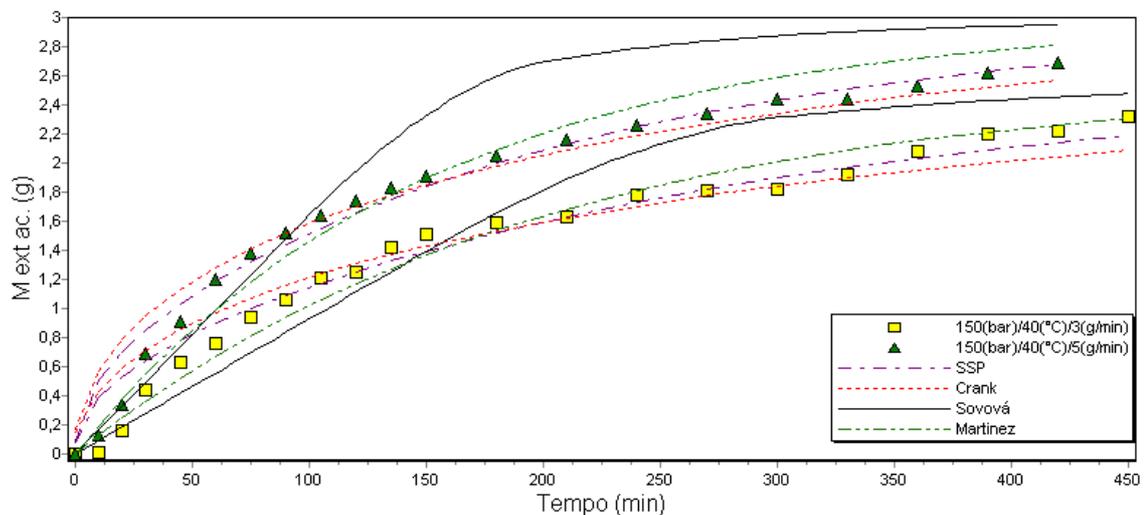


Figura 5.14 – Curvas de extração experimental e modeladas da ESC de própolis para a condição de 150 bar, 40°C e vazões de 3 e 5 g_{CO2}/min.

Como o modelo de Sovová apresentou os piores ajustes para as curvas de ESC em etapa única da própolis, e devido a dificuldade de obter todos os parâmetros necessários para a aplicação deste modelo, a modelagem da ESC seqüencial foi realizada apenas com os modelos SSP, Crank e LM.

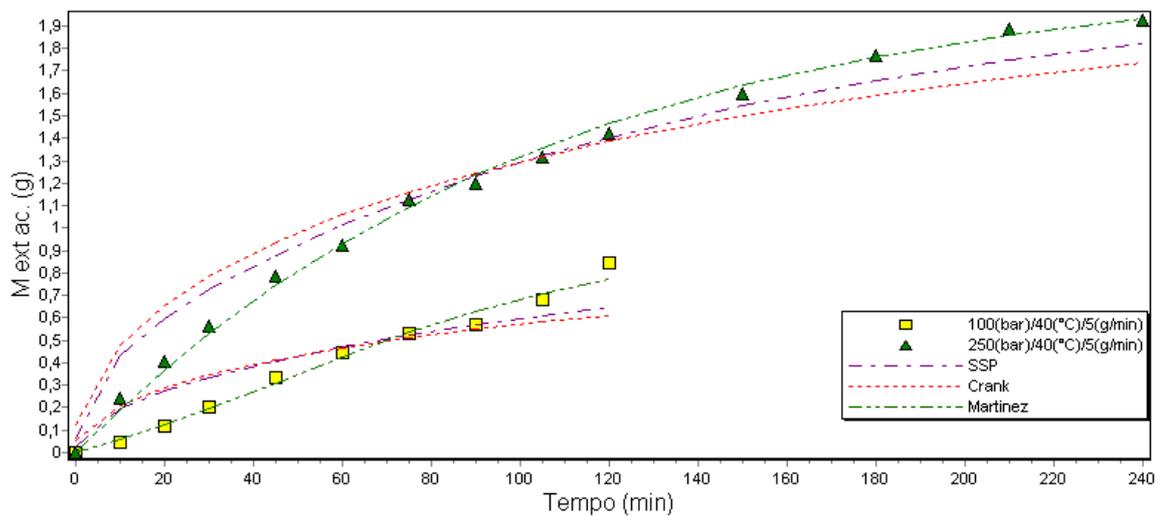


Figura 5.15 - Curvas experimentais e modeladas para a ESC seqüencial da própolis na condição de 40 °C, vazão de 5 g_{CO2}/min e pressões de 100 e 250 bar.

Conforme pode ser observado na Figura 5.15 o modelo LM apresentou o melhor ajuste para a curva de ESC seqüencial para a condição de 40 °C, vazão de 5 g_{CO2}/min e pressões de 100 e 250 bar. Os modelos difusivos superestimam a etapa CER e subestimam a etapa FER enquanto o modelo LM proporciona curvas de extração que descrevem bem todos os períodos do processo

5.5.4. Conclusão

Para todas as curvas de ESC da própolis os menores erros médios quadráticos foram obtidos para o modelo LM, com exceção da curva obtida a 250 bar, 40 °C e vazão de 5 g_{CO2}/min onde o modelo SSP se ajusta melhor (Tabela 5.17). O melhor ajuste apresentado para o modelo LM provavelmente ocorre porque este modelo possui dois parâmetros ajustáveis b e t_m enquanto os modelos SSP e Crank apresentam um parâmetro ajustável cada. A utilização de modelos matemáticos para a descrição das curvas de extração da própolis é essencial na otimização de processos de ESC em escala industrial.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram obtidos extratos de própolis através de diferentes técnicas de extração como: ESC em etapa única com e sem co-solvente, ESC em duas etapas sequenciais, extração soxhlet e maceração, os quais foram comparados em termos de rendimento de processo, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e perfil químico. Os resultados apresentados neste trabalho para os diversos extratos de própolis permitiram as seguintes conclusões:

As técnicas convencionais de extração como a maceração e a extração soxhlet proporcionam rendimentos superiores aos obtidos através da ESC da própolis, porém a utilização de 5 % (m/m) de etanol na ESC como co-solvente aumenta o rendimento em cerca de três vezes em relação ao obtido com CO₂ puro. O solvente clorofórmio de polaridade intermediária proporcionou o maior rendimento de extração entre todos, o que evidencia que a própolis possui grande quantidade de compostos de polaridade intermediária.

A maceração com a mistura etanol/água 50 % (v/v) resultou no extrato com a melhor atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais, sendo que os extratos obtidos através das extrações convencionais apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante e fenólicos totais que os extratos obtidos através de ESC.

O aumento da pressão de operação na ESC em etapa única com CO₂ puro proporciona extratos com maiores atividades antioxidantes. Já a ESC sequencial da própolis resultou em uma fração com maior atividade antioxidante na segunda etapa de extração, se comparada com a ESC em etapa única nas mesmas condições. A utilização de 5 % (m/m) de etanol como co-solvente na ESC em etapa única aumenta a atividade antioxidante do extrato em 29,1 % e o conteúdo de fenólicos em 50 % quando comparado ao extrato obtido nas mesmas condições de operação utilizando CO₂ puro.

A atividade antioxidante dos extratos de própolis está relacionada à presença de compostos fenólicos como o Artepillin C, o qual foi extraído com a utilização de 5 % (m/m) de etanol como co-solvente da ESC.

As técnicas convencionais de extração produziram extratos susceptíveis ao crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Apenas os extratos obtidos a 100 e 150 bar com CO₂ puro apresentaram atividade contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, sendo que os melhores resultados de CMI e CMB foram obtidos na condição de 150 bar e 40 °C. Os extratos obtidos através de ESC com CO₂ puro a altas pressões como 200 e 250 bar

apresentam melhor atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* que os extratos produzidos a baixas pressões como 100 e 150 bar.

Os compostos DCBEN, Artepillin C e DPB estão relacionados à atividade antimicrobiana contra as bactérias *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, porém outros compostos além destes devem estar envolvidos na atividade contra a bactéria *Escherichia coli*.

Os extratos supercríticos apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana quando comparados aos extratos convencionais, principalmente contra o *Staphylococcus aureus*, inativando-o com as menores concentrações de extrato.

O modelo que melhor descreveu o processo de extração supercrítica da própolis foi o modelo LM. O que pode ter favorecido um melhor ajuste deste modelo aos dados experimentais é a existência de dois parâmetros ajustáveis (b e t_m) enquanto os modelos SSP e Crank apresentam um parâmetro ajustável cada. Já o modelo de Sovová não se ajustou bem aos dados experimentais da ESC da própolis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. Curitiba, 2005. Tese de mestrado em Ciências Farmacêuticas - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná –UFPR.

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S.H. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** v.58, p.945-946. 1994.

AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S.M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Talanta**, v. 62, p. 407-411, 2004.

ALICEweb – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em < <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/default.asp>>. Acesso em: 23 nov. 2006.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K.M. **International thermodynamic tables of the fluid state**. v.3. Carbon Dioxide. Pergamon Press, 1976.

