



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA ROMAN GUEDES

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE CITRONELA (*CYMBOPOGON WINTERIANUS*) E  
JANAÚBA (*SYNADENIUM GRANTII* HOOK. F.) USANDO FLUIDOS  
PRESSURIZADOS: AVALIAÇÃO DE PROCESSOS E BIOATIVIDADE DOS  
EXTRATOS

CURITIBA

2019

AMANDA ROMAN GUEDES

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE CITRONELA (*CYMBOPOGON WINTERIANUS*) E  
JANAÚBA (*SYNADENIUM GRANTII* HOOK. F.) USANDO FLUIDOS  
PRESSURIZADOS: AVALIAÇÃO DE PROCESSOS E BIOATIVIDADE DOS  
EXTRATOS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

Curitiba  
2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

---

- G924e Guedes, Amanda Roman  
Estudo da extração de citronela (*cymbopogon winterianus*) e janaúba (*synadenium grantii* Hook. F.) usando fluidos pressurizados: avaliação de processos e bioatividade dos extratos [recurso eletrônico] / Amanda Roman Guedes – Curitiba, 2019.
- Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.  
Orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza
1. Citronela (Planta) 2. Janaúba (Planta). 3. Antioxidantes. 4. Compostos Fenólicos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Corazza, Marcos Lúcio. III. Título.

CDD: 584.92



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS - 40001016019P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **AMANDA ROMAN GUEDES** intitulada: **Estudo da extração de Citronela (*Cymbopogon winterianus*) e Janaúba (*Synadenium grantii* Hook. F.) usando fluidos pressurizados: avaliação de processos e bioatividade dos extratos**, sob orientação do Prof. Dr. MARCOS LÚCIO CORAZZA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


CURITIBA, 29 de Outubro de 2019.



MARCOS LÚCIO CORAZZA  
Presidente da Banca Examinadora



ARIADINE REDER CUSTÓDIO DE SOUZA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)



FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



EVERTON FERNANDO ZANOELO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



LUCIMARA STOLZ ROMAN  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho à minha família  
que sempre me apoia e oferece  
suporte em qualquer situação. E,  
principalmente, ao meu irmão, Arthur,  
que me ensinou a não desistir de lutar.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao final da caminhada é preciso lembrar algumas pessoas que foram especiais, que deixaram marcas em minha vida com sua presença, ensinamentos, manifestações de carinho e por seu envolvimento com a elaboração da pesquisa e finalização da Tese. Muitas pessoas acompanharam minha trajetória. Não será possível mencionar todas. No entanto, sinto necessidade de registrar meu eterno agradecimento:

Primeiramente a presença de Deus em minha vida, sempre trazendo luz, energia e coragem para seguir em frente nos momentos mais difíceis.

Ao Professor Doutor Marcos Lúcio Corazza, orientador que conduziu a pesquisa, orientou, esclareceu dúvidas, abriu caminhos, teve paciência e desprendimento ao me orientar, ao corrigir, ao apontar possibilidades que contribuíram com minha formação pessoal e como pesquisadora. Agradeço os ensinamentos, conselhos e confiança.

Ao Professor Doutor Everton Fernando Zanoelo, sempre presente, orientando, aconselhando e partilhando seu conhecimento. Agradeço a disponibilidade, a paciência e o estímulo para que continuasse firme na caminhada.

A Professora Doutora Lucimara Stolz Roman, meu eterno agradecimento por partilhar comigo este momento como banca, e tantos outros como família.

Ao Professor Doutor Fernando Voll, que possibilitou a realização do estágio de docência cedendo as aulas e orientando na organização e realização das mesmas, sendo sempre disponível nos momentos de dúvidas.

A colega de estudos e pesquisas, agora Professora Doutora Ariadine Reder que esteve presente na organização dos dados, preparação e desenvolvimento de muitas análises, esclarecendo pacientemente minhas dúvidas e medos e consolando minhas angústias.

Ao Professor Doutor Charles Windson Isidoro Haminiuk incentivador e orientador dos primeiros passos na pesquisa durante a graduação.

Aos professores e professoras com os quais convivi no tempo de Mestrado e Doutorado nesta Universidade que contribuíram com minha formação acadêmica agradeço por todos os ensinamentos e conhecimentos partilhados.

A Professora Doutora Camila Leonardi Miotto pelo auxílio na UFMS em Campo Grande (MS) otimizando e organizando a viabilização do registro e depósito da janaúba.

Ao Professor Doutor Arnildo Pott da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pela exsicata de janaúba depositada no herbário.

Ao Senhor Persio pelas orientações e disponibilidade em doar as amostras de janaúba, fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigado Senhor Persio pela sua preocupação com a vida de muitas pessoas.

A Fernanda Prado e Elaine Kaspchak por cederem tanto tempo para me ensinarem e contribuírem com observações na finalização das análises e da Tese.

A Paloma, Laís, Rafaela, Fernando, Ronald, Ana Maria, Thaisa, Ana Paula, Fabiane, Kanda, Alexis, Daniela e todos os amigos do PPGEAL e PPGEQ que acompanharam o dia a dia da pesquisa no laboratório e fora dele, que estiveram juntos nos momentos importantes, alegres, tristes, difíceis e nebulosos. Agradeço por tornarem meus dias mais coloridos e por dividirem comigo tanto carinho e alegrias. Agradeço pela paciência, pelas palavras de apoio e incentivo, pela amizade.

Aos amigos do grupo LACTA por tantos momentos de aprendizagem, troca de experiências e conhecimentos muito significativos para esta Tese.

Manifesto minha gratidão aos funcionários da secretaria do PPGEAL, PPGEQ e aos funcionários da UFPR que sempre contribuíram com seu trabalho para o acesso aos diferentes espaços da Universidade.

Aos meus pais e meus irmãos, que se mostraram sempre presente em todas as fases da minha vida, especialmente, nesses últimos anos, onde precisei de muito apoio e amor.

A Universidade Federal do Paraná por oportunizar minha participação nos programas de Mestrado e Doutorado e a CAPES pelo apoio financeiro que possibilitou a dedicação ao tempo de pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que me incentivaram e acreditaram na minha pesquisa, nas minhas possibilidades e contribuíram para que tornasse realidade a finalização desta Tese.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”

**Antoine de Saint Exupéry**



## RESUMO

O trabalho descrito objetiva o estudo da extração por técnica de fluido pressurizado das plantas citronela (*Cymbopogon winterianus*) e janaúba (*Synadenium grantii*), a fim de evidenciar seu potencial de obtenção dos extratos e possível uso na indústria. O método Soxhlet, as avaliações antioxidantes e teores de fenólicos desses extratos foram realizados para fins comparativos. Esse trabalho foi estruturado em formato de capítulos, onde no capítulo 1 são reunidas informações gerais referentes as duas plantas, diferenças dos métodos de extrações e informações sobre análises dos compostos bioativos. No capítulo 2 estão descritas as extrações de citronela por CO<sub>2</sub> supercrítico, propano comprimido, CO<sub>2</sub> supercrítico + etanol, propano comprimido + etanol. O uso do etanol nesse estudo melhorou os rendimentos de extração em ambos os solventes comprimidos utilizados. Para investigação, a faixa de pressão de 2 a 20 MPa e temperatura de 20 °C, 40 °C e 60 °C foi escolhida. Na temperatura de 40 °C, o propano mostrou mais vantagem em relação ao CO<sub>2</sub>, com um aumento de 1,61 vezes no rendimento de extração em equilíbrio ( $Y_e$ ). Além disso, o uso do propano comprimido + etanol aprimorou ainda mais ambos os parâmetros de extração ( $k = 16 \pm 4 \text{ s}^{-1}$  e  $Y_e = 6,3 \pm 0\%$ ). O extrato obtido por hidrodestilação apresenta maior teor de fenólicos ( $1,4 \pm 0,4 \text{ mg EAG g}^{-1}$ ) quando comparado aos solventes comprimidos. Na citronela foi possível observar a presença dos compostos citronelal, citronelol, elemol e geraniol, muito utilizados na indústria química. No capítulo 3, os extratos de janaúba são obtidos a partir da técnica com CO<sub>2</sub> supercrítico, CO<sub>2</sub> supercrítico + etanol e método Soxhlet com diferentes solventes. A adição do etanol no CO<sub>2</sub> supercrítico elevou o rendimento de extração e os parâmetros cinéticos devido ao aumento da polaridade do solvente. Os extratos obtidos em CO<sub>2</sub> supercrítico com etanol e matéria-prima na proporção de 1:1, mostraram maior atividade antioxidante. As análises GC-MS dos extratos mostraram a presença dos compostos euphol, carvacrol, aldeído de betulina e friedelan-3-one, que apresentam grande potencial para aplicações industriais como cosméticos, farmacêuticos e alimentícios.

**Palavras-chaves:** citronela, janaúba, extração supercrítica, dióxido de carbono, propano comprimido, atividade antioxidante, compostos fenólicos.

## ABSTRACT

This work aims to study the extraction by pressurized fluid technique of citronella (*Cymbopogon winterianus*) and janauba (*Synadenium grantii*) plants, in order to highlight their potential for obtaining the extracts and possible use in industry. The Soxhlet method, antioxidant evaluations and phenolic contents of these extracts were performed for comparative purposes. This thesis was structured in chapter format. Chapter 1 gathered general information about both plants, the analysis of their bioactive compounds and differences among the extraction methods. Chapter 2 described citronella extractions by scCO<sub>2</sub>, compressed propane (CP), scCO<sub>2</sub> + ethanol and compressed propane + ethanol. The use of ethanol in this study as a co-solvent improved extraction yields in both compressed solvents used (CO<sub>2</sub> and CP). A pressure range of 2 to 20 MPa and temperatures of 20 °C, 40 °C and 60 °C were investigated. At 40 °C, propane proved to be more advantageous over CO<sub>2</sub>, showing a 1.61 times increase in equilibrium extraction yield ( $Y_e$ ). In addition, the use of compressed propane + ethanol further improved both extraction parameters ( $k = 16 \pm 4\text{s}^{-1}$  and  $Y_e = 6,3 \pm 0\%$ ). The extract obtained by hydrodistillation had higher phenolic content ( $1,4 \pm 0,4 \text{ mg EAG g}^{-1}$ ) when compared to compressed solvents. In citronella, it was possible to observe the presence of the citronellal, citronellol, elemol, and geraniol compounds, widely used in the chemical industry. In chapter 3, janauba extracts were obtained from the supercritical CO<sub>2</sub> technique, CO<sub>2</sub> supercritical + ethanol and Soxhlet method with different solvents. The addition of ethanol to supercritical CO<sub>2</sub> increased extraction yield and kinetic parameters due to increased solvent polarity. The extracts obtained in supercritical CO<sub>2</sub> with ethanol and raw material ratio of 1:1 showed higher antioxidant activity. GC-MS analyses of the extracts showed the presence of carotene, lanosterol, betuine aldehyde, and friedelan-3-one compounds, which have great potential for industrial applications such as cosmetics, pharmaceuticals, and foodstuffs.

**Keywords:** citronella, janauba, supercritical extraction, carbon dioxide, compressed propane, antioxidant activity, phenolic compounds.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Citronela ( <i>Cymbopogon winterianus</i> ).....	18
FIGURA 2. Janaúba ( <i>Synadenium grantii</i> Hook. f.).....	20
FIGURA 3. Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio. ....	34
FIGURA 4. Reação de substâncias redutoras com reagente de Folin-Ciocalteu. ....	35
FIGURA 5. Unidade de extração soxhlet.....	41
FIGURA 6. Unidade de extração supercrítica em escala de bancada.....	42
FIGURA 7. Cinética de extração de citronela com CO <sub>2</sub> supercrítico a uma temperatura constante de 40 °C e três pressões diferentes (diamantes abertos: 9 MPa; diamantes completos: 12 MPa; quadrados: 20 MPa). Símbolos: resultados experimentais; linhas sólidas representam o modelo empírico de primeira ordem. As condições operacionais são definidas em detalhes na Tabela 2.....	46
FIGURA 8. Cinética de extração de citronela com propano pressurizado a diferentes temperaturas e pressões (a = 2 MPa; b = 6 MPa; c = 10 MPa). Símbolos representam os resultados experimentais. Linhas sólidas representam o modelo empírico de primeira ordem e a linha tracejada o rendimento de extração calculado usando scCO <sub>2</sub> a 40 °C e 9 MPa para comparação. As condições operacionais são definidas em detalhes na Tabela 3.....	47
FIGURA 9. Resultados cinéticos da extração de solutos de citronela usando scCO <sub>2</sub> com etanol como co-solvente a 40 °C e 20 MPa (a <sub>1</sub> : βc = 1 e a <sub>2</sub> : βc = 2). b) Resultados cinéticos da extração de solutos de citronela usando propano com etanol como co-solvente a 40 °C e 6 MPa (b <sub>1</sub> : βc = 1 e b <sub>2</sub> : βc = 2). Linhas sólidas representam os valores calculados pela Equação (4) para extração com etanol e a linha tracejada a extração sem etanol (para comparação). As condições operacionais foram definidas nas Tabelas 2, 3 e 4.....	48
FIGURA 10. Curvas globais de extração da <i>S. grantii</i> com CO <sub>2</sub> supercrítico (scCO <sub>2</sub> ) na temperatura variando de 40 °C a 80 °C e pressão variando de 15 a 25 MPa.....	66
FIGURA 11. Curvas de extração global da <i>S. Grantii</i> em diferentes relações de etanol (EtOH) e matéria-prima. ....	67