A.O.A.C. – Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. 11 ed. Washington. D>C> 1141, 1990.

APICULTURA. Disponível em: < <http://www.breyer.ind.br/apicultura/apicultura.htm>> Acesso em: 16 abr. 2006.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

BANKOVA, V. Chemical diversity of Propolis and the Problem of Standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114-117, 2005.

BANKOVA, V., CHRISTOV, R., KUJUMGIEV, A., MARCUCCI, M. C. E POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, v.29, p. 167-172, 1995.

BANKOVA, V. S; MARCUCCI, M.C. Standardization of propolis: Present Status and Perspectives, **Bee World**, v. 81, n.4, p. 182-188, 2000.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y; ADNYANA, I; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 239–246, 2000.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities. **J. Nat. Prod.** v.61, p. 896-900, 1998.

BRASIL, Instrução Normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001. Ministério da Agricultura e do Abastecimento – DIPOA - Regulamento Técnico de Identidade e qualidade da própolis, Anexo VI.

BRUNNER,G. Gás Extraction: na introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. Darmstadt, Alemanha: Steikopff, Springer, 1994. 387p.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.

BYERS, J. A. Catálogo Phenomenex. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>>. Acesso em 05/nov. de 2006.

CAMPOS, L.M.A.S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*): parâmetros de processo e modelagem matemática**. Florianópolis, 2005. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

CAMPOS, L.M.A.S.; MICHIELIN, E.M.Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S.R.S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **Journal of Supercritical Fluids**, v.34, p. 163–170, 2005.

CATCHPOLE, O.J.; GREY, J.B., MITCHELL, K.A., LAN, J.S. Supercritical Antisolvent Fractionation of Propolis Tincture. **Journal of Supercritical Fluids**, v.29, p.97-106, 2004.

CAVERO, S.; JAIME,L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; SEÑORÁNS,F.J.; REGLERO,G.; IBAÑEZ, E. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) **Eur. Food Res. Technol.**, v.221, p.478-486, 2005.

CORREIA, J.; MICHIELIN, E.M.Z.; FERREIRA, S.R.S. Estudo de modelos de transferência de massa para processos de extração supercrítica. Florianópolis: 2006. 31 p. Relatório de iniciação científica (PIBIC- CNPQ). Departamento de Engenharia Química e de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.

CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; CAETANO, F.M.; SHIMIZU, M.T.; MARCUCCI, M.C.; DREZZA, F.T.; POVIA, G.S.; CARVALHO, P.O. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.15, n.6, p.964-970, 2004.

DANIELSKI, L.; MICHIELIN, E.M.Z.; FERREIRA, S.R.S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.1054–1059, 2007.

DANIELSKI, L. **Solubilidade das Oleoresinas de Calêndula (*Calendula officinalis* L) e Cavalinha (*Equisetum arvense*) em CO₂ supercrítico**. Florianópolis, 2002. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUES, H.; PARAJÓ, J.C. Supercritical CO₂ Extration and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **J. Agric. Food Chem.** v.54, p. 2441-2469, 2006.

FERREIRA, S. R. S.; 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, 2002.

FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z.; DORAISWAMY, L.K.; MEIRELES, M.A.A; PETENATE, A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper Nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**. v.14, n.3, p. 235, 1999.

FERREIRA, S.R.S.; MEIRELES, M.A.A.; CABRAL, F.A. Extraction of essencial oil of black pepper with liquid carbon dioxide. **Journal of Food Engeneering**, v.20, p.121-133, 1993.

FERREIRA, S. R. S. **Cinética de transferência de massa na extração supercrítica de óleo essencial de pimenta-do-reino**. Campinas, 1996. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FKI, I.; ALLOUCHE, N.; SAYADI, S. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. **Food Chemistry**. v. 93, p. 197-204, 2005.

GASPAR, F.; LU, T.; SANTOS, B.; AL-DURIN, B. Modeling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**. v.25, n.3, p.247-260, 2003.

GENENA, A.K. **Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): estudo de sua ação antioxidante**. Florianópolis, 2005. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

GINZBURG, E., NAMIAS, N., BROWN, M., BALL, S., HAMEED, S. M. E COHN, S. M. Gram positive infection in trauma patients: new strategies to decrease emerging Gram-positive resistance and vancomycin toxicity. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. S39-S42, 2000.

GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares** – São Paulo: Catalogação na Publicação Câmara Brasileira do Livro, v.1, p. 13-43, 1983.

GUZMÁN, J.F.P. **Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas das própolis produzidas no Peru**. Campinas, 2005. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 1999. 543 p.

IBÁÑEZ, E.; OCA, A.; MURGA, G.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, S.; TABERA, J.; REGLERO, G. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Different Preprocessed Rosemary Plants. **J. Agric. Food Chem.** v. 47, p.1400-1404, 1999.

ITO, J.; CHANG, F-R.; WANG, H-K.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K-H. Anti-AIDS Agents.48. Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone_Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. **J. Nat. Prod.** v. 64, p. 1278-1281, 2001.

JOCHMANN, A. Extração **Supercrítica de oleoresina de calêndula (*Calendula officinalis*)**. Florianópolis, 2000. Dissertação de mestrado em Engenharia Química – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC.

KIMOTO, N.; HIROSE, M.; KAWABE, M.; SATOH, T.; MIYATAKA, H.; SHIRAI, T. Post-initiation Effects of a Super Critical Extract of Propolis in a Rat Two-stage Carcinogenesis Model in Female F344 Rats. **Cancer Letters**. v.147, p.221-227, 1999.

KITZBERGER, C.S.G.; SMÂNIA JR., A.; PEDROSA, R.C.; FERREIRA, S.R.S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 2. p. 631-638, 2007.

KITZBERGER, C.S.G. **Obtenção de extrato de cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a alta pressão**. Florianópolis, 2005. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

KOLLEF, M.H. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. **Clinical Infections Diseases**, v.31, n.4, p. 131-138, 2000.

KUMAZAWA,S.; HAMASAKA,T.; NAKAYAMA,T. Antioxidant Activity of Propolis of Varios Geographic Origins. **Food Chemistry**. v.84, p.329-339, 2004.

LU, Li-C.; CHEN, Y-W; CHOU, C-C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, p.213-220, 2005.

MARCUCCI, M.C. Própolis Tipificada: Um Novo Caminho para a elaboração de Medicamentos de Origem Natural, Contendo este Produto Apícola. **Revista Fitos**, v.1, n.3, p. 36- 46, 2006.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GUARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic Compounds from Brazilian Própolis with Pharmacollogical Activities. **Journal of Ethnopharmacology**. v.74, p.105-112, 2001.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; CUSTODIO, A. R.; FERREIRA, M.M.C., BANKOVA, V.S.; GARCIA-VIGUERA, C. Evaluation of Phenolic Compounds in Brazilian Propolis from Different Geographical Regions. **Z. Naturforch C**, v.55, p.76-81, 2000.

MARCUCCI, M. C., WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 1998.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos**. Campinas, 2005. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial and Engineering Chemical Research**. v. 42, n.5, p.1057-1063, 2003.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO G. G.; REIS A. S.; SANTOS T. C.; COUBE C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytoterapy Research**. v.15, n.[s/n], p.27-130, 2001.

MICHIELIN, E.M.Z.; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R.A.; FERREIRA, S.R.S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum L.*) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v.33, p. 131-138, 2005.

MICHIELIN, E. M. Z. **Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina de cavalinha (*Equisetum arvense*)**. Florianópolis, 2002. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

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

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v.80, p. 29-33, 2003.

NATUCENTRO. Disponível em: <http://www.natucentro.com.br>. Acesso em: 16 nov. 2006.

NOTHENBERG, M. Própolis enfrenta bem o desafio das pesquisas. **Química e Derivados**, v. 348, p. 24-28, 1997.

NEGRI, G.; MARCUCCI, M.C.; SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brasil. **Apidologie**, v. 29, p. 305-314, 1998.

ÖZCAN, A.; ÖZCAN, A.S. Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*. **Talanta**, v. 64, p. 491-495, 2004.

PALMA, M.; TAYLOR, L. T.; VARELA, R.M.; CUTLER, S.J.; CUTLER, H.G. Fractional Extraction of Compounds from Grape Seeds by Supercritical Fluid Extraction and Analysis for Antimicrobial and Agrochemical Activities. **J. Agric. Food Chem.** v.47, p. 5044-5048, 1999.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis Produzida no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências Fitoquímicas de sua Origem Vegetal. **Ciência Rural**, v.32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v.21, n.2, p.85-90, 2000.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n.11, p. 2230-2232, 1998.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO, F.R.N. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BRUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**. v. 97, p. 137-150, 2005.

POVH, N. P.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). **Journal of Supercritical Fluids**. v.21, n.3, p.245-256, 2001.

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

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**. v.10, n.1, p.1-37, 1997.

ROGINSK Y.V.; LISSI, E.A. Review of Methods to Determine Chain-breaking Antioxidant Activity in Food. **Food Chemistry**. v. 92, p.235-254, 2005.

SANTOYO, S.; LLORÍA, R.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F.J.; REGLERO, G. Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. chemical and functional characterization. **Eur Food Res Technol**. v. 222, p. 565-571, 2006.

SAWAYA, A.C.H.F.; TOMAZELA, D.M.; CUNHA, I.B.S.; BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C.; CUSTODIO, A.R.; BERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **The Analyst**. v.129, p. 739-744, 2004.

SFORCIN, J. M., JR., A. F., LOPES, C. A. M., BANKOVA, V. E FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.

SIMÁNDI, B.; OSZAGYÁN, M., LEMBERKOVICS, E.;KÉRY, A.; KASZÁCS, J.; THYRION, F.; MÁTYÁS, T. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. **Food Research International**, v.31, n. 10, p. 723-728, 1998.

SMÂNIA, E.F.A. **Esteróis e triterpenos isolados de espécies de *ganoderma karsten* e sua atividade antimicrobiana**. Florianópolis, 2003. Tese de Doutorado em Química Orgânica – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

SMÂNIA, A.Jr; 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**, n.45, p. 177-181, 1995.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**. v.49, n.3, p. 409-414, 1994.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85–99, 2004.

VANDEN BERGUE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. **Methods Plant Biochemistry**, p. 47-69, 1991.

VIEIRA, G.R.T. **Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. Visando a produção de substâncias antibacterianas.** Florianópolis, 2005. Tese de mestrado em Biotecnologia – Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2005.

WANG, B-J.; LIEN, Y-H; YU, Z-R.; Supercritical Fluid Extractive Fractionation – Study of the Antioxidant Activities of Propolis. **Food Chemistry**, v.86, p. 237-243, 2004.

WIKIPEDIA: La enciclopedia Libre. Disponível em: http://es.wikipedia.org/wiki/Estado_de_agregaci%C3%B3n_de_la_materia. Acesso em: 16 nov. 2006.

YEPEZ, B.; ESPINOSA, M.; LÓPEZ, S.; BOLAMOS, G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v. 194–197, p. 879–884, 2002.

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. **J. Chin. Inst. Chem. Engrs.**, v.33, n.3, p. 233-241, 2002.

8. APÊNDICES

Apêndice I – Modelos Matemáticos

Diversos modelos matemáticos que descrevem as curvas de extração com fluido supercrítico estão disponíveis na literatura. As equações diferenciais do balanço de massa quando resolvidas fornecem curvas dos perfis de massa de extrato em função do tempo (MARTÍNEZ, 2005).

O leito de extração compreende duas fases: (a) uma fase sólida, formada pelo material de onde o extrato é obtido, e (b) uma fase fluida, composta pelo solvente supercrítico com o extrato dissolvido nele (BRUNNER, 1994).

A ESC é tratada como um leito cilíndrico de partículas sólidas por onde o solvente supercrítico flui axialmente removendo os compostos solúveis da fase sólida. Considera-se que ambas as fases envolvidas no processo ocupam todo o volume do leito de extração. A matéria-prima está distribuída uniformemente ao longo do leito e a temperatura, a pressão e as propriedades físicas de ambas as fases são mantidas constantes durante toda a extração. Com estas considerações o balanço de massa nas fases fluida e sólida é expresso pelas equações I e II respectivamente:

$$\frac{\partial Y}{\partial t} + u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{aY} \frac{\partial Y}{\partial h} \right) + \frac{J(X, Y)}{\varepsilon} \quad \text{Eq.I}$$

Acúmulo Convecção Dispersão TM interfacial

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{aX} \frac{\partial X}{\partial h} \right) - \frac{J(X, Y) \rho}{1 - \varepsilon \rho_s} \quad \text{Eq.II}$$

Acúmulo Difusão TM interfacial

Nas equações I e II, X (g_{óleo}/g_{sólido}) e Y (g_{óleo}/g_{solvente}) são as razões mássicas de soluto nas fases sólida e fluida, respectivamente; t é o tempo (s); h é a coordenada axial no leito de extração(m); u é a velocidade intersticial do solvente (m/s); D_{aY} é o coeficiente de dispersão axial; D_{aX} é o coeficiente de difusão na fase sólida; ρ (kg_{solvente}/m³) é a densidade do solvente; ε é a porosidade total do leito de extração; ρ_s é a densidade do sólido e J(X,Y) é o termo de transferência de massa interfacial (kg/m³.s).

Como pode ser observado, as equações I e II levam em conta todos os fenômenos de transporte que ocorrem durante o processo de ESC: acúmulo em ambas as fases, convecção e

dispersão na fase fluida, difusão na fase sólida e transferência de massa interfacial. A transferência de massa nas direções radial e tangencial do leito de extração pode ser desprezada, pois o comprimento do leito é bem maior que seu diâmetro. A diferença entre os vários modelos disponíveis na literatura está na interpretação dada para cada fenômeno e na possibilidade de negligenciar alguns deles.

Os modelos de transferência de massa avaliados neste trabalho para a descrição das curvas de extração de própolis são apresentados a seguir.

Modelo de Sovová

Este modelo considera que o solvente flui axialmente com velocidade superficial U através do leito de partículas em um extrator cilíndrico. O solvente é livre de soluto na entrada do extrator, e a temperatura e pressão são mantidas constantes. O leito sólido é homogêneo em relação ao tamanho das partículas e a distribuição inicial de soluto.

A massa de soluto contida inicialmente na fase sólida (x_0) é dividida em duas partes: soluto de fácil acesso (x_p) e soluto de difícil acesso (x_k). A trituração da matéria-prima no pré-tratamento da extração pode ocasionar o rompimento das estruturas celulares que contém o soluto tornando-o de fácil acesso para o solvente. No entanto, outras estruturas podem permanecer intactas e o soluto contido nelas será de difícil acesso ao solvente.

Desta maneira, a primeira etapa de extração é caracterizada pelo coeficiente de transferência de massa na fase fluida e a etapa onde o soluto está dentro das células intactas é caracterizada pelo coeficiente de transferência de massa da fase sólida e a característica do modelo é exatamente computar as contribuições de cada etapa em termos de quantidade de soluto (CAMPOS *et al.*, 2005; MICHIELIN, 2002).

A massa de soluto contida inicialmente na fase sólida (O) consiste da massa de soluto facilmente acessível (P) e da massa de soluto dentro das partículas da fase sólida (K). A massa da fase sólida livre de soluto (N) permanece constante durante a extração e as seguintes relações são válidas:

$$O = P + K \quad \text{Eq.III}$$

$$x_0 = \frac{O}{N}; \quad x_k = \frac{K}{N}; \quad x_p = \frac{P}{N} \quad \text{Eq.IV}$$

Os termos referentes à dispersão e ao acúmulo na fase fluida, e a difusão na fase sólida são desprezados por considerar que estes fenômenos não influem significativamente quando

comparados à convecção na fase fluida. Desta maneira, as equações do balanço de massa, propostas pelo modelo de SOVOVÁ (1994) são as seguintes:

Fase sólida:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = \frac{-J(x, y)}{\rho_s(1-\varepsilon)} \quad \text{Eq.V}$$

Fase fluida:

$$U \frac{\partial y}{\partial h} = \frac{J(x, y)}{\rho} \quad \text{Eq.VI}$$

As condições iniciais e de contorno para as equações diferenciais do balanço de massa para as fases sólida e fluida são:

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

Onde: x_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida (g/g).

A solução das equações V e VI que descrevem as curvas de extração para as três etapas do processo é representada pelas seguintes equações:

1- Para $t < t_{\text{CER}}$: período (CER)

$$m_{\text{ext}} = Y^* [1 - \exp(-Z)] Q_{\text{CO}_2} \cdot t \quad \text{Eq.VII}$$

2- Para $t_{\text{CER}} \leq t < t_{\text{FER}}$: período (FER)

$$m_{\text{ext}} = Y^* [t - t_{\text{CER}} \cdot \exp(z_w - Z)] Q_{\text{CO}_2} \quad \text{Eq.VIII}$$

3- Para $t \geq t_{\text{FER}}$: período controlado pela difusão

$$m_{\text{ext}} = N \left\langle x_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp\left(\frac{W x_0}{Y^*}\right) - 1 \right] \exp\left[\left(\frac{W \cdot Q_{\text{CO}_2}}{N}\right)(t_{\text{CER}} - t)\right] \frac{x_k}{x_0} \right\} \right\rangle \quad \text{Eq. IX}$$

Onde: m_{extr} é a massa de extrato (g), t_{CER} é a duração da etapa constante de extração (s), t_{FER} é o período de taxa decrescente de extração (s), N é a massa de matéria-prima livre de soluto (g), Y^* é a solubilidade (g/g), Q_{CO_2} é a vazão média do solvente (kg/s), x_0 é a razão mássica

inicial de soluto na fase sólida, x_k é a razão mássica de soluto no interior de células intactas e W é um parâmetro para o período de taxa de extração lenta.