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Estudos mostrando a ação de diferentes compostos sobre diferentes microrganismos.....	33
TABELA 2. Condições de operação e parâmetros cinéticos ajustados ( $Y_e$ e $k$ ) da extração de citronela realizada com $CO_2$ supercrítico.....	46
TABELA 3. Condições de operação e parâmetros cinéticos ajustados ( $Y_e$ e $k$ ) da extração de citronela realizada com propano comprimido. ....	46
TABELA 4. Condições de operação e parâmetros cinéticos ajustados ( $Y_e$ e $k$ ) da extração realizada com etanol como co-solvente com $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$ .....	48
TABELA 5. Rendimento de extrações soxhlet realizada com solventes de diferentes polaridades, durante 6 horas de extração. ....	49
TABELA 6. Conteúdo de fenóis totais para os extratos finais dos diferentes métodos de extrações realizadas .....	50
TABELA 7. Efeito da polaridade do solvente no rendimento da extração de soxhlet por 6 horas de <i>S. grantii</i> .....	63
TABELA 8. Rendimento de extração e parâmetros cinéticos ( $Y_e$ e $k$ ) da extração de <i>S. grantii</i> realizada com $CO_2$ supercrítico .....	66
TABELA 9. Rendimento de extração e parâmetros cinéticos ( $Y_e$ e $k$ ) da extração de <i>S. grantii</i> realizada com $CO_2$ supercrítico e etanol .....	68
TABELA 10. Atividade antioxidante do extrato de <i>S. grantii</i> por diferentes métodos de extração .....	69
TABELA 11. Compostos voláteis dos extratos de <i>S. grantii</i> obtidos pela extração com Soxhlet, $CO_2$ supercrítico + etanol e $CO_2$ supercrítico.....	71

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
Objetivo geral .....	17
Objetivos específicos .....	17
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
1.1 CITRONELA ( <i>Cymbopogon winterianus</i> ) .....	18
1.2 JANAÚBA ( <i>Synadenium grantii</i> Hook. f.).....	19
1.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS NATURAIS .....	21
1.4 APLICAÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OU EXTRATOS NATURAIS .....	23
1.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	26
1.5.1 Destilação.....	26
1.5.2 Extração por solventes orgânicos .....	27
1.5.3 Extração por fluido supercrítico .....	28
1.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	31
<b>CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO DE SOLUTOS DE CAPIM CITRONELA UTILIZANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO, PROPANO COMPRIMIDO E ETANOL COMO CO-SOLVENTE: AVALIAÇÃO FENÓLICA TOTAL</b> .....	<b>37</b>
2.1.INTRODUÇÃO .....	37
2.2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.2.1 Matéria-prima .....	39
2.2.2 Caracterização da matéria-prima .....	39
2.2.3 Extração por solventes orgânicos .....	40
2.2.4 Hidrodestilação .....	41
2.2.5 Extração supercrítica com fluido pressurizado .....	42
2.2.6 Teor de fenólicos totais .....	43
2.2.7 Análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).....	44
2.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
2.4.CONCLUSÃO.....	56
<b>CAPÍTULO 3: EXTRAÇÃO DE <i>SYNADENIUM GRANTII</i> HOOK. F. USANDO SOLVENTES CONVENCIONAIS E CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO + ETANOL: AVALIAÇÃO DA CINÉTICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E COMPOSTOS FENÓLICOS</b> .....	<b>57</b>
3.1.INTRODUÇÃO .....	57

3.2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.2.1 Matéria-prima .....	59
3.2.2 Reagentes e solventes.....	59
3.2.3 Extração Soxhlet .....	60
3.2.4 Extração por fluido supercrítico.....	60
3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	62
3.2.6 Análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).....	62
3.2.7 Análises estatísticas .....	63
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.3.1 Efeito da polaridade do solvente no rendimento da extração de Soxhlet.....	63
3.3.2 Efeito da temperatura e pressão na extração de <i>S. grantii</i> usando CO <sub>2</sub> supercrítico.....	65
3.3.3 Extração usando CO <sub>2</sub> supercrítico e etanol (scCO <sub>2</sub> + EtOH).....	67
3.3.4 Atividade antioxidante .....	69
3.3.5 Composição química dos extratos de <i>S. grantii</i> .....	70
3.4. CONCLUSÃO.....	74
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
4.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	76
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>95</b>

## INTRODUÇÃO

A aplicação de plantas medicinais em substituição a aditivos alimentares sintéticos e uso na medicina popular está sendo difundida cada vez mais na população e nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. A crescente demanda para investigação desses ativos naturais ocorre pelo fato de ser extremamente importante fornecer maiores informações relativas a essas plantas e seus componentes, com objetivo de ajudar no manuseio correto, principalmente no que diz respeito aos vegetais que são considerados pela população como “curadores” de doenças e encontram-se à disposição para consumo (LUZ et al., 2014).

A literatura já disponibiliza um amplo acervo de estudos que tratam de óleos essenciais ou extratos retirados das plantas que se encaixam no uso medicinal ou como aditivo para alimentos. Dessa forma, um número considerável de óleos essenciais ou extratos já estão registrados e classificados como GRAS (Generally recognized as safe), isto é, são seguros para o consumo e autorizados a serem aproveitados pelas indústrias (SINHA et al., 2014).

No Brasil, duas plantas de dois grandes gêneros receberam destaque. Segundo Lorenzi e Matos (2002), o gênero *Cymbopogon* possui cerca de 100 espécies nos países tropicais, dentre essas, a *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, comumente conhecida por citronela. Sua relevância foi disseminada após a descoberta de seu poder repelente contra o mosquito transmissor de doenças: *Aedes aegypti*. Com o surto de epidemia das três doenças transmitidas por este mosquito, a Dengue, Chikungunya e infecção pelo vírus Zika (LEAL, 2016), a população passou a dar uma atenção especial a esta planta. A comunidade acadêmica, no entanto, já vinha estudando a obtenção do óleo essencial para utilização em mais finalidades, como terapêutico, cosmético, perfumaria e em alimentos.

Da mesma forma, o gênero *Synadenium* também está em evidência posto que pesquisas demonstraram a presença de flavonoides, terpenos, ésteres, taninos, entre outros em sua composição. Mais especificamente, a planta *Synadenium grantii* Hook f. recebe uma consideração maior do público pelas diversas histórias populares relacionando a planta e a cura do câncer. No entanto, ainda é escasso o número de trabalhos sobre ela na literatura.

Para a extração desses óleos essenciais ou extratos das plantas tanto para pesquisa quanto para utilização industrial ou doméstica, existem diversos tipos de

técnicas. Esses procedimentos são escolhidos de acordo com a necessidade e o tipo de matriz a ser trabalhada. Fatores como tempo de extração, custo, rendimento, qualidade do produto, temperatura de degradação, entre outros, afetam a escolha da técnica.

Métodos mais modernos como a extração supercrítica podem ser uma alternativa. As maiores vantagens na utilização de um fluido supercrítico para tal procedimento são a fácil remoção desse solvente do extrato obtido e a diminuição na degradação térmica, a qual causa decomposição de compostos termolábeis, uma vez que a operação pode ser realizada em baixas temperaturas. O solvente mais empregado para esse tipo de extração é o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), em razão de ser inerte, seguro, não tóxico, não carcinogênico e apresentar temperatura e pressão crítica possíveis de serem aplicadas na prática industrial. O solvente propano também pode ser considerado para extração pois possui um alto poder de solvatação, porém não apresenta tantos benefícios como o CO<sub>2</sub> (MARTINÉZ, 2005; ABAROUDI et al., 1999).

Por fim, diante da importância em pesquisar sobre as plantas com possíveis potenciais antioxidantes que estão sendo utilizadas pela população, enriquecendo a literatura, torna-se fundamental estudar os diferentes processos de obtenção dos extratos da citronela e janaúba, bem como sua influência nos compostos dos vegetais.



## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Obter o extrato das matrizes vegetais citronela e janaúba a partir da extração supercrítica com CO<sub>2</sub> e propano comprimido, incluindo a adição do etanol a esses solventes, com o propósito de avaliar os rendimentos e definir se são métodos atrativos para extração dessas plantas.

### Objetivos específicos

- Obter extratos das matrizes vegetais citronela e janaúba mediante as técnicas de extração em Soxhlet com determinados solventes orgânicos (etanol, hexano, éter de petróleo, água, acetona, acetato de etila e metanol);
- Obter extratos das matrizes vegetais citronela e janaúba mediante as técnicas de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, propano comprimido, CO<sub>2</sub> supercrítico + etanol e propano comprimido + etanol;
- Determinar os rendimentos e as curvas cinéticas das extrações realizadas neste trabalho;
- Determinar a influência dos principais parâmetros dos processos de extração supercrítica e por propano comprimido (pressão, temperatura e solvente) no processo de obtenção dos extratos das duas plantas;
- Determinar os rendimentos de extração da citronela por hidrodestilação;
- Realizar a caracterização química dos extratos obtidos por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (GC/MS);
- Avaliar a atividade antioxidante e conteúdo fenólico total dos extratos;
- Avaliar o perfil químico dos extratos da citronela e janaúba obtidos por diferentes solventes pressurizados e diferentes métodos de extração.

## CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*)

*Cymbopogon winterianus* consiste em planta aromática originária do Sudeste da Ásia, pertence à família Poaceae e apresenta folhas verdes longas, simples, lineares, alternas e lígula entre o limbo e a bainha (FIGURA 1). As principais propriedades sensoriais relacionadas a essa planta são basicamente o frescor, a intensidade cítrica e o aroma levemente frutal, muito semelhante ao capim-limão, com o qual é usualmente confundida (CORAZZA, 2002).

Dentre as plantas constituintes da flora brasileira, o *Cymbopogon* ganhou destaque nos últimos anos devido a um dos seus gêneros conhecido popularmente como citronela, ser utilizado no controle e proteção pessoal contra picadas de mosquitos transmissores de doenças como filariose, malária, dengue hemorrágica, febre Zyka e chikungunya (SOLOMON; GEBRE-MARIAM; ASRES, 2012; TAWATSIN et al., 2001).

FIGURA 1 - CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*)



FONTE: O autor (2016).

De acordo com Akhila (2010), essa planta possui dois tipos de espécies e se diferenciam não só morfológicamente em relação ao formato e altura das folhas, mas também na composição dos óleos essenciais obtidas de cada uma:

- *Cymbopogon nardus* (Citronela-do-Ceilão) – originária do Sri Lanka (Ceilão). A princípio seu cultivo era encontrado em demasia, entretanto com a confirmação de que a *C. winterianus* apresenta maior rendimento de óleo, foi perdendo a preferência.
- *Cymbopogon winterianus* (Citronela-de-Java) – conhecida por ser uma variação da *C. nardus*, porém além de possuir mais óleo se tornou mais atrativa para o comércio pela maior porcentagem de aldeído citronelal, de álcoois monoterpênicos e seus ésteres. É encontrada, principalmente, em Java, Sudeste da Ásia, Índia, China, América Central e do Sul.

Apesar de origem asiática, a planta foi amplamente difundida no Brasil por ser uma espécie de fácil adaptação, particularmente em condições climáticas tropicais ou subtropicais, ou seja, ambientes quentes, com temperatura média anual igual ou superior a 20°C e com precipitação pluviométrica igual ou superior a 1.600 mm anuais (EPAGRI, 2004).

Além de adquirir notoriedade em relação a seu efeito repelente, ação antimicrobiana e acaricida, a citronela ainda é conhecida por suas propriedades medicinais, o que vem acarretando uma enorme procura pelo seu óleo essencial, tornando-se importante para a economia brasileira, pois é vasto o campo de utilização na indústria nacional e internacional (ROCHA; MING; MARQUES, 2000; EPAGRI, 2004).

De acordo com Wei e Wee (2013), seu óleo essencial ainda pode ser utilizado na indústria de alimentos, cosmética (sabão, perfumes e produtos de higiene corporal) e farmacêutica.

## 1.2 JANAÚBA (*Synadenium grantii* Hook. f.)

A família Euphorbiaceae comporta em torno de 300 gêneros, distribuídos em regiões tropicais e temperadas de todo o planeta. Possui grande relevância econômica em razão de seu uso na alimentação humana, produção de látex (borracha natural), óleos utilizados na indústria de tintas, plastificantes e plásticos, sabões duros, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, papel, perfumes, batons, cosméticos, fertilizantes e lubrificantes de motores e turbinas. Além disso, o uso na medicina

popular já é consagrado pelos chás de efeito antilítico, diurético, anti-hepatóxico, antiespasmódico, cicatrizante, antidiarreico, tônico e diurético (MACHADO, 2007).

O gênero *Synadenium* derivado dessa família, ganhou relevância nos últimos anos em virtude de uma de suas espécies *Synadenium grantii* Hook. f., conhecida comumente como janaúba, estar relacionada com a cura de patologias. Além desse nome ainda é possível encontrar outros nomes populares relacionados a mesma planta, como sucuíba, tiborna e raivosa (AMARO et al., 2006).

A janaúba, em especial, possui origem africana, em forma de arbusto lactescente, que atinge de 3 a 5 metros, conforme demonstra a FIGURA 2. Seu látex possui característica de alta toxicidade quando consumido puro, ou seja, sem diluição em água (COSTA, 2011).

FIGURA 2 - JANAÚBA (*SYNADENIUM GRANTII* HOOK. F.)