A quantidade Z é um parâmetro para o período CER porque esta quantidade (Z) é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Ya}) e este coeficiente controla a taxa de extração no período CER:

$$Z = \frac{N \cdot k_{Ya} \cdot \rho}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \rho_s}$$

Eq.X Para a solução do modelo de Sovová, é necessário o conhecimento dos seguintes parâmetros (CAMPOS et al., 2005; MICHIELIN, 2002; POVH et al., 2001):

- M_{CER} : Taxa de extração na etapa CER (kg/s);
- Y_{CER} : Razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER (kg_{extrato}/kg_{CO2});
- t_{CER} : Duração da etapa CER (s).

Esses parâmetros podem ser obtidos pelo ajuste simultâneo de duas retas sob a curva de extração (massa de óleo acumulada versus tempo de extração) com o auxílio do pacote estatístico SAS. O parâmetro M_{CER} é o valor da tangente ao período CER e a partir do mesmo obtêm-se o valor de Y_{CER} através da equação:

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq.XI}$$

As demais restrições e definições são descritas a seguir:

$$t_{CER} = \frac{x_0 - x_k}{Y^* Z} \frac{N}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq.XII}$$

$$\frac{z_W}{Z} = \frac{Y^*}{W \cdot x_0} \ln \left\{ \frac{x_0 \cdot \exp\left[\left(\frac{W \cdot Q_{CO_2}}{N}\right)(t - t_{CER})\right] - x_k}{x_0 - x_k} \right\} \quad \text{Eq.XIII}$$

$$W = \frac{N \cdot k_{Xa}}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon)} = k \frac{Z \cdot Y^*}{x_k} \quad \text{Eq.XIV}$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2} \cdot W} \ln \left[\frac{x_k + (x_0 - x_k) \cdot \exp\left(\frac{W \cdot x_0}{Y^*}\right)}{x_0} \right] \quad \text{Eq.XV}$$

Modelo Logístico (LM) – Martínez

Martínez *et al.* (2003) propôs um modelo matemático que pode ser aplicado considerando o extrato como um único pseudocomposto ou como uma mistura de substâncias ou grupos de compostos de estrutura química similar. A equação do balanço de massa no leito de extração para a fase fluida é a mesma utilizado por Sovová e apresenta-se da seguinte forma:

$$u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X, Y)}{\varepsilon} \quad \text{Eq.XVI}$$

Com a seguinte condição de contorno:

$$Y(h = 0, t) = 0 \quad \text{Eq.XVII}$$

O termo de transferência de massa interfacial $J(X, Y)$ foi definido como uma função de S que depende da composição do extrato ao longo do processo. A equação logística, usualmente aplicada para modelar o crescimento populacional foi escolhida para descrever a variação da composição do extrato e uma de suas soluções foi incorporada dentro do termo de transferência de massa interfacial.

$$J(X, Y) = S = \sum_{i=1}^n S_i \quad \text{Eq.XVIII}$$

$$S_i(t) = \frac{A_i b_i \exp[b_i(t_{mi} - t)]}{\{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]\}^2} \quad \text{Eq.XIX}$$

Onde: A , b e t_m são parâmetros do modelo e o subscrito i corresponde a um único composto do soluto ou grupo de compostos com características semelhantes.

Integrando a equação XVI com a condição de contorno da equação XVII, a equação para a razão mássica de extrato na fase fluida é obtida:

$$Y(h = H, t) = \frac{H}{u\varepsilon} \sum_{i=1}^n S_i \quad \text{Eq.XX}$$

Onde: H é o comprimento total do leito de extração, u é a velocidade intersticial do solvente (m^3/s) e ε é a porosidade total do leito de extração.

A equação da curva de extração é obtida integrando a equação XX com a condição inicial da equação XXI:

$$m(h, t = 0) = 0 \quad \text{Eq.XXI}$$

$$m(h = H, t) = \int_0^t y Q_{\text{CO}_2} dt = \frac{Q_{\text{CO}_2} H}{u\varepsilon} \sum_{i=1}^n \int_0^t S_i dt \quad \text{Eq.XXII}$$

Para um único grupo de compostos, a curva de extração pode ser representada pela equação XXIII que mostra o resultado da integração da função S.

$$m_i(h = H, t) = \frac{Q_{CO_2} HA_i}{u\varepsilon} \left\{ \frac{1}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - \frac{1}{1 + \exp(b_i t_{mi})} \right\} \quad \text{Eq. XXIII}$$

A princípio o modelo LM possui, para cada grupo de compostos, três parâmetros ajustáveis: A_i , b_i e t_{mi} . Se a composição do soluto tiver sido determinada experimentalmente, é possível obter o valor aproximado da massa total de cada grupo de compostos:

$$m_{totali} = \frac{\%m_t}{100} = x_{0i} m_t \quad \text{Eq. XXIV}$$

Onde: m_t é a massa total de sólidos na coluna de extração, x_0 é a razão mássica inicial de soluto extraível e m_{totali} é a massa total de cada grupo de composto.

Desta forma, o modelo pode ser reduzido a dois parâmetros ajustáveis, b e t_m , e a massa de cada grupo de compostos representada pela equação XXV.

$$m_i(h = H, t) = \frac{x_{0i} m_t}{\exp(b_i t_{mi})} \left\{ \frac{1 + \exp(b_i t_{mi})}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - 1 \right\} \quad \text{Eq. XXV}$$

Quando o soluto é considerado como um pseudocomponente, a massa de soluto pode ser descrita como:

$$m_{ext}(h = H, t) = \frac{m_0}{\exp(bt_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(bt_m)}{1 + \exp[b(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad \text{Eq. XXVI}$$

Sendo: $m_0 = x_0 m_t$

Onde: m_{ext} é a massa de soluto extraída (g), m_0 é massa inicial total de óleo (soluto) no leito de extração (g), t é o tempo de extração (s), b e t_m são parâmetros ajustáveis do modelo LM expressos em (s^{-1}) e (s), respectivamente. O parâmetro t_m corresponde ao instante em que a taxa de extração de cada grupo de compostos ou um único pseudocomposto alcançou um máximo (MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

Modelo de Crank

O modelo de CRANK (1975) apresentado por REVERCHON (1997) considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor, considerando-se cada partícula sólida como um corpo quente que perde calor com o tempo para o meio, e supondo que as substâncias a serem extraídas encontram-se uniformemente distribuídas na partícula

sólida. Neste caso, a partícula sólida esférica é o sólido que contém o óleo a ser extraído e o meio é o solvente supercrítico (MARTÍNEZ, 2002; REVERCHON, 1997).

De acordo com a segunda Lei de Fick, restrita para o caso de difusão unicamente radial, com o coeficiente de difusão constante, a concentração de soluto na fase sólida é dada por:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = D_{AB} \nabla^2 x = D_{AB} \frac{\partial^2 x}{\partial r^2} \quad \text{Eq. XXVII}$$

Onde: D_{AB} é o coeficiente de difusão da segunda Lei de Fick (m^2/min), r é a direção radial (m) e α é o coeficiente de transferência de calor.

Aplicando a segunda Lei de Fick para a difusão, e resolvendo analiticamente o balanço de massa na superfície interna da partícula, tem-se a seguinte equação que representa a massa de uma substância que se difunde através de uma partícula:

$$m_{\text{ext}} = m_0 \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D t}{r^2}\right) \right] \quad \text{Eq. XXVIII}$$

Onde: D é o coeficiente de difusão, um parâmetro ajustável do modelo, r é o raio da partícula sólida e n é um número inteiro.

Modelo de Placa (SSP)

O modelo de placa, proposto por GASPAR *et al.* (2003) também considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor como o modelo de Crank. A diferença entre esses dois modelos é que no modelo SSP as partículas sólidas são consideradas como placa enquanto que no modelo de difusão as partículas são consideradas esféricas.

O modelo de placa (GASPAR *et al.*, 2003) assume que:

- (a) As partículas sólidas são consideradas como placas;
- (b) A concentração de soluto na fase fluida é negligenciável quando comparada à concentração na fase sólida;
- (c) A resistência à transferência de massa na fase fluida é negligenciada;
- (d) O balanço de massa na fase fluida é negligenciado

Aplicando a segunda Lei de Fick para a difusão, e resolvendo analiticamente o balanço de massa na superfície interna da partícula, a massa de extrato obtida com o tempo é

representada pela seguinte equação (GASPAR *et al.*, 2003) com a modificação apresentada por CAMPOS *et al.* (2005):

$$m_{ext} = m_0 \left[1 - \sum_0^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2} \exp\left(\frac{-D_m (2n+1)^2 \pi^2 t}{\delta^2}\right) \right] \quad \text{Eq. XXIX}$$

Onde: m_{ext} é a massa de óleo extraída (g), m_0 é o conteúdo inicial de óleo na fase sólida (g), D_m representa a difusividade na matriz sólida (m^2/min), δ é a espessura das partículas (placas) (m) e n é um número inteiro.

Apêndice II – Resultados de atividade antioxidante e curva padrão de ácido gálico.

Tabela I - Atividade Antioxidante dos extratos obtidos através de extrações convencionais e ESC em etapa única para todas as concentrações de extratos testadas.