FONTE: O autor (2016).

O interesse na janaúba intensificou devido a relatos das propriedades medicinais com a utilização do látex diluído das espécies da mesma família, entre elas atividade antitumoral, antifúngica, vermífuga, antianêmica e combate a alergia,

diabetes, gripe, lepra e diversos males estomacais (ORTÊNCIO, 1997; SOUSA, 2009). Porém, ainda assim poucos estudos são encontrados na literatura relacionando a janaúba e seus princípios ativos.

### 1.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS NATURAIS

Os óleos essenciais consistem em metabólitos secundários extraídos a partir de diversas partes de plantas, possuindo composição química complexa e garantindo aos vegetais, vantagens adaptativas no meio em que estão inseridos (OUSSALAH et al., 2007). Estes despertaram interesse da comunidade científica nas mais antigas civilizações, uma vez que o homem primitivo foi desvendando as ações medicinais ou tóxicas dos vegetais conforme ia utilizando para seu sustento. Nesse sentido, surgiram a grande maioria dos medicamentos disponíveis para uso da população, visto que foram originados a partir de estudos baseados no conhecimento popular da empregabilidade de metabólitos ativos e princípios isolados dessas plantas (DUARTE et. al., 2005; MOREIRA et. al., 2010; SANTIN, 2013).

São constituídos basicamente por substâncias terpênicas e, em alguns casos, de fenilpropanóides, enriquecidos por pequenas moléculas como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeias curtas (VARGAS et al., 2010). São misturas de complexo natural contendo aproximadamente 60 componentes em diferentes concentrações e, são caracterizados por um ou dois componentes de maior concentração (20 a 70%) comparado aos outros de menores porcentagens (BAKKALI et al., 2008).

Conforme Costa (2011), o metabolismo dos organismos realiza um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células assegurando e controlando o desenvolvimento, envelhecimento e morte delas. Essencialmente, os seres vivos possuem os mesmos tipos de metabólitos primários, entre eles: carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, que nas plantas são responsáveis pela fotossíntese, respiração e transporte de solutos. No entanto, os vegetais dispõem de um metabolismo diferenciado, ou seja, um metabolismo secundário, capaz de produzir, modificar e armazenar outras substâncias que não se relacionam diretamente à preservação da vida desse vegetal, embora proporcionem a sobrevivência e perpetuação da espécie, pela liberação de substâncias de defesa contra herbívoros,

atração de polinizadores, como agentes de coloração, entre outros (SIMÕES et al., 2001; MACHADO, 2007).

Os óleos essenciais são conhecidos como um produto natural que contêm compostos aromáticos voláteis, gerados pelo metabolismo secundário das plantas. Apesar de todos os órgãos da planta serem capazes de acumular o óleo, sua composição pode ser diferenciada em relação a localização no vegetal, ou seja, nas flores, folhas, casca, semente, frutas, raízes, entre outros (BASER; BUCHBAUER, 2016; SIMÕES et. al, 2001).

Segundo Santin (2013), o uso de plantas medicinais surge como uma alternativa para a medicina tradicional, todavia, existem muitas variedades biológicas poucos estudadas que acabam sendo utilizadas de maneira incorreta, podendo causar intoxicação ao organismo. Dessa maneira, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é o órgão federal do Brasil responsável pelo registro de fármacos fitoterápicos industrializados, certificando o consumo seguro e uso sustentável da biodiversidade das plantas medicinais. Para que ocorra a validação da indicação de um fitoterápico é necessário respeitar os protocolos da regulamentação federal vigente, os quais são modificados com o decorrer do tempo.

Observando a importância dos medicamentos naturais, torna-se fundamental a caracterização dos padrões de toxicidade de óleos essenciais, especialmente por referir-se a uma mistura complexa de compostos apolares altamente lipossolúveis (CARVALHO et al., 2008). Esse tipo de óleo é quimicamente diferente da composição de acilgliceróis de verdadeiros óleos e gorduras (VARGAS et al., 2010). Em prol disso, o estudo da extração dos óleos essenciais e seus componentes são muito significativos para a pesquisa.

Sob o decreto n° 50.040 de 24 de janeiro de 1961, a ANVISA regulamenta como "essência natural", "óleo essencial", "óleo etéreo", ou simplesmente "essência" o produto aromático, sávido, volátil, sob a forma oleosa, extraído de vegetais que podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados (BRASIL, 1961).

Por outro lado, para a International Organization for Standardization (ISO), nem todos os extratos odoríferos são considerados "óleo essencial". De acordo com o documento ISO 9235.2, somente é conceituado como tal, aquilo que é obtido de matérias-primas vegetais por meio de destilação por arraste com vapor de água dos pericarpos de frutos cítricos. O produto derivado de outros métodos de extração,

abrangendo a extração supercrítica e com fluido pressurizado, não estão em conformidade com a definição da ISO, portanto podem ser nomeados como extratos (BASER; BUCHBAUER, 2016).

Dessa forma, cabe ainda citar as oleoresinas que são extraídas com a ajuda de solventes orgânicos, através do material vegetal seco ou fresco. Elas possuem em sua composição todos componentes lipofílicos do vegetal, o próprio óleo essencial e, geralmente, ácidos graxos, metil ésteres de ácidos graxos, pigmentos, cumarinas, psolarenos, esteróis e flavonas. Esse extrato sólido a temperatura ambiente apresenta um aroma mais concentrado e alta atividade biológica devido as propriedades antioxidantes e antimicrobianas que seus componentes possuem. Por isso, assim como o óleo essencial, as oleoresinas também geram interesse por parte da indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia (REVERCHON, 1997; DOGENSKI, 2013).

#### 1.4 APLICAÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OU EXTRATOS NATURAIS

De acordo com Marques (1958), os óleos essenciais são utilizados como aromas na perfumaria e para produtos industriais, saborizantes ou flavorizantes na indústria de alimentos e de bebidas (alcoólicas ou não), possibilitam a obtenção de produtos terapêuticos, de solventes, emulsivos industriais e de produtos intermediários ou iniciais em processos sintéticos para substâncias variadas. Podem ser comercializados na forma bruta ou beneficiada, de modo a fornecer substâncias purificadas como o limoneno, citronelal, eugenol, mentol, citral e safrol (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; DOGENSKI, 2013).

O óleo de citronela é um óleo essencial extraído das folhas de diferentes espécies de *Cymbopogon* e é constituído de monoterpenos, que representam aproximadamente 80% de sua composição, no entanto, também é possível constatar sesquiterpenos. Os terpenóides mais encontrados nesse óleo são o geraniol, citronelol e citronelal, substâncias que são muito utilizadas para a síntese de fragrâncias, fabricação de velas, incenso, cremes, loções e na indústria de alimentos como flavorizantes (VARGAS et al., 2010).

O geraniol é um líquido incolor, com aroma de rosas, e está presente em praticamente todos os óleos essenciais que contenham terpenos, usualmente como um éster. Pode ser empregado em aromas de groselha, melão, maçã vermelha,

laranja, limão, abacaxi, melancia e mirtilo, além de ser aplicado a composições de sabores em pequenas quantidades para acentuar notas cítricas. O citronelol também é um líquido incolor com um adocicado odor de rosas, porém é mais estável que o geraniol. É extremamente utilizado como material para fragrâncias, principalmente para notas de rosas e composições florais no geral e, para aprimorar o sabor cítrico de produtos alimentícios. Já o citronelal possui um aroma refrescante que remete a erva-cidreira e é o responsável pelo odor característico da citronela. Pode ser utilizado em algumas sínteses químicas, em sabonetes perfumados e detergentes (SURBURG; PANTEN, 2006).

O óleo de citronela ganhou grande repercussão por suas propriedades antimicrobianas, herbicidas e repelente de insetos, podendo ser utilizado na substituição de fungicidas químicos, evitando efeitos potencialmente prejudiciais à saúde humana, vida aquática e terrestre (MORAES et al., 2003).

Apesar da citronela ser mais conhecida pela repelência, estudos demonstram que seus componentes podem ser empregados em outros setores, visto que a US Food and Drug Administration (FDA) e Flavor and Extract Manufacturers' Association (FEMA) classificam a citronela e geraniol como GRAS (Generally recognized as safe), ou seja, seguro para consumo (CANADA, 2004). Além disso, Sinha et al. (2014) pesquisou sobre a toxicidade do óleo de citronela e seu maior componente (geraniol) e, concluiu que o geraniol, mesmo em altas concentrações, não altera a atividade mitocondrial e, portanto, não induz danos ao DNA. E o óleo de citronela é considerado seguro para consumo humano em baixas concentrações.

Algumas limitações de concentração para uso desse óleo foram indicadas pelo Conselho da Europa, que limitaram níveis entre 13-48 ppm para conferir sabor em bebidas alcoólicas e não-alcoólicas, chicletes, balas duras e macias, cereais matinais, gelatinas, pudins, doces, laticínios e alimentos de panificação (COUNCIL OF EUROPE, 2000). A Pest Management Regulatory Agency (PMRA) ainda relata que baseado nas estimativas de consumo e avaliação de segurança dos componentes do óleo, usando um procedimento que leva em consideração a estrutura química, o destino metabólico e os dados de toxicidade disponíveis na literatura, o uso do óleo de citronela como um agente flavorizante em alimentos não apresenta uma preocupação de segurança (CANADA, 2004).

Sinha, Biswas e Mukherjee (2011), comprovaram o efeito antigenotóxico do óleo contra danos no DNA induzidos por um agente alquilante (metil-metanosulfonato)



e um agente oxidativo (peróxido de hidrogênio), sugerindo que o uso do óleo pode proporcionar um efeito citoprotetor devido ao seu potencial de inibição da peroxidação lipídica.

Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2014) observou que o óleo de citronela pode servir como uma substância hidrofóbica com atividade antioxidante para ser utilizado no aperfeiçoamento de um filme biopolímero aplicado em embalagem ativa e solúvel para ingredientes ou condimentos em alguns tipos de alimentos, como macarrão instantâneo. Arancibia et al. (2014) também incorporou o óleo em um filme biodegradável a base de proteína de soja e concluiu que essa adição foi efetiva contra fungos patogênicos. Assim como Pires et al. (2013), que adicionou óleo de citronela em filmes de proteína de peixe, autenticando o aumento da atividade antioxidante e redução da permeabilidade do vapor de água. Similarmente, Shen e Kamdem (2015) desenvolveram películas biodegradáveis incorporando uma porcentagem de óleo essencial de citronela e confirmaram que houve um efeito significativo na resistência mecânica da embalagem, redução notável na permeabilidade ao vapor de água e uma ligeira melhora na temperatura de degradação desses filmes ativos, que podem ser aplicados em indústrias de alimentos.

Além dessas propriedades para filmes biodegradáveis em alimentos, o óleo pode servir como desinfetante no combate a bactérias e fungos para superfícies de manipulação de alimentos.

Os componentes do óleo ainda podem ser utilizados separados, como no estudo de Victoria et al. (2012) que demonstra a atividade antimicrobiana de citronelal e citronelol contra três espécies importantes de bactérias patogênicas de origem alimentar: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e de *Salmonella Typhimurium*. Lenardão et al. (2007), inclusive aborda que o citronelal é um composto chave para sínteses orgânicas, pois é facilmente disponível a partir das fontes naturais ou preparado sinteticamente, possui um preço competitivo, biodegradável e possui alto grau de pureza.

Por outro lado, o látex extraído da janaúba tem sido mais empregado em pesquisas para uso medicinal. Em estudos Uzabakiliho, Largeau e Casadevall (1987), identificaram que esse látex possui como maiores constituintes triterpenóides, ionol (antioxidante de grau alimentício) e ácidos aromáticos. Andersen et al. (2010), isolou das folhas da *Synadenium grantii* quatro tipos de antocianinas, que consistem em pigmentos importantes de plantas vasculares, com atividade antioxidante e

desempenham um papel fundamental na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer, diabetes, entre outros (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Em estudo direto com a planta, De Oliveira et al. (2013) investigou e comprovou a ação citotóxica da janaúba contra células de melanoma B16F10 e, também, o efeito deletério sobre a replicação celular e a indução da morte dessas células. Em ensaios *in vivo*, uma redução significativa de volume do tumor em ratos portadores do melanoma foi observada. Os autores ainda identificaram e isolaram dois constituintes da planta, o euphol e citrostadienol. O primeiro consiste em um álcool triterpeno tetracíclico com ação anti-inflamatória e imunológica (DUTRA et al., 2012; AMAZÔNIA FITOMEDICAMENTOS LTDA., 2011).

Em resumo, a relevância da aplicação desses dois vegetais está progressivamente se mostrando mais definida, todavia estudos mais pontuais são cruciais para que as matrizes sejam apropriadamente utilizadas em indústrias ou pela própria população.

## 1.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

### 1.5.1 Destilação

Os procedimentos de extração de substratos naturais progrediram nos últimos anos, de modo a aumentar o rendimento e qualidade dos produtos obtidos. Alguns aspectos influenciam a produção de óleos essenciais, como os fatores genéticos e ambientais, e outros influenciam no rendimento, como o método e o tempo de extração (OLIVEIRA et al., 2012).

Os métodos de destilação são relativamente simples, baratos e favoráveis ao meio ambiente, produzindo óleos de boa qualidade. Geralmente é utilizado para a extração de óleo essencial de gramíneas (MANAF; MUSTAPA; MUSTAPA, 2013). A extração se torna viável pois quando a matéria-prima é exposta a uma corrente de vapor, seus óleos voláteis são vaporizados. Essa mistura de vapores de óleo e água é transportada a um condensador, transformando os vapores em líquidos que são despejados e recolhidos em um separador (GALVÃO, 2004).

Segundo Willians (1996), a extração a vapor ainda pode ser classificada como: destilação com água, destilação a vapor úmido e destilação a vapor seco. No caso da destilação com água, ou como é mais conhecida hidrodestilação, a matriz é colocada

diretamente em contato com a água em ebulição, podendo ficar imersa ou flutuando dependendo da densidade. Na destilação a vapor úmido o material é colocado sobre uma placa perfurada, com uma distância do fundo do extrator que é preenchido com água até a placa, dessa forma, a matéria-prima entra em contato somente com o vapor d'água. Já na destilação a vapor seco, o vapor é gerado por caldeiras ou autoclaves e é injetado diretamente na amostra acondicionada em cesto metálico (GALVÃO, 2004; CZAIKOSKI, 2014).

Segundo Anitescu, Doneanu e Radulescu (1997) e Czaikoski et al. (2015a), apesar da hidrodestilação ser o procedimento de extração mais utilizado, apresenta problemas como a degradação de compostos insaturados devido a ação de temperaturas elevadas e a presença de água, que possivelmente ocasiona modificação química dos óleos essenciais, ocasionando compostos de aromas indesejáveis devido ao calor.

#### 1.5.2 Extração por solventes orgânicos

Em alternativa a extração a vapor, podemos destacar a extração por solventes orgânicos, especialmente ao método desenvolvido por Franz von Soxhlet em 1879, que consiste em um refluxo sucessivo do solvente em um processo intermitente, com a amostra submersa em um solvente puro. Na fase inicial, o solvente é aquecido para alcançar a fase vapor, é condensado e despejado no cilindro que comporta o cartucho de papel filtro onde está acondicionada a amostra. Enquanto o cilindro vai sendo preenchido com o solvente, ocorre a solubilização do extrato a ser extraído da amostra. Assim que o cilindro fica completamente cheio, essa mistura de solvente com extrato é sifonada para o balão onde o solvente encontrava-se inicialmente (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009; CZAIKOSKI, 2014). Os solventes mais utilizados são os álcoois (etanol e metanol), cetonas (acetona e metiletilcetona), hidrocarbonetos alifáticos (éter de petróleo e o n-hexano), éter etílico e água (SIMÕES et al., 2001).

No método de Soxhlet, a amostra permanece em contato com o solvente e em constante renovação, o que é visto como uma das consideráveis vantagens, além de ser uma metodologia simples e sem demanda de treinamento especializado para aplicação e, normalmente extrai maior quantidade de massa que outras técnicas. Em contrapartida, o longo tempo necessário para a extração e a grande quantidade de

solvente utilizado não apenas torna a análise mais cara, como também causa danos ao meio ambiente. Além disso, uma vez que a temperatura do sistema permanece relativamente alta, posto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante e depende de qual solvente é escolhido, existe a possibilidade de degradação térmica compostos mais sensíveis a temperatura (CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

Baseado em Uquiche, Cirano e Millao (2015), as desvantagens proporcionadas pelas técnicas mais antigas e consolidadas de extração, explicam o interesse na investigação de novas tecnologias como a extração supercrítica usando CO<sub>2</sub> e propano como solventes, para intensificar a qualidade dos extratos. Esta metodologia tem sido extensamente estudada para a separação de óleos essenciais a partir de substratos herbáceos.

### 1.5.3 Extração por fluido supercrítico

Conhecida a mais de um século, seu estudo e sua aplicação se intensificaram apenas nas últimas décadas (MCHUGH; KRUKONIS, 1994). Aplicações têm sido desenvolvidas: nas indústrias de alimentos e farmacêutica, na extração de óleos e gorduras como compostos bioativos presentes em tecidos de plantas e animais, aromas e óleos essenciais (SAPKALE et al., 2010); na indústria têxtil, química e petroquímica na produção de combustíveis e polímeros; e nas áreas de toxicologia e meio ambiente, na remoção de metais pesados (AHMAD et al., 2019).

É uma técnica que permite o controle de variáveis do processo como temperatura e pressão. Dessa maneira, há uma produção de extratos sem resíduos, a baixas temperaturas, de modo a evitar a degradação de compostos ativos. Os substratos herbáceos contêm baixas concentrações de óleos essenciais e, uma vez que o CO<sub>2</sub> é considerado um solvente não polar, que é adequado para a extração de substâncias lipofílicas (tais como os óleos essenciais), a extração supercrítica torna-se um método adequado para a recuperação dos compostos de interesse (DEL VALLE; AGUILERA, 1999).

Fluidos supercríticos têm características de solubilidade similares às de hidrocarbonetos leves para vários solutos e não causa os problemas gerados pelos líquidos orgânicos, como a permanência de resíduo do solvente (SAPKALE et al., 2010). O processo de extração depende principalmente de dois fatores: solubilidade

e difusão do soluto no solvente (DOKER et al., 2004), que dependem, respectivamente, da densidade e da viscosidade do solvente. Os fluidos supercríticos são muito efetivos porque podem difundir como gases e dissolver como líquidos devido à sua baixa viscosidade e alta densidade. Pequenas alterações na pressão ou temperatura podem alterar a densidade do fluido, fazendo com que, posteriormente, o soluto seja facilmente precipitado (AHMAD et al., 2019, SAPKALE et al., 2010; MCHUGH; KRUKONIS, 1994).

Apesar disso, alguns fatores podem afetar a eficiência da extração supercrítica, como temperatura, pressão, tempo de extração, taxa de fluxo e o tamanho de partícula. Sendo que a temperatura e a pressão são os principais fatores que afetam o comportamento de extração, uma vez que estes fatores determinam o poder solvente do fluido supercrítico. Em estudos sobre o efeito da temperatura e da pressão, os outros fatores são tratados para manter um valor constante (UQUICHE; CIRANO; MILLÃO, 2015).

A remoção do soluto depende de uma cadeia de fenômenos que, no caso de matrizes porosas, inclui: a solubilização dentro dos poros; a difusão até o exterior do sólido; e a difusão da superfície externa do sólido para o fluxo de solvente. A porosidade do leito contendo a matriz de extração é de fundamental importância devido à superfície de contato determinar a cinética dos dois processos, de solubilização e difusão. Também é importante levar em conta que materiais biológicos podem inchar durante o processo, levando ao aumento do tamanho poros (DOKER et al., 2004; PAWLISZYN, 1993). No caso de sólidos não porosos, a difusão dentro do sólido governa a velocidade do fenômeno, e a vantagem da alta transferência de massa dos fluidos supercríticos não influencia o processo (MCHUGH; KRUKONIS, 1994).

O CO<sub>2</sub> supercrítico é o fluido mais utilizado para extrações devido a sua relativamente baixa pressão crítica (7,38 MPa) e temperatura crítica (31,1 °C), facilitando a manipulação e evitando a degradação de compostos termolábeis. O fluido pode ser removido do extrato facilmente, ao contrário de solventes tradicionais como o hexano. Além disso, é barato, não é explosivo ou tóxico em baixas concentrações e seu reuso é benéfico para a atmosfera porque seu acúmulo leva à intensificação do efeito estufa (SAHENA et al., 2009).

O fluido possui alta afinidade e seletividade para compostos apolares de baixo peso molecular e compostos orgânicos oxigenados de peso molecular médio

(NASCIMENTO et al., 2016; SAHENA et al., 2009). Porém, sua alta seletividade pode ser indesejável quando existem compostos de interesse que apresentam grupos polares e de alto peso molecular. Nesses casos, pequenas adições de co-solventes polares (1-10 %) aumentam a faixa de compostos extraídos e, conseqüentemente, o rendimento da extração. O etanol é o mais utilizado (SAHENA et al., 2009; AZEVEDO et al., 2008) principalmente para a extração de antioxidantes (RAVENTÓS; DUARTE; ALARCÓN, 2002; JUCHEN et al., 2019; LASTA et al., 2019; MONTES et al., 2019), interagindo fisicamente e formando pontes de hidrogênio com os produtos extraídos (TONATO et al., 2019).

Produzido a partir de fontes renováveis, o uso do etanol como co-solvente é menos danoso para o meio ambiente (JUCHEN et al., 2019), ao contrário de outros co-solventes como o metanol que, além de ser proveniente de fontes fósseis, é tóxico (SAHENA et al., 2009). Apesar disso, a adição de etanol em excesso pode causar uma diminuição do rendimento por dificultar a interação do CO<sub>2</sub> com a matriz de extração (UQUICHE; CAMPOS; MARILLÁN, 2019) e sua presença aumenta a temperatura crítica do fluido (AZEVEDO et al., 2008).

Assim como os fluidos supercríticos, os fluidos comprimidos também podem apresentar baixa viscosidade e alta difusividade e solubilidade porque possibilitam o aumento da temperatura acima da temperatura de ebulição em condições atmosféricas (MUSTAFA; TURNER, 2011). O propano comprimido é um ótimo solvente de triacilgliceróis (CORSO et al., 2010; PEDERSSETTI et al., 2011), tocoferóis, fitoesteróis e carotenoides (CUCO et al., 2019), superando o CO<sub>2</sub> supercrítico. Além disso, também não deixa resíduos tóxicos no extrato, possui baixo custo e é necessário aplicar pressões menores que no caso do CO<sub>2</sub> supercrítico, o que facilita a operação e a torna mais segura. Devido a ser um fluido inflamável, pode ser utilizado em conjunto com o próprio CO<sub>2</sub> (PEREIRA et al., 2019).

A literatura dispõe de inúmeros trabalhos utilizando a extração supercrítica em matrizes vegetais. Para a citronela, por exemplo, Galvão (2004) utilizou o CO<sub>2</sub> e variou a vazão do solvente, pressão e temperatura. Moncada, Tamayo e Cardona (2014) também utilizaram o CO<sub>2</sub> como solvente para extração, assim como Malaluan e Malaluan (2015). Pereira (2010) utilizou o óleo essencial da citronela extraído com CO<sub>2</sub> supercrítico para avaliar a atividade antibacteriana. Contudo, não há relatos na literatura de estudos que utiliza o propano como solvente na extração supercrítica para obtenção do óleo de citronela. Do mesmo modo, também não há relatos de trabalhos

que utilizem tanto o CO<sub>2</sub> quanto o propano para extração supercrítica do extrato de janaúba.

## 1.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Diante de inúmeras pesquisas e evidências substanciais, podemos consolidar o papel dos radicais livres e outros oxidantes como agentes motivadores do envelhecimento celular e de doenças relacionadas a esse envelhecimento, como câncer, artrite, choque hemorrágico, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imune, doenças metabólicas e doenças neurodegenerativas (ATOUI et al., 2005; SOUSA et al., 2007).

Os radicais livres reagem com outras células com a finalidade de alcançar uma forma estável, pois são compostos instáveis e altamente reativos já que possuem um elétron desemparelhado. Sendo assim, são capazes de mudar as propriedades dos alvos biológicos nas células que sofrem ataques. Tais compostos são formados devido a fatores ambientais, como poluição atmosférica, óxidos de nitrogênio, ozônio, radiação UV, tabagismo e metais pesados tóxicos e, também, por efeito de substâncias químicas, como solventes orgânicos, hidrocarbonetos halogenados, pesticidas e citostáticos (SPITELLER, 2001).

A produção desses radicais livres, em seres vivos, é limitada aos compostos antioxidantes, que podem possuir origem endógena ou serem procedentes de origem alimentar e outras fontes. Sob a condição de estresse oxidativo grave, devido a um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e sistema de defesa preliminar, moléculas biológicas, incluindo DNA, proteínas, carboidratos e lipídios serão danificadas. Em vista disso, lesões oxidativas de caráter cumulativo ocorrem na insuficiência da disponibilidade de antioxidantes, os quais são capazes de neutralizar ou desativar os radicais livres (ATOUI et al., 2005; DEY et al., 2016).

Dey et al. (2016) relatam que compostos fenólicos bioativos estão sendo alvo de grande atenção nos setores alimentar e farmacêutico devido ao seu potencial antioxidante. Diversos estudos foram realizados para explorar o potencial antioxidante de compostos fenólicos a partir de diversas fontes naturais, a fim de substituir o uso de antioxidantes sintéticos que podem corresponder um perigo para a saúde em produtos alimentares.

Em estudos sobre a composição do óleo de citronela, alguns autores relataram que este apresenta uma mistura com mais de uma dúzia de monoterpenos, sendo aldeídos e álcoois os principais. Outros componentes predominantes deste óleo são acetato de citronelilo,  $\beta$ -bourboneno, acetato de geranil, elemol, L-borneol e nerol (WIJESEKERA; JAYEWARDENE; FONSEKA, 1973; PATRA; SINGH; KALRA, 1997; SILVA et al., 2010a).

Sobre a composição química e potencial biológico do óleo de janaúba, alguns estudos descritos na literatura mostram que os terpenos são compostos metabólicos presentes, além de ésteres diterpenos, alguns autores relatam o isolamento de triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos tanto do látex quanto das folhas da planta, dentre eles o euphol, o tirucalol, o euforbol, e o germanicol (UZABAKILIHU; LARGEAU; CASADEVALL, 1987; HASSAN; MOHAMMED; MOHAMED, 2012).