	Concentração de extrato ($\mu\text{g/mL}$)					
	5	10	25	50	125	250
	Extrações convencionais					
SoxH ₂ O	2,8 ± 0,2	6,6 ± 0,2	17,6 ± 0,7	37,4 ± 0,9	86,2 ± 0,3	92,2 ± 0,2
SoxEtOH	2,8 ± 0,1	6,6 ± 0,1	15,8 ± 0,4	28 ± 1	61,9 ± 0,9	89,7 ± 0,3
SoxAcEt	4,7 ± 0,5	5,8 ± 0,7	12,3 ± 0,2	12,3 ± 0,2	42,5 ± 0,2	68,8 ± 0,7
SoxHex	2,2 ± 0,5	3,9 ± 0,4	6,3 ± 0,6	10,8 ± 0,5	23,3 ± 0,6	42 ± 1
SoxCHCl ₃	3,6 ± 0,6	5,5 ± 0,5	10,5 ± 0,3	17 ± 2	32,9 ± 0,4	53,9 ± 0,9
MacEtOH	4,7 ± 0,5	7 ± 2	15,8 ± 0,7	26 ± 1	54,8 ± 0,8	85,5 ± 0,9
MacEtH ₂ O50%	6,5 ± 0,4	12,6 ± 0,1	30 ± 1	57,6 ± 0,6	91,6 ± 0,1	93,1 ± 0,3
MacEtH ₂ O70%	3,4 ± 0,2	5 ± 2	17,3 ± 0,4	31 ± 1	69,6 ± 0,3	92 ± 0
	ESC etapa única					
P/T/Q _{CO₂}						
(bar)/(°C)/(g _{CO₂} /min)						
100/30/3	0,7 ± 0,5	1,0 ± 0,7	3,10 ± 0,06	5,9 ± 0,6	14,4 ± 0,1	28,9 ± 0,4
100/40/3	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,3	3,0 ± 0,1	5,20 ± 0,09	11,7 ± 0,3	21,0 ± 0,7
100/50/3	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,3	1,10 ± 0,06	3,2 ± 0,3	10,6 ± 0,5	21,3 ± 0,6
150/30/3	1,0 ± 0,6	1,9 ± 0,3	3,3 ± 0,3	6,3 ± 0,5	16,6 ± 0,4	32,6 ± 0,3
150/40/3	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,2	4,32 ± 0,06	6,8 ± 0,9	17,9 ± 0,3	34,8 ± 0,5
150/50/3	0,6 ± 0,3	1,2 ± 0,3	2,5 ± 0,3	6,3 ± 0,3	15,6 ± 0,4	31 ± 2
200/30/3	0,5 ± 0	2,20 ± 0,09	5,4 ± 0,5	9,2 ± 0,1	19,9 ± 0,6	35,2 ± 0,2
200/40/3	0,4 ± 0,2	1,0 ± 0,8	3,2 ± 0,2	6,5 ± 0,4	16,0 ± 0,2	30,8 ± 0,5
200/50/3	1,4 ± 0,1	2,6 ± 0,5	4,4 ± 0,1	7,0 ± 0,6	17,8 ± 0,1	34 ± 1
250/40/5	1,0 ± 0,3	2,2 ± 0,4	5,0 ± 0,6	10,2 ± 0,2	22,7 ± 0,5	42,0 ± 0,7

Tabela II - Atividade Antioxidante dos extratos obtidos através de ESC com co-solvente e ESC seqüencial para todas as concentrações de extratos testadas.

	Concentração de extrato ($\mu\text{g/mL}$)					
	5	10	25	50	125	250
ESC com co-solvente						
P/T/Q _{CO2} /co-solvente						
(bar)/(°C)/(g _{CO2} /min)/(%)						
150/40/5/2%	2,7 ± 0,4	3,8 ± 0,2	7,0 ± 0,4	12,2 ± 0,5	26,54 ± 0,06	47,6 ± 0,9
150/40/5/5%	3,4 ± 0,1	5,6 ± 0,4	10,6 ± 0,5	18,6 ± 0,6	37,33 ± 0,04	63,9 ± 0,3
150/40/5/7%	1,5 ± 0,5	3,0 ± 0,5	5,8 ± 0,6	10,8 ± 0,5	25,4 ± 0,4	47,7 ± 0,2
ESC seqüencial						
P ₁ /P ₂ /T/Q _{CO2} ^(a)						
(bar)/(bar)/(°C)/(g _{CO2} /min)						
100/250/40/5	1,6 ± 0,4	2,3 ± 0,5	6,1 ± 0,5	12,2 ± 0,4	28,4 ± 0,4	50,7 ± 0,4
150/250/40/5	1,3 ± 0,5	2,2 ± 0,3	5,9 ± 0,4	12,3 ± 0,7	27,4 ± 0,9	50,20 ± 0,07
100/300/40/5	0,7 ± 0,3	1,85 ± 0,06	5,1 ± 0,2	12 ± 1	26 ± 2	48,0 ± 0,5

(a) P₁ refere-se à pressão na primeira etapa de extração e P₂ à segunda etapa.

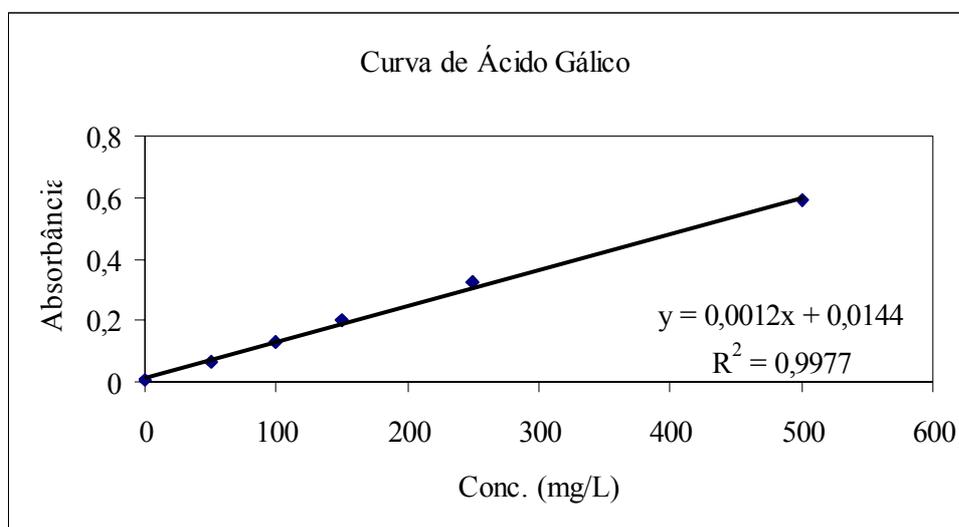


Figura I – Gráfico da curva padrão de ácido gálico utilizada na análise de conteúdo de fenólicos totais.

Apêndice III – Curvas de extração ajustadas pelo SAS.

Ensaio propolis: 40oC, 100 bar, 5g/min
 The NLIN Procedure
 Dependent variable mext
 Method: Gauss-Newton
 Iterative Phase

Iter	b0	b1	Sum of b2	knot1	Squares
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	70.0000	16.1183
1	-0.00036	0.00904	-0.00648	258.2	10.5090
2	0.1543	0.00491	-0.00297	227.5	0.1898
3	0.1309	0.00529	-0.00337	171.2	0.0854
4	0.0812	0.00626	-0.00412	132.1	0.0485
5	0.0463	0.00717	-0.00485	109.7	0.0263
6	0.0334	0.00757	-0.00523	105.0	0.0216
7	0.0217	0.00800	-0.00561	96.8289	0.0197
8	0.0217	0.00800	-0.00561	97.3783	0.0196

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	8
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.005673
Object	0.006269
Objective	0.019553
Observations Read	21
Observations Used	21
Observations Missing	0

Source	Sum of	DF	Mean Squares	Approx Square	F Value	Pr > F
Regression		4	19.7084	4.9271	1297.06	<.0001
Residual			17	0.0196	0.00115	
Uncorrected Total			21	19.7280		
Corrected Total			20	4.4951		

The NLIN Procedure

Parameter	Approx Estimate	Std Error	Approximate 95% Confidence	Limits
b0	0.0217	0.0204	-0.0214	0.0648
b1	0.00800	0.000401	0.00716	0.00885
b2	-0.00561	0.000412	-0.00648	-0.00474
knot1	97.3783	5.4292	85.9236	108.8

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8099531	0.7897196	0.3684284
b1	-0.8099531	1.0000000	-0.9750188	-0.7400523
b2	0.7897196	-0.9750188	1.0000000	0.6217895
knot1	0.3684284	-0.7400523	0.6217895	1.0000000