Dois tipos de metabólitos são encontrados nas plantas, os primários e secundários. Os metabólitos primários respondem pela sobrevivência, exercendo função nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes. Já os metabólitos secundários são associados às estratégias de defesa das plantas (NASS, 2007). Estes, destacam-se por apresentarem diversas atividades biológicas (TAYZ; ZEIGER, 2004). Os principais metabólitos secundários são distribuídos em três grupos de acordo com sua rota biossintética: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (TAYZ; ZEIGER, 2004).

Outras propriedades desses óleos relacionadas com compostos fenólicos já foram estudadas e descritas na literatura. Especiarias, ervas, extratos e óleos essenciais de plantas medicinais, ainda são investigados em relação a seu potencial antimicrobiano, pois estudos anteriores já comprovam que podem controlar o crescimento de variedades de microrganismos, entre eles, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (MARUZELLA, 1960; MARUZELLA; SICURELLA, 1960; YOUSEF; TAWIL, 1980; AURELI; CONSTANTINI; ZOLEA, 1992).

Antimicrobianos isolados das plantas agem como reguladores do metabolismo intermediário, de modo a ativar ou bloquear reações enzimáticas que afetam diretamente uma síntese protéica em nível nuclear ou ribossomal, ou alterando estruturas de membranas (SINGH; SHUKLA, 1984). Diversos estudos mostram que os monoterpenos manifestam efeitos prejudiciais à membrana celular microbiana (TABELA 1).



TABELA 1 - ESTUDOS MOSTRANDO A AÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS SOBRE DIFERENTES MICRORGANISMOS

Composto	Microrganismo	Ação	Referência
Carvacrol	<i>Listeria monocytogenes</i>	Interrupção do crescimento microbiano	Kim e Nair, 1995
1,8-cineol	<i>Listeria Monocytogenes</i>	Interrupção do crescimento microbiano	Lis-Balchim e Deans, 1997
4-terpineol	<i>Escherichia coli</i>	Perda de material celular e coagulação de constituintes citoplasmáticos	Gustafson et al., 1998
Compostos carbonílicos	<i>Staphylococcus, Listeria, Salmonella e Escherichia coli</i>	Controle do crescimento microbiano	Bowles e Juneja, 1998
Eugenol	<i>Listeria monocytogenes</i>	Interrupção do crescimento microbiano	Blaszyk e Holley, 1998 Hao; Brackett e Doyle, 1998
4-terpineol	<i>Escherichia coli</i>	Perda de íons de potássio e a inibição da respiração	Cox et al., 2000
1,8-cineol	<i>Candida albicans</i>	Ação antifúngica	Mondello et al., 2006
Citral	<i>Candida sp.</i>	Ação sobre a membrana celular, bloqueio da síntese de membrana e Inibição da respiração celular.	Da Silva et al., 2008

Fonte: Adaptado de Toscan, 2014.

Os componentes de óleos essenciais têm sido estudados por possuírem atividades biológicas, conseqüentemente, tornam-se um grande potencial como aditivos naturais em indústrias de alimentos (na conservação de alimentos crus e processados), farmacêuticas, para medicina alternativa e em terapias naturais (LIS-BALCHIN; DEANS, 1997; MESOMO, 2013).

O crescente interesse em avaliar a capacidade antioxidante é decorrência de vários estudos sobre a importância dos antioxidantes em sistemas biológicos (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

Com base nessas evidências e necessidades, os estudos de métodos utilizados na avaliação destes compostos têm crescido cada vez mais. Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante, permitindo assim uma rápida seleção de substâncias potencialmente interessantes. Dentre essas técnicas, destacam-se os métodos colorimétricos *in vitro*.

Em geral, as metodologias antioxidantes possuem o mesmo princípio. Um radical sintético é gerado e a capacidade de uma amostra em eliminar ou neutralizar o radical é monitorada espectrofotometricamente (ARNAO, 2000).

Conforme as reações químicas envolvidas, grande parte dos métodos empregados na avaliação da atividade antioxidante são divididos em duas categorias:

(1) os que se baseiam na reação de transferência de elétrons e sequestro de radicais livres e (2) aqueles baseados na reação de transferência de átomos de hidrogênio (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A técnica do sequestro do radical livre DPPH (2,2 -difeníl -1- picril –hidrazil) é um dos métodos colorimétricos mais utilizados dentre as metodologias propostas para avaliar a atividade antioxidante, uma vez que consiste em um método simples e eficiente (CARMONA-JIMÉNEZ et al., 2014).

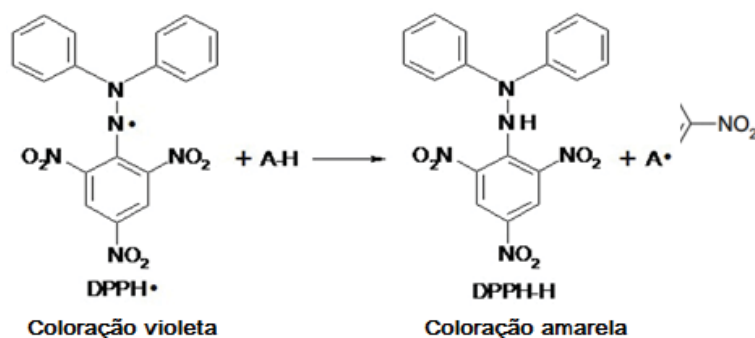
O método da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH foi inicialmente proposto por Blois (1959) e Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Atualmente, esse método é bastante conhecido pelas características atribuídas à molécula de DPPH, como ser um radical orgânico livre estável, apresentar boa estabilidade na ausência de luz, aplicabilidade e viabilidade (DENG; CHENG; YANG, 2011).

A avaliação da atividade antioxidante por este método caracteriza-se pela descoloração da solução contendo o radical livre DPPH (LI et al., 2015). Este radical é solúvel em metanol e apresenta coloração violeta. Quando um antioxidante é misturado com a solução metanólica de DPPH, o radical livre é reduzido ocorrendo uma mudança de cor de violeta para amarela, e conseqüentemente resultando na diminuição da absorbância do radical DPPH (SCHERER; GODOY, 2009).

Essa mudança é medida espectrofotometricamente a 517 nm, mostrando a eficiência do antioxidante em remover o radical (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995).

A reação de captura do radical livre DPPH pode ser visualizada a seguir, na FIGURA 3.

FIGURA 3 - MECANISMOS DE REAÇÃO ENTRE O RADICAL DPPH• E UM ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA TRANSFERÊNCIA DE UM ÁTOMO DE HIDROGÊNIO



Fonte: Adaptado de Oliveira, (2015).

Os resultados são apresentados em termos de coeficiente de inibição ( $IC_{50}$ ), que é definido como a concentração mínima de amostra necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50% (CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Tal valor é calculado através da representação gráfica da inibição percentual do radical DPPH em função da concentração do antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

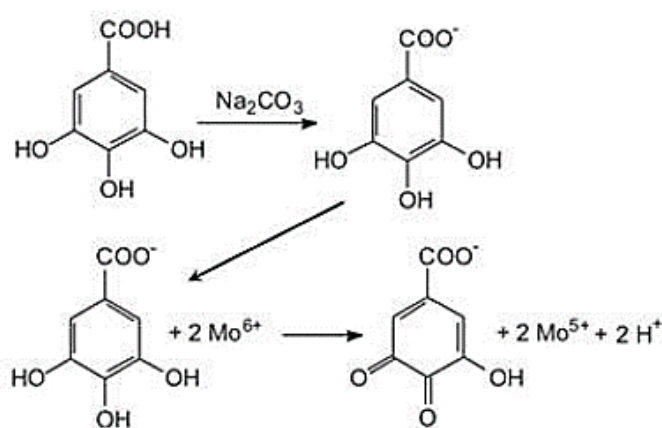
Segundo Moon e Shibamoto (2009), o método do sequestro do radical livre DPPH é empregado em mais de 90% dos estudos de avaliação antioxidante de substâncias puras, misturas ou matrizes complexas.

Já os compostos fenólicos consistem em antioxidantes primários capazes de interferir no processo de oxidação como terminadores de radicais livres e quelante de metais (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Uma série de técnicas pode ser utilizada para a quantificação espectrométrica de compostos fenólicos totais, no entanto, a utilização do reagente Folin-Ciocalteu é extensivamente mais utilizada e se baseia em reações de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e íons metálicos (SILVA et al., 2010b).

O reagente consiste na mistura dos ácidos fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), que são reduzidos a partir dos extratos testados. Um meio com pH alcalino permite que substâncias redutoras, como fenólicas, dissociem um próton, levando à formação do ânion fenolato. Tal ânion possui capacidade de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu formando óxido de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e óxido de molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ), mostrado na FIGURA 4 (GENOVESE et al., 2003).

FIGURA 4 - REAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REDUTORAS COM REAGENTE DE FOLIN-CIOCALTEU



Fonte: Pires et al., 2017.

Os óxidos formados apresentam coloração azul, que são analisados em espectrofotômetro a 765 nm, possibilitando a quantificação das substâncias fenólicas. Dessa forma, quanto mais azul a coloração final da reação maior a quantidade de substâncias redutoras ou substâncias fenólicas (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

## CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO DE SOLUTOS DE CAPIM CITRONELA UTILIZANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO, PROPANO COMPRIMIDO E ETANOL COMO CO-SOLVENTE: AVALIAÇÃO FENÓLICA TOTAL

O conteúdo deste capítulo foi publicado na revista *The Journal of Supercritical Fluids*  
DOI 10.1016/j.supflu.2018.03.003.

Este estudo relata a cinética da extração de citronela por scCO<sub>2</sub>, propano comprimido, scCO<sub>2</sub> + etanol, propano comprimido + etanol. Os rendimentos de extração foram melhorados pela adição de etanol para ambos os solventes comprimidos. A cinética e o rendimento de extração em equilíbrio ( $Y_e$ ) foram, em geral, investigados na faixa de pressão de 2 a 20 MPa a 20 °C, 40 °C e 60 °C. Na temperatura de 40 °C e pressões similares, o propano foi vantajoso em relação ao CO<sub>2</sub> em termos de ambos os parâmetros cinéticos (aumento de  $4,1 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$  para  $7,3 \pm 0,7 \text{ s}^{-1}$ ) e  $Y_e$  (aumento de  $2,35 \pm 0,08\%$  para  $3,76 \pm 0,09\%$ ). Além disso, usando propano comprimido + etanol, ambos os parâmetros de extração ( $k = 16 \pm 4 \text{ s}^{-1}$  e  $Y_e = 6,3 \pm 0\%$ ) foram ainda mais aprimorados. O teor total de fenólicos foi semelhante para todos os extratos avaliados em diferentes condições e métodos de extração, com exceção do extrato obtido por hidrodestilação, onde foi obtido maior valor ( $1,4 \pm 0,4 \text{ mg EAG g}^{-1}$ ) quando comparado aos solventes comprimidos.

### 2.1 INTRODUÇÃO

A citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) é uma planta aromática nativa do sudeste asiático, cuja popularidade aumentou após a sua repelência contra o mosquito *Aedes aegypti* (TAWATSIN et al., 2001). Embora a citronela seja conhecida principalmente por essa propriedade, o FDA (Food and Drug Administration), FEMA (Flavor and extract manufacturers association of the USA), Chemical Health Hazard Assessment Division (CANADÁ, 2004) e pesquisadores independentes (SINHA et al., 2014) concluíram que o óleo de citronela e seu principal componente geraniol são seguros, e têm sido sugeridos para diferentes aplicações. Por exemplo, na composição de filmes bioplásticos na indústria

alimentícia devido às suas propriedades hidrofóbicas, antioxidantes e bioativas (SINHA; BISWAS; MUKHERJEE, 2011; PIRES et al., 2013; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2014; ARANCIBIA et al., 2014; SHEN; KAMDEM, 2015).

Dentre as diversas variáveis que podem ter influências positivas no rendimento extrativo de solutos e na qualidade dos extratos obtidos da citronela e de outras plantas em geral (por exemplo, fatores genéticos e agronômicos), as inovações nas técnicas de extração sólido-líquido têm sido particularmente exploradas na literatura (ASSIS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012; LEBOVKA; VOROBIEV; CHEMAT, 2016; KOTOVICZ; ZANOELO, 2013; ZHANG et al., 2011). No caso particular da extração de óleo de citronela, a razão para testar novos métodos de extração está em que os métodos convencionais, como hidrodestilação e Soxhlet, têm efeitos prejudiciais sobre a qualidade do extrato, geralmente atribuídos às altas temperaturas e longos tempos de extração exigidos pela extração por esses métodos (ANITESCU; DONEANU; RADULESCU, 1997; DE CASTRO; GARCIA-AYUSO, 1998; CZAIKOSKI et al., 2015b).

Como uma alternativa aos métodos tradicionais, a extração com dióxido de carbono supercrítico tem sido enfatizada (ESMELINDRO et al., 2005; CARDOZO et al., 2007) uma vez que a operação é comumente realizada a baixa temperatura, e uma das vantagens mais importantes do uso desta técnica é evitar a perda de compostos termolábeis por evaporação ou degradação térmica. No entanto, a baixa toxicidade, a natureza não carcinogênica, seletividade, inércia, baixa pressão crítica e a temperatura são propriedades importantes adicionais do CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente (DEL VALLE; AGUILERA, 1999; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Vantagens semelhantes são obtidas utilizando-se propano comprimido, que é a principal razão para muitas investigações que consideraram seu uso como solvente com propósitos análogos (CZAIKOSK et al., 2015a; FREITAS et al., 2008; NIMET et al., 2011). Nas circunstâncias atuais, ambos os solventes são recomendados positivamente devido à sua natureza não polar que os torna especialmente adequados para a extração de compostos lipofílicos, como o óleo essencial de citronela (DEL VALLE; AGUILERA, 1999). Para aumentar o rendimento da extração, combinações de solventes polares com CO<sub>2</sub> supercrítico ou propano comprimido foram sugeridas, sendo usualmente referidos como modificadores ou co-solventes (TRABELSI et al., 2016; QUEIROZ; CAJAIBA, 2016; SOLTANI; MAZLOUMI, 2017).

Em resumo, tendo em vista a importância crescente do óleo de citronela e seus compostos químicos em geral, a extração de solutos de folhas de citronela foi investigada usando CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido com e sem adição de etanol como co-solvente polar. Em particular, examinou-se a influência da pressão e temperatura na cinética de recuperação de solutos de citronela e no rendimento de extração em equilíbrio. O teor fenólico total foi analisado nos extratos obtidos em diferentes condições, isto é, CO<sub>2</sub> supercrítico com e sem etanol a uma temperatura de 40 °C e diferentes pressões e propano comprimido com e sem etanol em diferentes temperaturas e pressões. Os extratos obtidos por extração de Soxhlet utilizando-se um solvente não-polar (hexano a 68 °C), um solvente polar (etanol a 78 °C) e por hidrodestilação também foram analisados.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Matéria-prima

Todas as amostras de folhas de citronela utilizadas neste estudo foram obtidas em área residencial na região sul da cidade brasileira de Nova Londrina (Estado do Paraná, Brasil). As folhas foram colhidas em um único lote em março de 2016 e, posteriormente, foram lavadas com água destilada, secas com toalhas de papel e cortadas manualmente em pequenos pedaços para obter as mesmas dimensões. Após, as folhas foram colocadas em um forno de circulação de ar a 40 °C para secagem até atingir peso constante (cerca de 24 horas) (Nova Ética, Brasil). As amostras foram misturadas e acondicionadas em sacos de polietileno de baixa densidade, seladas em um selador a vácuo (Ilanuen Maschinen AG, modelo CH9100, Herisau, Suíça) e armazenadas em freezer a -18 °C ± 2 °C para posterior utilização nos experimentos de extração.

### 2.2.2 Caracterização da matéria-prima

A granulometria da amostra foi feita após a separação do tamanho das partículas com ajuda das peneiras da série Tyler (Bertel, Brasil) e agitador mecânico (Bertel, Brasil), com aberturas de 12, 20, 24, 32 e 48 mesh. O cálculo proposto por

Gomide (1983), representado pela Equação (1), foi utilizado para a determinação do diâmetro médio da partícula.

$$D_m = \sum X_i \cdot D_i \quad (1)$$

Onde:

$D_m$  = diâmetro médio das partículas (mm)

$X_i$  = fração de massa retida na peneira

$D_i$  = diâmetro de abertura da peneira (mm)

A densidade aparente foi calculada pela quantidade necessária de massa de amostra para empacotar o volume total da célula de extração, com auxílio da Equação (2).

$$\rho_a = \frac{m_{amostra}}{V_{leito}} \quad (2)$$

Onde,  $m_{amostra}$  é a massa inicial (em gramas) colocada no leito de extração e  $V_{leito}$  é o volume total da célula de extração.

Já a densidade real foi calculada através de um picnômetro de gás hélio (Quantachrome Ultrapyc 1200e), no Instituto Central de Química Analítica da UNICAMP (Campinas, Estado de São Paulo, Brasil).

Ao final, com os dados das diferentes densidades é possível calcular a porosidade total do leito de partículas, através da Equação (3) que relaciona a densidade real e a aparente.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (3)$$

Onde  $\rho_a$  densidade aparente,  $\rho_r$  é a densidade real da amostra seca e moída.

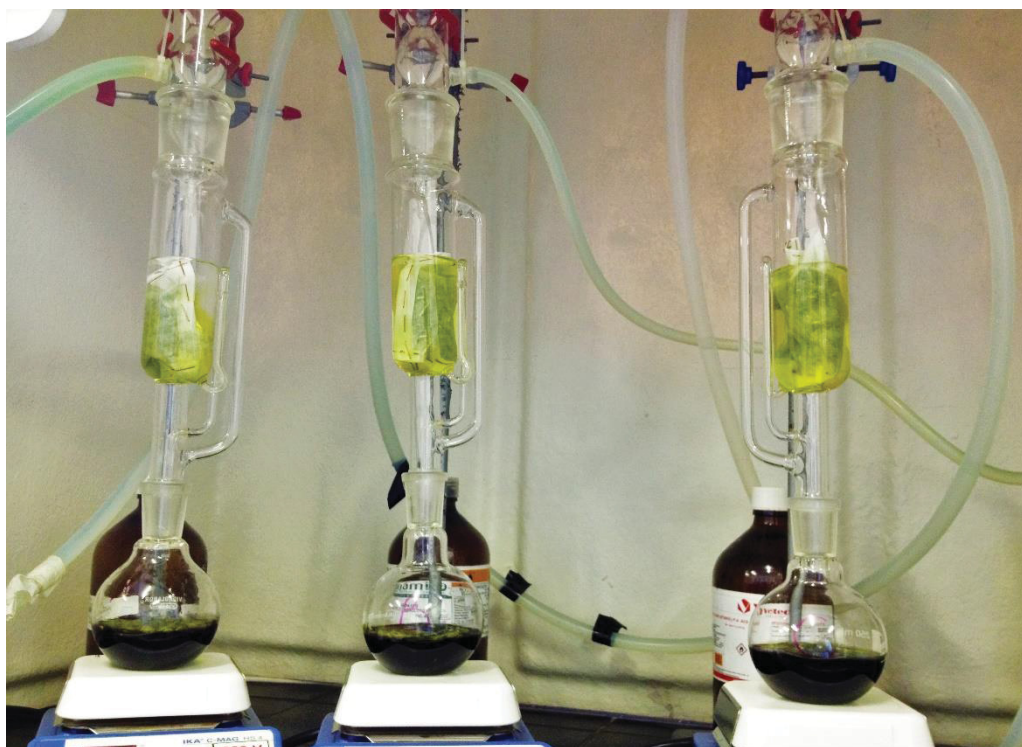
### 2.2.3 Extração por solventes orgânicos

A extração Soxhlet (Nova Ética, Vargem Paulista, Brasil) (FIGURA 5) foi realizada segundo o método adaptado da AOAC (1999), em que uma massa



aproximada de 7g de amostra sólida seca e um solvente puro (hexano, Neon, 99,8% de pureza e etanol, Neon, 99,8% de pureza) no ponto de ebulição do solvente à pressão atmosférica foram colocados em conjunto no aparelho Soxhlet durante 6 horas. No final da extração, o solvente foi removido com um evaporador rotativo (RV 10 digital, Ika, Wilmington, EUA). As execuções de extração foram realizadas em triplicada em condições idênticas.

FIGURA 5 - UNIDADE DE EXTRAÇÃO SOXHLET



FONTE: O autor (2017).

#### 2.2.4 Hidrodestilação

A hidrodestilação foi realizada seguindo passos de um procedimento relatado na literatura (ANVISA, 2010). Em tal circunstância, 25 g de folhas secas de citronela e 1 litro de água destilada foram colocadas em um frasco de fundo chato de um aparelho tipo Clevenger. A mistura foi fervida por 3 horas na pressão atmosférica produzindo um óleo claro que foi separado com sulfato anidrossódico para remoção de traços de umidade.

### 2.2.5 Extração supercrítica com fluido pressurizado

Os experimentos de extração utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico (scCO<sub>2</sub>) (99,5% de pureza na fase líquida, White Martins SA, Ponta Grossa, Brasil), propano comprimido (CP) (99,5% de pureza na fase líquida, WhiteMartins SA, Ponta Grossa, Brasil), CO<sub>2</sub> supercrítico + etanol (scCO<sub>2</sub> + EtOH) e propano comprimido + etanol (CP + EtOH) foram realizados em uma unidade de extração em escala de bancada (FIGURA 6). O etanol utilizado foi de grau analítico (Neon, 99,8% de pureza). Embora muitas vezes descrito em detalhes na literatura (CZAIKOSKI et al., 2015a; MESOMO et al., 2012; MESOMO et al., 2013; CZAIKOSKI, et al., 2015b; COELHO et al., 2016; CORREA et al., 2016; CORREA et al., 2017; PEREIRA et al., 2017), é importante mencionar que consiste basicamente de um invólucro de extração pressurizado conectado a um banho ultra-termostático (Quimis, São Paulo, Brasil, modelo 0214S2), com uma válvula de agulha (Autoclave Engineers) para controle do fluxo, uma seringa de alta pressão (modelo 500D, ISCO, Lincoln, EUA) e transdutores de pressão e temperatura, onde as incertezas na pressão e temperatura foram de  $\pm 0,15$  MPa e  $\pm 1$  °C, respectivamente.

FIGURA 6 - UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA EM ESCALA DE BANCADA



FONTE: O autor (2017).

O extrator de leite acondicionado, foi carregado com aproximadamente 12,5 a 24,0 g de matéria-prima (folhas secas e moídas de citronela). A variação da massa depende de qual condição era escolhida (com ou sem adição do etanol). Nos experimentos sem adição de etanol, apenas a matéria-prima era inserida no leite. O equipamento consistia em um cilindro de aço inoxidável ( $8,0 \times 10^{-5} \text{ m}^3$  de volume interno,  $L = 0,16 \text{ m}$ ,  $\Phi = 2,52 \times 10^{-2} \text{ m}$ ). Para verificar a influência das condições de operação nos rendimentos dos extratos, foram realizados ensaios experimentais com scCO<sub>2</sub> a 40 °C e a três diferentes pressões de 9, 12 e 20 MPa. No entanto, no caso de propano comprimido (CP), um conjunto de resultados foi obtido a partir de um planejamento fatorial  $2^2 + 1$ , variando a temperatura e a pressão de 20 a 60 °C, e de 2 a 10 MPa, respectivamente.

Para investigar a influência de um co-solvente polar na extração, as amostras de citronela eram misturadas com etanol em duas proporções de massa diferentes ( $\beta_c = 1$  e  $\beta_c = 2$ ). Essa mistura foi preliminarmente carregada no vaso de extração e, então, pressurizadas usando propano comprimido (40 °C e 6 MPa) ou scCO<sub>2</sub> (40 °C e 20 MPa).

Após o extrator ser carregado com a amostra (com ou sem adição de etanol) e a temperatura e pressão serem estabilizadas, o fluido foi inserido e um tempo de confinamento (período estático de extração) de 60 minutos foi aguardado. No final desse período, a extração dinâmica foi iniciada com uma taxa de fluxo constante de solvente (CO<sub>2</sub> ou propano) de aproximadamente  $3,33 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . O fim do período de extração dinâmica foi determinado no momento em que não era mais possível obter extrato visível e não existia mais variação no peso do tubo de vidro.

Os rendimentos de extração foram determinados periodicamente por um método gravimétrico que exige a remoção do solvente, e posteriormente a pesagem dos extratos obtidos. No caso das extrações com scCO<sub>2</sub> e propano comprimido (CP), o tempo para a amostragem era de 10 minutos, mas quando o etanol foi adicionado como co-solvente foi reduzido para 5 minutos. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar a baixas temperaturas, para posteriores análises.

#### 2.2.6 Teor de fenólicos totais

O teor total de fenólicos nos extratos foi avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Foram adicionados 0,1 mL de extrato (2 mg

$\text{mL}^{-1}$ ) a uma solução aquosa contendo 2 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 1,5 mL de carbonato de sódio (20% m / v). Os frascos com a solução final foram agitados e, assim, deixados em repouso por 2 horas. Em seguida, a absorbância dessa mistura de reação foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (SP 2000 UV, Bel Photo-nics, Brasil). O teor total de fenólicos foi calculado com uma curva de calibração previamente preparada usando ácido gálico como padrão. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente gálico (EAG) por grama do extrato (mg EAG/g de extrato).

### 2.2.7 Análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS)

Os extratos foram inseridos no equipamento GC-MS (Agilent 7890 A e Agilent 5975 C), composto por uma coluna capilar HP-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm id, 0,25  $\mu\text{m}$  espessura de filme, fenil a 5 % dimetilpolisiloxano a 95 %). Foi injetado um volume de 1,0  $\mu\text{L}$  de gás hélio, utilizado como gás de arraste. As temperaturas de fonte e quadrupolo foram 230  $^{\circ}\text{C}$  e 150  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. A varredura do espectrômetro de massa foi programada de 40,0 a 1000,0 m/z. De início, a temperatura da análise foi determinada em 50  $^{\circ}\text{C}$  e mantida por 1 minuto, após esse procedimento, a temperatura foi aumentando a uma taxa de 2  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até atingir 200  $^{\circ}\text{C}$ , na qual foi mantida, também, por 1 minuto. Na identificação dos compostos foi utilizada a base de dados da biblioteca NIST-11, através da comparação de índices de retenção (RI) a uma série de n-alcenos (C8-C40), além de outras referências presentes na literatura. Essas análises foram executadas na Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), no Departamento de Farmácia (Guarapuava, Estado do Paraná, Brasil).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de citronela utilizadas nos experimentos ficaram em formato de discos com diâmetro médio de  $6,5 \times 10^{-4}$  m, obtido a partir dos dados encontrados pela separação de tamanho nas peneiras, seguindo a metodologia sugerida por Gomide (1983), e  $2,2 \times 10^{-4}$  m de espessura medidos por um paquímetro digital (Mitutoyo 500-144B, São Paulo, Brasil). A densidade real das partículas foi de  $1240 \pm$

10 kg, e a densidade aparente de  $273 \pm 5$  kg, demonstrando uma porosidade do leito de 0,78.