Obs	tmin	mext	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	0.02168	-0.021685
2	10	0.0705	0	0.10172	-0.031219
3	20	0.1840	0	0.18175	0.002247
4	30	0.2825	0	0.26179	0.020713
5	45	0.4373	0	0.38184	0.055462
6	60	0.5151	0	0.50189	0.013211
7	75	0.6324	5	0.62194	0.010460
8	90	0.6928	20	0.74199	-0.049191
9	105	0.7807	35	0.81930	-0.038601
10	120	0.8449	50	0.85524	-0.010336
11	135	0.8716	65	0.89117	-0.019571
12	150	0.9170	80	0.92711	-0.010105
13	180	0.9860	110	0.99898	-0.012975
14	210	1.1240	140	1.07084	0.053155
15	240	1.1953	170	1.14271	0.052585
16	270	1.2467	200	1.21458	0.032116
17	300	1.2896	230	1.28645	0.003146
18	330	1.3680	260	1.35832	0.009676
19	360	1.4374	290	1.43019	0.007206
20	390	1.4872	320	1.50206	-0.014863
21	420	1.5225	350	1.57393	-0.051433

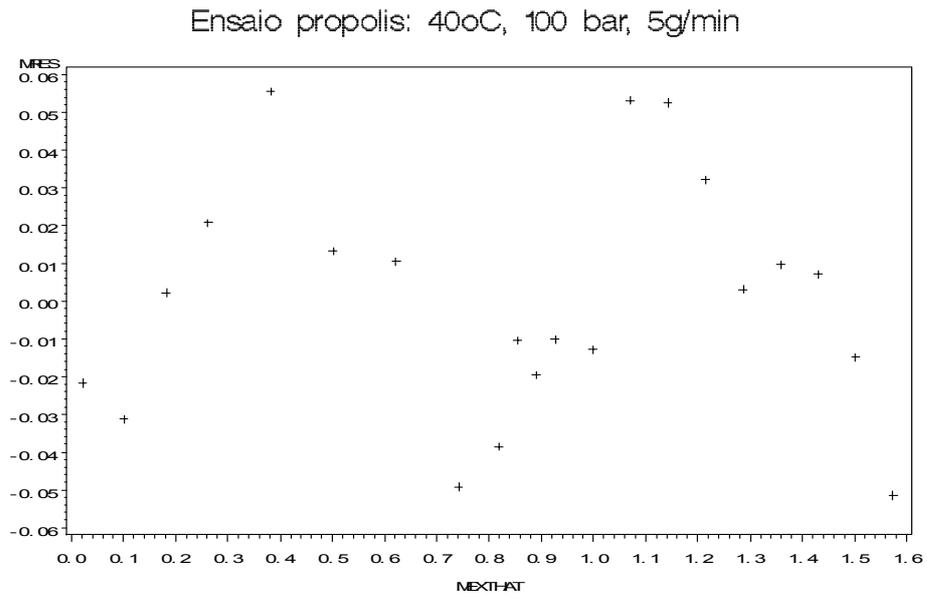


Figura II – Gráfico SAS da dispersão para ESC 100 bar, 40°C e 5gCO₂/min.

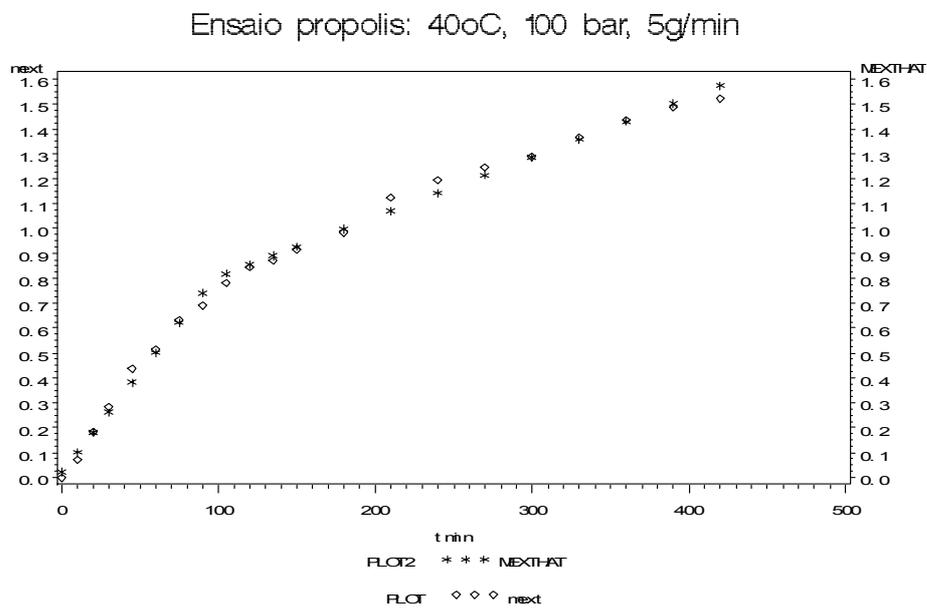


Figura III- Gráfico SAS de ajuste para ESC 100 bar, 40°C e 5gCO₂/min.

Ensaio propolis: 40oC, 150 bar, 5g/min
 The NLIN Procedure
 Dependent Variable mext
 Method: Gauss-Newton
 Iterative Phase

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	70.0000	64.6879
1	-0.0280	0.0108	-0.00883	250.9	3.0956
2	0.3898	0.00943	-0.00720	199.6	0.7976
3	0.2569	0.0118	-0.00935	137.4	0.5088
4	0.1546	0.0140	-0.0113	122.5	0.2103
5	0.1139	0.0151	-0.0123	113.6	0.1562
6	0.0728	0.0164	-0.0134	103.0	0.1250
7	0.0331	0.0179	-0.0147	93.1965	0.1054
8	0.0331	0.0179	-0.0147	94.0670	0.1033

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	8
Subiterations	1
Average Subiterations	0.125
R	1.423E-9
PPC	9.16E-11
RPC(knot1)	0.009341
Object	0.020263
Objective	0.103266
Observations Read	21
Observations Used	21
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	71.4815	17.8704	757.94	<.0001
Residual	17	0.1033	0.00607		
Uncorrected Total	21	71.5848			
Corrected Total	20	13.9156			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	0.0331	0.0470	-0.0661	0.1322
b1	0.0179	0.000923	0.0160	0.0198
b2	-0.0147	0.000946	-0.0167	-0.0127
knot1	94.0670	4.6228	84.3139	103.8

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8099531	0.7897196	0.3423833
b1	-0.8099531	1.0000000	-0.9750188	-0.7158725
b2	0.7897196	-0.9750188	1.0000000	0.5931519
knot1	0.3423833	-0.7158725	0.5931519	1.0000000

Obs	tmin	mext	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	0.03306	-0.03306
2	10	0.1312	0	0.21206	-0.08086
3	20	0.3361	0	0.39105	-0.05495
4	30	0.6881	0	0.57004	0.11806
5	45	0.9105	0	0.83854	0.07196
6	60	1.2011	0	1.10703	0.09407
7	75	1.3853	5	1.37552	0.00978
8	90	1.5190	20	1.64401	-0.12501
9	105	1.6359	35	1.75152	-0.11562
10	120	1.7362	50	1.79916	-0.06296
11	135	1.8293	65	1.84679	-0.01749
12	150	1.9114	80	1.89443	0.01697
13	180	2.0477	110	1.98970	0.05800
14	210	2.1567	140	2.08497	0.07173
15	240	2.2584	170	2.18024	0.07816
16	270	2.3435	200	2.27551	0.06799
17	300	2.4359	230	2.37078	0.06512
18	330	2.4415	260	2.46605	-0.02455
19	360	2.5278	290	2.56132	-0.03352
20	390	2.6188	320	2.65659	-0.03779
21	420	2.6858	350	2.75186	-0.06606

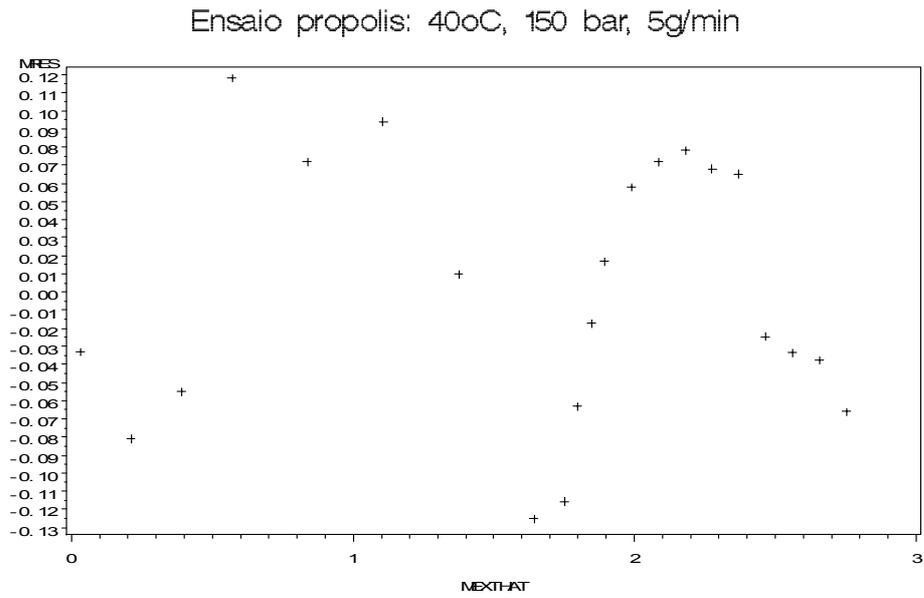


Figura IV– Gráfico SAS da dispersão para ESC 150 bar, 40°C e 5gCO₂/min.

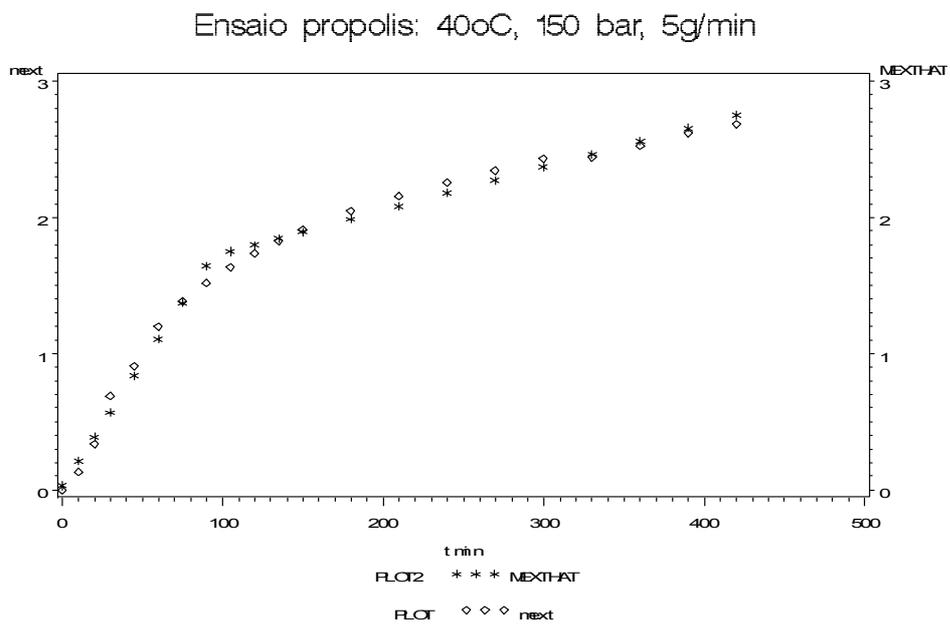


Figura V - Gráfico SAS de ajuste para ESC 150 bar, 40°C e 5gCO₂/min.

Ensaio propolis: 40oC, 250 bar, 5g/min
 The NLIN Procedure
 Dependent Variable mext
 Method: Gauss-Newton
 Iterative Phase

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	70.0000	83.7462
1	0.0323	0.0236	-0.0194	181.3	44.7459
2	0.3712	0.0124	-0.00948	167.8	0.6964
3	0.3071	0.0138	-0.0106	133.4	0.3946
4	0.2158	0.0161	-0.0126	107.9	0.2525
5	0.1657	0.0177	-0.0140	99.5090	0.1737
6	0.1156	0.0196	-0.0157	88.5691	0.1397
7	0.0730	0.0214	-0.0174	80.1339	0.1207
8	0.0730	0.0214	-0.0174	80.9681	0.1178

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	8
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.010411
Object	0.024511
Objective	0.117762
Observations Read	21
Observations Used	21
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	91.4496	22.8624	807.88	<.0001
Residual	17	0.1178	0.00693		
Uncorrected Total	21	91.5674			
Corrected Total	20	16.9067			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	0.0730	0.0532	-0.0392	0.1853
b1	0.0214	0.00125	0.0188	0.0241
b2	-0.0174	0.00127	-0.0201	-0.0147
knot1	80.9681	4.4199	71.6430	90.2933

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8065234	0.7956316	0.3703814
b1	-0.8065234	1.0000000	-0.9864954	-0.7586066
b2	0.7956316	-0.9864954	1.0000000	0.6799777
knot1	0.3703814	-0.7586066	0.6799777	1.0000000

Obs	tmin	mext	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	0.07302	-0.07302
2	10	0.2365	0	0.28719	-0.05069
3	20	0.5673	0	0.50137	0.06593
4	30	0.7411	0	0.71554	0.02556
5	45	1.1574	0	1.03680	0.12060
6	60	1.3832	0	1.35806	0.02514
7	75	1.5658	5	1.67932	-0.11352
8	90	1.7292	20	1.84318	-0.11398
9	105	1.8208	35	1.90304	-0.08224
10	120	1.9157	50	1.96290	-0.04720
11	135	2.0257	65	2.02275	0.00295
12	150	2.0996	80	2.08261	0.01699
13	180	2.2746	110	2.20232	0.07228
14	210	2.4172	140	2.32204	0.09516
15	240	2.5342	170	2.44175	0.09245
16	270	2.6257	200	2.56147	0.06423
17	300	2.7414	230	2.68118	0.06022
18	330	2.8319	260	2.80089	0.03101
19	360	2.9319	290	2.92061	0.01129
20	390	2.9720	320	3.04032	-0.06832
21	420	3.0252	350	3.16004	-0.13484

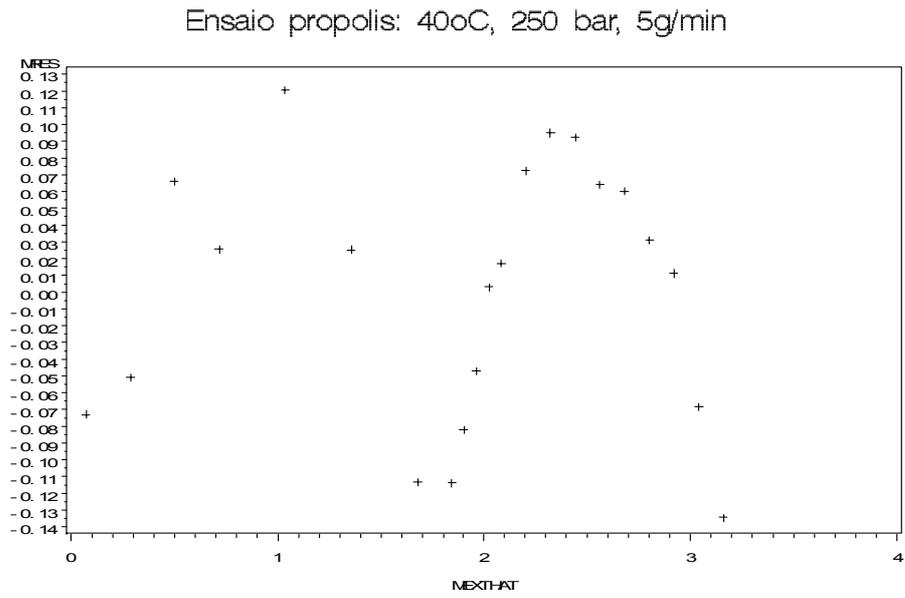


Figura VI – Gráfico SAS da dispersão para ESC 250 bar, 40°C e 5gCO₂/min.

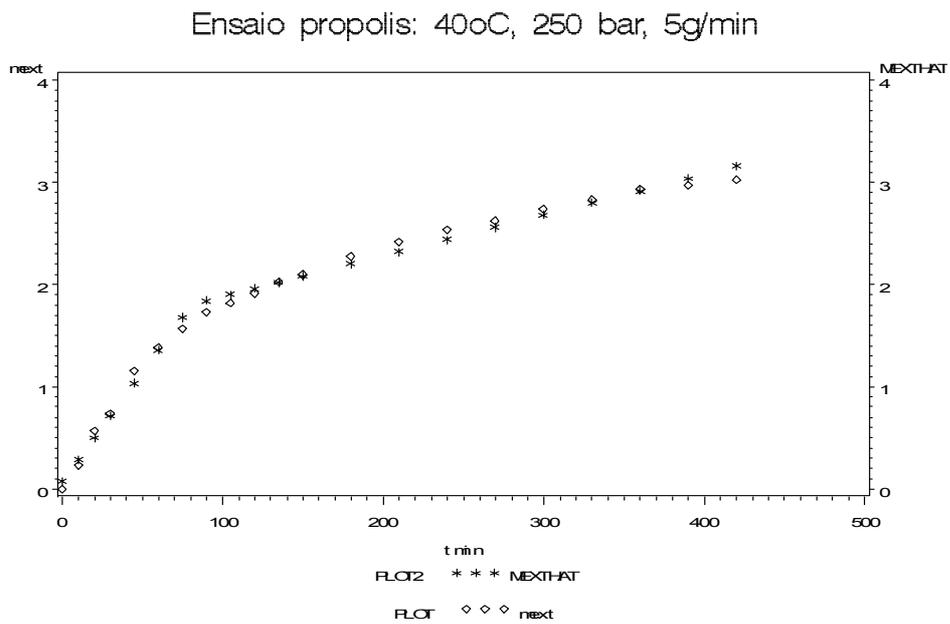


Figura VII - Gráfico SAS de ajuste para ESC 250 bar, 40°C e 5gCO₂/min.