Todos os resultados da variação no rendimento com o tempo das extrações realizadas foram descritos com um modelo empírico de primeira ordem, fornecido pela Eq. (4) ( $R^2 \geq 0,93$ ). Em todos os casos examinados, o procedimento de ajuste envolveu o método de otimização de Levenberg-Marquardt (EDGAR; HIMMELBLAU, 1989) e uma função objetivo dada pela soma das diferenças trimestrais entre os valores experimentais e calculados de rendimento de extração (Y).

$$Y = Y_e [1 - e^{(-kt)}] \quad (4)$$

Essa abordagem permite uma visão abrangente dos resultados da extração, porque resume os vários dados cinéticos por condição operacional em apenas dois parâmetros do modelo (k e  $Y_e$ ). O primeiro deles é a constante de taxa de extração (k) que representa uma combinação de resistências externas e internas ao transporte de massa, enquanto o segundo é o rendimento da recuperação de solutos nas condições de equilíbrio ( $Y_e$ ).

Os resultados obtidos das extrações realizadas com CO<sub>2</sub> e propano estão demonstrados abaixo nas FIGURAS 7 e 8 e sintetizados nas TABELAS 2 e 3. A FIGURA 7 mostra os resultados obtidos a uma temperatura constante de 40°C, com extrações realizadas com pressões de 9, 12 e 20 MPa. Os resultados de rendimento total obtidos foram de 2,41, 2,97 e 3,38%, respectivamente, e permite observar que o uso de uma maior pressão resultou em um maior rendimento de extração. As extrações realizadas com propano (FIGURA 8) nas temperaturas de 20, 40 e 60 °C e pressões de 2, 6 e 10 MPa, resultaram em rendimentos que variam de 2,93 a 4,16%. Esta apresentou o mesmo comportamento em relação ao rendimento, com a elevação da temperatura e pressão, maior rendimento é observado.

Além disso, os resultados mostram que o aumento da pressão nos experimentos com scCO<sub>2</sub> puro e propano comprimido foram responsável pela redução do tempo de extração.

Dados cinéticos dos rendimentos de extração de citronela disponíveis na literatura a uma mesma temperatura de 40 °C e envolvendo o mesmo solvente (CO<sub>2</sub> supercrítico) confirmam que um aumento na pressão de 8,5 MPa para 12 MPa tem um efeito positivo na de taxa de extração (CARLSON et al., 2001).

TABELA 2 - CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO E PARÂMETROS CINÉTICOS AJUSTADOS ( $Y_e$  E  $k$ ) DA EXTRAÇÃO DE CITRONELA REALIZADA COM  $CO_2$  SUPERCRÍTICO

P (MPa)	T (°C)	$\rho$ (kg m <sup>-3</sup> )	$\mu \times 10^5$ (Pa s)	$\gamma m$ (kg kg <sup>-1</sup> )	$k \pm U_{k,95} \times 10^4$ (s <sup>-1</sup> )	$Y_e \pm U_{y,95}$ (%)
9	40	485,50	3,48	7,6	$4,1 \pm 0,5^a$	$2,35 \pm 0,08^a$
12	40	717,76	5,85	10,0	$4,6 \pm 0,7^{a,b}$	$3,0 \pm 0,1^b$
20	40	839,81	7,83	12,0	$5,1 \pm 0,8^b$	$3,5 \pm 0,1^c$

$k$  e  $Y_e$  seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste t para  $\alpha = 0,05$ .

$\rho$  = densidade do solvente,  $\mu$  = viscosidade do solvente,  $\gamma = 15 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$  m<sup>3</sup> de solvente usado por kg de material sólido,  $k$  = taxa de extração,  $y_e$  = rendimento de extração em equilíbrio.

TABELA 3 - CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO E PARÂMETROS CINÉTICOS AJUSTADOS ( $Y_e$  E  $k$ ) DA EXTRAÇÃO DE CITRONELA REALIZADA COM PROPANO COMPRIMIDO

P (MPa)	T (°C)	$\rho$ (kg m <sup>-3</sup> )	$\mu \times 10^5$ (Pa s)	$\gamma m$ (kg kg <sup>-1</sup> )	$k \pm U_{k,95} \times 10^4$ (s <sup>-1</sup> )	$Y_e \pm U_{y,95}$ (%)
2	20	503,31	10,46	6,5	$9 \pm 1$	$2,76 \pm 0,09$
2	60	428,05	6,57	4,1	$4,9 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,2$
6	40	484,39	9,24	6,9	$7,3 \pm 0,7$	$3,76 \pm 0,09$
10	20	521,29	11,88	7,3	$10 \pm 2$	$2,98 \pm 0,09$
10	60	467,16	8,33	7,5	$6 \pm 1$	$4,2 \pm 0,1$

$\rho$  = densidade do solvente,  $\mu$  = viscosidade do solvente,  $\gamma = 13 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$  m<sup>3</sup> de solvente usado por kg de material sólido.

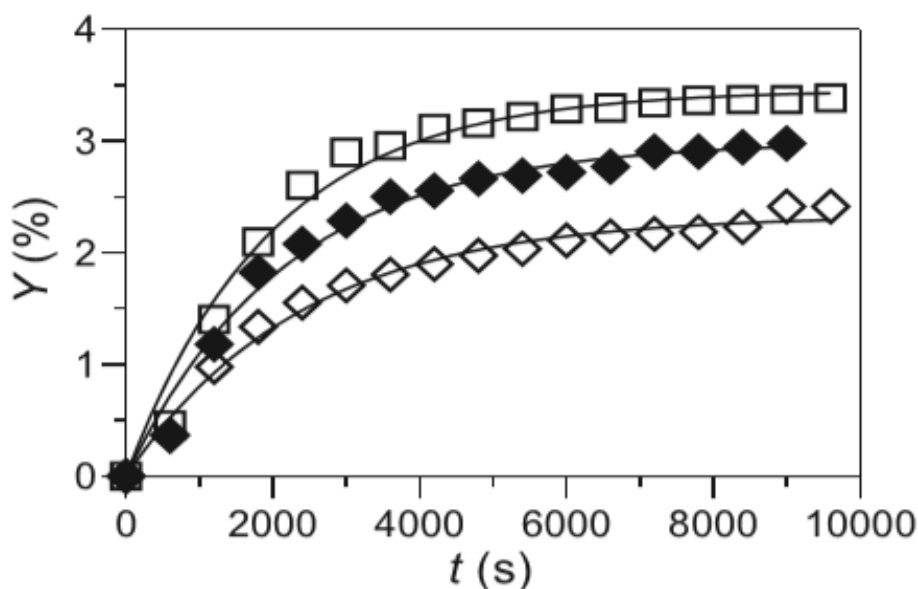
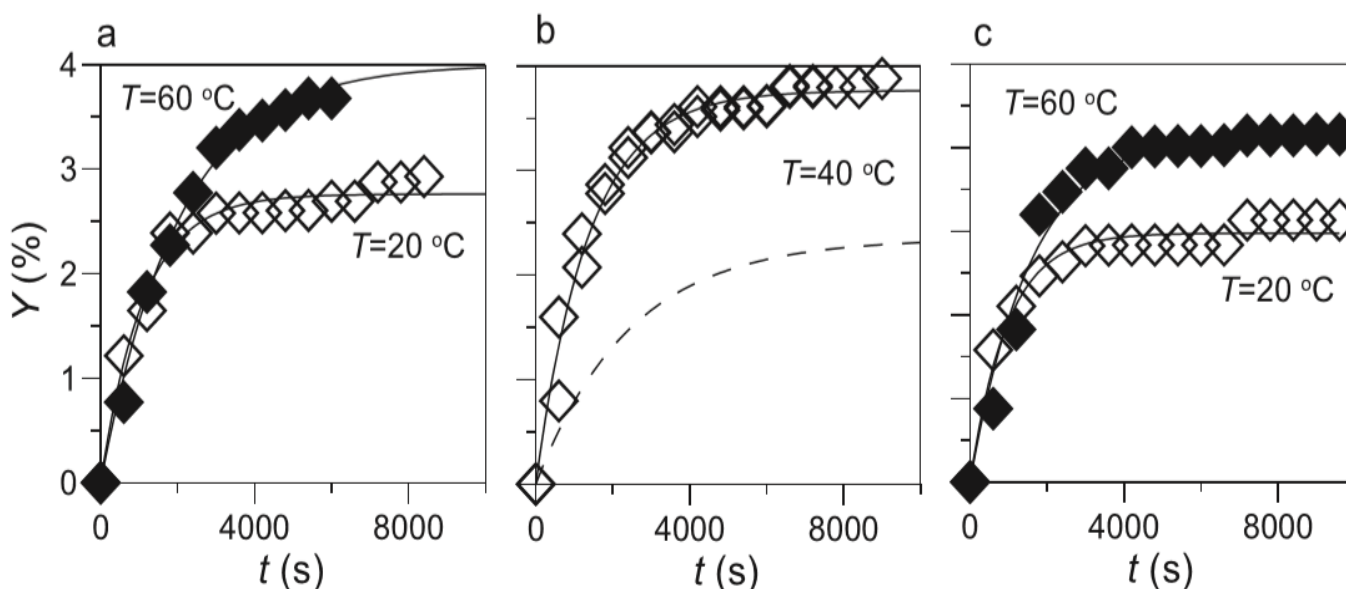
FIGURA 7 - CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DE CITRONELA COM  $CO_2$  SUPERCRÍTICO A UMA TEMPERATURA CONSTANTE DE 40 °C E TRÊS PRESSÕES DIFERENTES (DIAMANTES ABERTOS: 9 MPa; DIAMANTES COMPLETOS: 12 MPa; QUADRADOS: 20 MPa). SÍMBOLOS: RESULTADOS EXPERIMENTAIS; LINHAS SÓLIDAS REPRESENTAM O MODELO EMPÍRICO DE PRIMEIRA ORDEM. AS CONDIÇÕES OPERACIONAIS SÃO DEFINIDAS EM DETALHES NA TABELA 2

FIGURA 8 - CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DE CITRONELA COM PROPANO PRESSURIZADO A DIFERENTES TEMPERATURAS E PRESSÕES (a = 2 MPa; b = 6 MPa; c = 10 MPa). SÍMBOLOS REPRESENTAM OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS. LINHAS SÓLIDAS REPRESENTAM O MODELO EMPÍRICO DE PRIMEIRA ORDEM E A LINHA TRACEJADA O RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO CALCULADO USANDO  $scCO_2$  a 40 °C E 9 MPa PARA COMPARAÇÃO. AS CONDIÇÕES OPERACIONAIS SÃO DEFINIDAS EM DETALHES NA TABELA 3



Conforme relatado, o rendimento da extração próximo ao equilíbrio é fortemente sensível à temperatura. Sob a condição atual, e muitas outras circunstâncias análogas de extração (SANTOS et al., 2015; CORREA et al., 2016), o rendimento da remoção em equilíbrio é elevado pelo aumento da temperatura, embora o incremento do mesmo fator pode causar uma redução na densidade do solvente que afeta  $Y_e$  negativamente. Esse efeito vantajoso da temperatura no rendimento da extração geralmente é creditado ao aumento da pressão de vapor dos solutos com a temperatura.

Comparado à extração com  $scCO_2$  a uma mesma temperatura de 40 °C e pressão de 9 MPa, o propano comprimido é um solvente que oferece vantagens em termos de cinética de extração, bem como em termos de rendimento de remoção de solutos em equilíbrio. A FIGURA 8b pode confirmar essa afirmação através da comparação entre as linhas sólidas e tracejadas, o que é consistente com as observações anteriores para extração de solutos de diferentes sólidos com os mesmos solventes ( $CO_2$  supercrítico, propano comprimido) (ILLÉS et al., 2000; FREITAS, 2008).

Para examinar a influência de um co-solvente na extração de solutos de citronela, um conjunto de quatro experimentos foi realizado utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico + etanol e propano comprimido + etanol em duas proporções de massa diferentes entre o co-solvente e matéria-prima. Para todas as execuções experimentais, os resultados obtidos indicam que a extração é mais rápida e leva a maiores rendimentos em equilíbrio, devido ao uso de etanol (FIGURA 9). Os dados são descritos na TABELA 4.