Ensaio propolis: 50oC, 100 bar, 3g/min
 The NLIN Procedure
 Dependent Variable mext
 Method: Gauss-Newton
 Iterative Phase

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0271	0.000810	-0.00034	70.0000	0.5437
1	0.00309	0.00170	-0.00074	49.2736	0.00402
2	-0.00072	0.00196	-0.00099	46.3413	0.00292
3	-0.00072	0.00196	-0.00099	47.0888	0.00291

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary	
Method	Gauss-Newton
Iterations	3
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.016129
Object	0.003195
Objective	0.002909
Observations Read	22
Observations Used	22
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	1.4815	0.3704	932.66	<.0001
Residual	18	0.00291	0.000162		
Uncorrected Total	22	1.4844			
Corrected Total	21	0.4551			

Parameter	The NLIN Procedure		Approximate 95% Confidence Limits	
	Estimate	Approx Std Error		
b0	-0.00072	0.00953	-0.0207	0.0193
b1	0.00196	0.000364	0.00120	0.00273
b2	-0.00099	0.000365	-0.00176	-0.00022
knot1	47.0888	12.4520	20.9283	73.2492

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8023688	0.8005081	0.3424210
b1	-0.8023688	1.0000000	-0.9976811	-0.7694489
b2	0.8005081	-0.9976811	1.0000000	0.7428171
knot1	0.3424210	-0.7694489	0.7428171	1.0000000

Obs	tmin	mext	AL1	MEXTHAT	MRES
1	0	0.0000	0	-0.00072	0.000717
2	10	0.0101	0	0.01891	-0.008810
3	20	0.0453	0	0.03854	0.006763
4	30	0.0653	0	0.05816	0.007136
5	45	0.0818	0	0.08760	-0.005805
6	60	0.0973	0	0.10425	-0.006950
7	75	0.1099	5	0.11883	-0.008925
8	90	0.1303	20	0.13340	-0.003100
9	105	0.1473	35	0.14798	-0.000675
10	120	0.1610	50	0.16255	-0.001551
11	135	0.1772	65	0.17713	0.000074
12	150	0.1939	80	0.19170	0.002199
13	180	0.2221	110	0.22085	0.001249
14	210	0.2359	140	0.25000	-0.014101
15	240	0.3136	170	0.27915	0.034448
16	270	0.3329	200	0.30830	0.024598
17	300	0.3463	230	0.33745	0.008848
18	330	0.3584	260	0.36660	-0.008202
19	360	0.3769	290	0.39575	-0.018853
20	390	0.4264	320	0.42490	0.001497
21	420	0.4502	350	0.45405	-0.003853
22	450	0.4765	380	0.48320	-0.006703

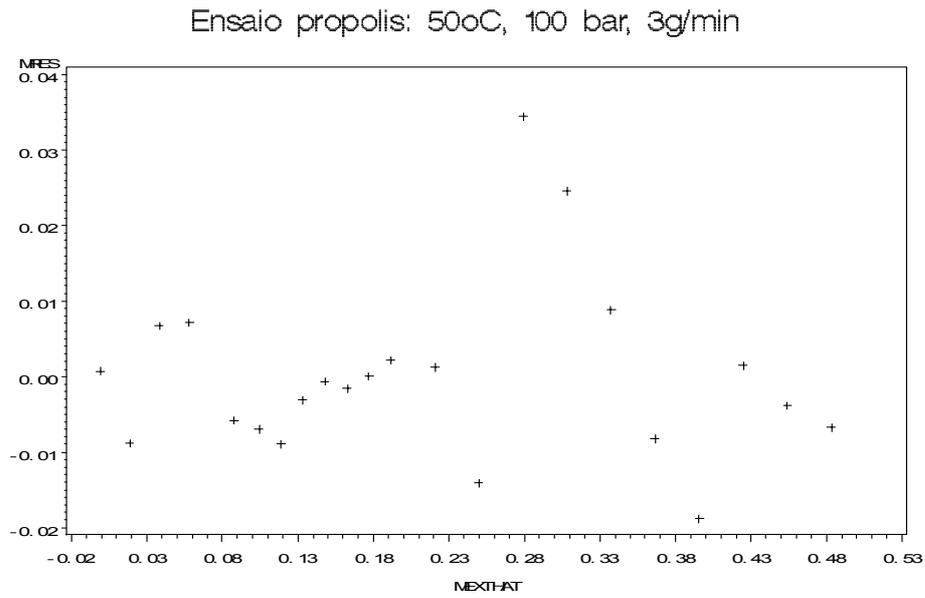


Figura VIII – Gráfico SAS da dispersão para ESC 100 bar, 50°C e 3gCO₂/min.

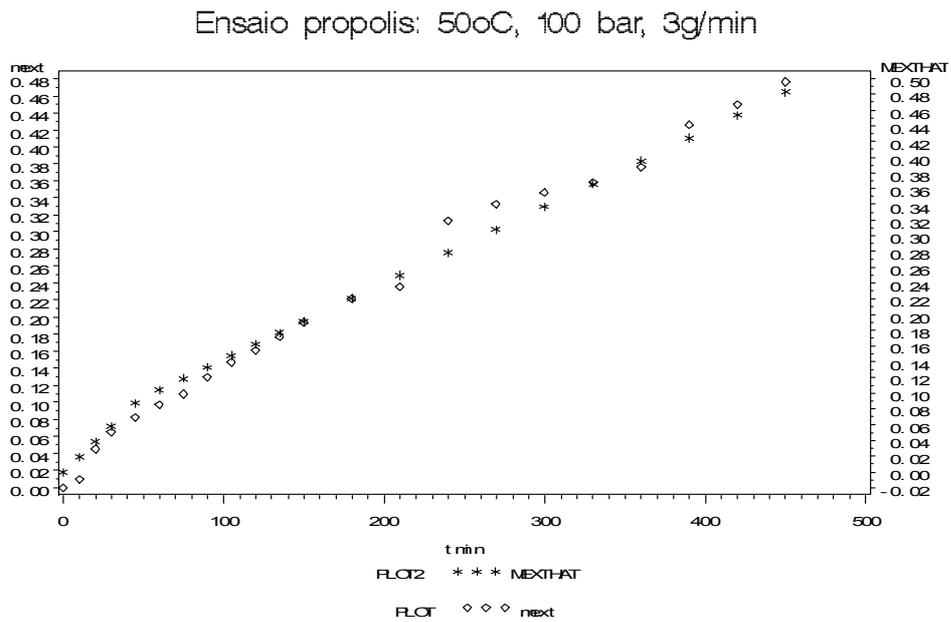


Figura IX - Gráfico SAS de ajuste para ESC 100 bar, 50°C e 3gCO₂/min.

Apêndice IV – Curva de determinação da solubilidade do extrato de própolis em CO₂.

A Figura X apresenta a curva de solubilidade realizada a 200 bar, 40 °C e vazão de 1,08 g/min onde através da equação da reta ajustada no período de etapa CER a solubilidade foi calculada em 5×10^{-3} g de extrato/g de CO₂. Este dado foi utilizado para a modelagem de todas as curvas de extração.

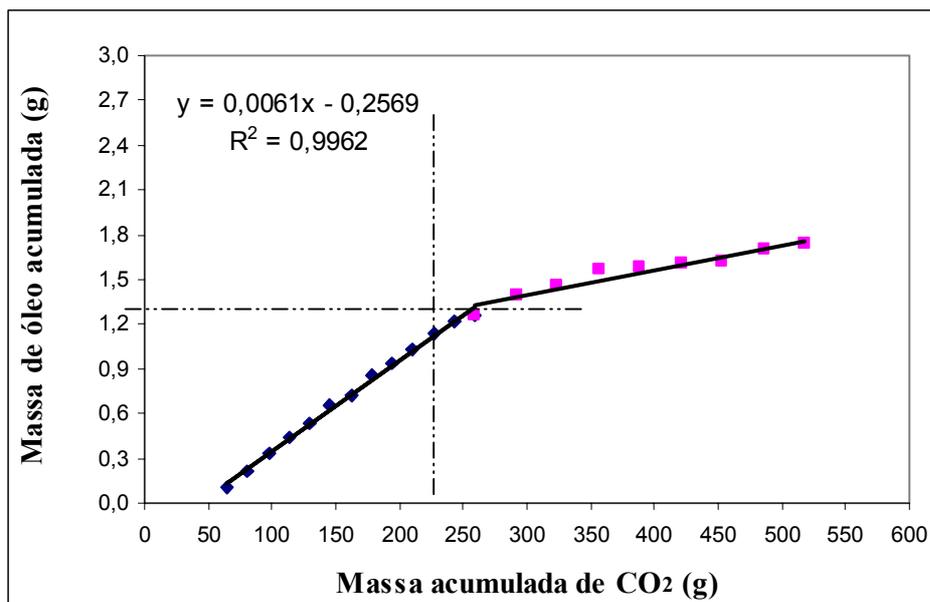


Figura X – Curva de solubilidade do extrato de própolis em CO₂ realizada a 200 bar, 40°C e vazão de 1,08 g/min.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”. (Fernando Pessoa)