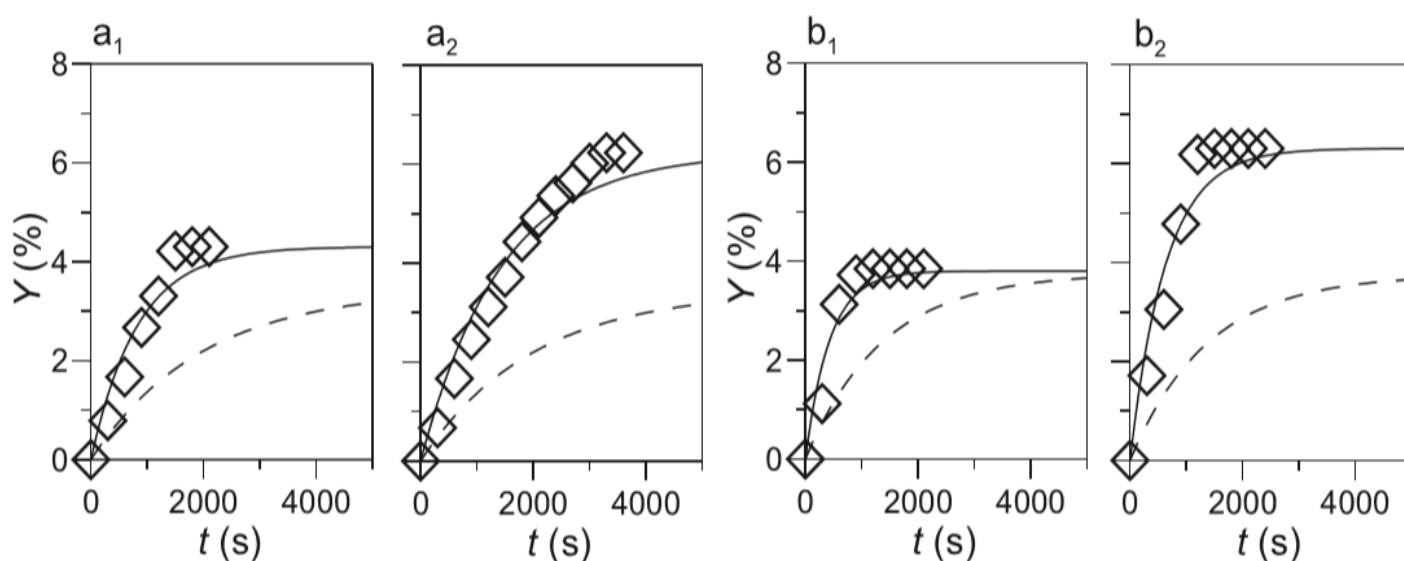
TABELA 4 - CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO E PARÂMETROS CINÉTICOS AJUSTADOS ( $Y_e$  E  $k$ ) DA EXTRAÇÃO REALIZADA COM ETANOL COMO CO-SOLVENTE COM  $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$

Solvente	$\beta_c$	P (MPa)	$\gamma_m$ (kg kg <sup>-1</sup> )	$k \pm U_{k,95} \times 10^4$ (s <sup>-1</sup> )	$Y_e$ (%)
CO <sub>2</sub>	1	20	3,8	$12 \pm 4^a$	4,3
CO <sub>2</sub>	2	20	6,5	$7 \pm 1^b$	6,2
Propano	1	6	3,8	$23 \pm 9^c$	3,8
Propano	2	6	4,9	$16 \pm 4^{a,c}$	6,3

$k$  foi o único parâmetro ajustado nesses casos; os seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste  $t$  para  $\alpha = 0,05$ .

$\beta_c$  = proporção de massa entre co-solvente e matéria-prima,  $\gamma = 7 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$  m<sup>3</sup> de solvente usado por kg de material sólido,  $k$  = taxa de extração,  $y_e$  = rendimento de extração em equilíbrio.

FIGURA 9 - a) RESULTADOS CINÉTICOS DA EXTRAÇÃO DE SOLUTOS DE CITRONELA USANDO scCO<sub>2</sub> COM ETANOL COMO CO-SOLVENTE A 40 °C E 20 MPa ( $a_1$  :  $\beta_c = 1$  e  $a_2$  :  $\beta_c = 2$ ). b) RESULTADOS CINÉTICOS DA EXTRAÇÃO DE SOLUTOS DE CITRONELA USANDO PROPANO COM ETANOL COMO CO-SOLVENTE A 40 °C E 6 MPa ( $b_1$  :  $\beta_c = 1$  e  $b_2$  :  $\beta_c = 2$ ). LINHAS SÓLIDAS REPRESENTAM OS VALORES CALCULADOS PELA EQUAÇÃO (4) PARA EXTRAÇÃO COM ETANOL E A LINHA TRACEJADA A EXTRAÇÃO SEM ETANOL (PARA COMPARAÇÃO). AS CONDIÇÕES OPERACIONAIS FORAM DEFINIDAS NAS TABELAS 2, 3 E 4



Em particular, a melhor condição de extração em termos das respostas examinadas, foi definida por CP + EtOH a 40°C e 6 MPa a uma proporção de matéria-



prima e solvente de 1:2. Um aumento de aproximadamente 120% e 67% na constante de taxa de extração e no rendimento de extração em equilíbrio, respectivamente, foram observados por causa do uso de etanol. De um modo geral, esses resultados melhores se devem à extração de uma fração de solutos que apresentam uma natureza não polar que os tornam solúveis em um solvente não polar como propano ou CO<sub>2</sub> (“um solvente fraco na extração de compostos com alta polaridade”) (ZULKAFI et al., 2014), mais uma porção de compostos polares solúveis em etanol. De fato, é um método eficiente para melhorar o rendimento de extração que é frequentemente relatado na literatura para diferentes sistemas sólido-líquido (ZULKAFI et al., 2014; CASAS et al., 2007).

Extrações Soxhlet foram realizadas utilizando hexano e etanol como solventes (TABELA 5), e confirmam uma clara associação entre a polaridade do solvente e o rendimento de remoção de solutos perto do equilíbrio. Esses resultados também evidenciam que a citronela é rica em compostos polares.

TABELA 5 - RENDIMENTO DE EXTRAÇÕES SOXHLET REALIZADA COM SOLVENTES DE DIFERENTES POLARIDADES, DURANTE 6 HORAS DE EXTRAÇÃO

Solvente	T (°C)*	Polaridade	Rendimento (%)
Hexano	68,0	0,0	6,90 ± 0,2
Etanol	78,5	5,2	13,62 ± 1,19

\* Ponto de ebulição dos solventes.

Os rendimentos obtidos no extrator Soxhlet a 68 - 78 °C foram superiores aos obtidos utilizando-se extrator de leito fixo em temperatura menor que 60 °C, independente do solvente e pressão, o que reforça a importância da alta temperatura de extração como estratégia para melhorar o rendimento da extração em equilíbrio. No entanto, pelo menos parcialmente, a razão para esses rendimentos melhores pode estar relacionada à maior razão entre o volume de solvente e a massa do sólido bruto no extrator Soxhlet, quando comparados àqueles no leito fixo.

Para identificar a condição de extração que maximiza o conteúdo fenólico total no extrato, os fenóis totais expressos como mg por g equivalentes de ácido gálico foram plotados para todas as execuções experimentais de extração (TABELA 6). Como pode ser observado, o conteúdo fenólico total não variou consideravelmente com o método de extração, solvente, temperatura e pressão. Apenas no caso da hidrodestilação à pressão atmosférica, o teor de compostos fenólicos no óleo

essencial obtido foi nitidamente superior ao dos demais extratos, indicando que a maioria dos fenóis presentes na folha da citronela possuem alta pressão de vapor.

TABELA 6 - CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS PARA OS EXTRATOS FINAIS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÕES REALIZADAS

Extração	Pressão (MPa)	T (°C)	Fenólicos (mg EAG/g)
scCO <sub>2</sub>	9	40	0,027 ± 0,01
scCO <sub>2</sub>	12	40	0,242 ± 0,05
scCO <sub>2</sub>	20	40	0,290 ± 0,07
CP	2	20	0,329 ± 0,11
CP	2	60	0,718 ± 0,04
CP	6	40	0,502 ± 0,01
CP	10	20	0,420 ± 0,11
CP	10	60	0,222 ± 0,04
scCO <sub>2</sub> + EtOH – (1:1)	20	40	0,743 ± 0,10
scCO <sub>2</sub> + EtOH – (1:2)	20	40	0,331 ± 0,04
CP + EtOH – (1:1)	6	40	0,245 ± 0,03
CP + EtOH – (1:2)	6	40	0,571 ± 0,07
Soxhlet etanol	-	78*	0,070 ± 0,01
Soxhlet hexano	-	68*	0,136 ± 0,01
Hidrodestilação	-	100	1,38 ± 0,39

\* Ponto de ebulição dos solventes à pressão atmosférica.

Por fim, com o objetivo de avaliar a influência das variáveis de processo (temperatura, pressão e proporção entre massa de amostra e massa de solvente) sobre a composição dos extratos de citronela, foram realizadas análises de GC-MS para todas as condições testadas e os resultados estão apresentados em formato de tabela no ANEXO 1.

Os principais compostos em proporções maiores de área relativa identificados em todos os extratos foram o citronelal, citronelol, elemol, geraniol, germacreno D-4-ol e ácido agatólico. De modo geral, as condições de processo das amostras 1, 3 e 4 não mostraram capacidade eficiente extrativa para os compostos citronelal, citronelol, elemol, germacreno D-4-ol e ácido agatolico frente aos demais parâmetros de extração.

As condições de extrações (temperatura, pressão e tempo) e a técnica extrativa influenciam na composição e quantidade de compostos presentes nas diferentes amostras. Resultados semelhantes foram encontrados nas pesquisas de Clain et al., (2018) e Silva et al., (2011) que trabalharam com a citronela e identificaram os mesmos compostos (citronelal, citronelol, elemol, geraniol, germacreno D-4-ol) como também mostrado no atual estudo. No entanto, nas condições operacionais usadas neste trabalho, foi possível obter maiores quantidades do composto elemol.

Elemol é um ingrediente utilizado em fragrâncias finas, cosméticos decorativos, shampoos, sabonetes e outros produtos de higiene pessoal, produtos de limpeza doméstica e detergentes. O uso mundial do elemol está na faixa de 1 a 10 toneladas métricas por ano (BHATIA; LETIZIA; API, 2008).

Os compostos citronelal e geraniol atuam na defesa química das plantas contra a ação de invasores externos. Os vapores sintetizados a partir do componente citronelal, podem causar irritação em um predador levando a desistir do ataque. O geraniol possui atividade antiséptica, podendo causar a inibição do crescimento de fungos e bactérias (MANN, 1995; SIMÕES et al., 2004). A amostra 13 extraída em Soxhlet com etanol mostrou maior capacidade extrativa do composto citronelal (39,441%) e depois pela amostra 7 (12,742%), extraída apenas com propano pressurizado na condição de 60 °C e 10 Mpa. No caso do geraniol, a melhor condição operacional de obtenção foi na extração utilizando scCO<sub>2</sub> com etanol na proporção de 1:1 (EtOH:matéria-prima) em 40 °C e 20 MPa (amostra 15) e na extração utilizando propano comprimido a 60 °C e 2 MPa (amostra 6).

Embora o processo de obtenção através do Soxhlet com etanol da amostra 13 tenha eficiência extrativa ao composto citronelal, aos demais componentes não apresentou a mesma eficiência, mostrando a ausência deles. Acredita-se que a temperatura empregada nesse tipo de técnica extrativa tenha sido responsável pela degradação dos compostos presentes nesta amostra.

De forma geral, os parâmetros de extração estudados nas diferentes amostras (1-15) mostraram capacidade extrativa de uma grande quantidade de compostos importantes presentes na citronela, possibilitando possíveis futuras aplicações industriais.

## 2.4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, CO<sub>2</sub> supercrítico, propano comprimido (CP) e misturas de scCO<sub>2</sub> + EtOH e CP + EtOH foram utilizados como solventes para obtenção de extratos de folhas de citronela. Foi identificado que a adição de etanol como co-solvente aumentou significativamente a eficiência de extração.

Pressões mais altas aumentaram significativamente o rendimento da extração em equilíbrio, usando CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente, devido ao aumento da densidade e do poder de solvência. Embora uma viscosidade mais alta limita a convecção, o aumento na pressão induz a extração de solutos, pois aumentando este parâmetro operacional o transporte de solvente (solvente comprimido + etanol) para os poros da matriz sólida é facilitado. O propano comprimido apresentou maior rendimento de equilíbrio e constante cinética do que o CO<sub>2</sub> supercrítico em condições similares (40 °C e 6 MPa, 40 °C e 9 MPa). Apesar disso, CO<sub>2</sub> supercrítico é um solvente não-tóxico e uma alternativa aplicável para indústria, em termos de temperatura e pressão críticas. A adição de etanol aos solventes aumentou o rendimento porque o co-solvente interage com a fração polar dos solutos de citronela. É importante referir que os melhores resultados foram obtidos para os ensaios utilizando solvente propano comprimido a 60 °C e 2 MPa e CO<sub>2</sub> supercrítico com etanol com uma proporção de massa em gramas entre o etanol e a massa de matéria-prima (1:1).

Em geral, o teor total de fenólicos não variou significativamente quando comparados diferentes solventes, temperaturas e pressões. A hidrodestilação é o único método de extração que apresentou um conteúdo significativamente maior (1,4 ± 0,4 mg EAG/g).

O rendimento de equilíbrio de Soxhlet aumentou significativamente com a temperatura e o valor para o etanol é duas vezes maior que para o hexano, confirmando a influência da polaridade e indicando que a citronela é rica em compostos polares. Embora o método extraia mais óleo do que o sistema de leito fixo, promove a degradação térmica de compostos sensíveis à temperatura e pode ser ambientalmente e economicamente caro devido ao uso de mais solvente. Portanto, de fato, a extração supercrítica pode ser considerada como extração alternativa a com solventes orgânicos.

### **CAPÍTULO 3: EXTRAÇÃO DE *SYNADENIUM GRANTII* HOOK. F. USANDO SOLVENTES CONVENCIONAIS E CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO + ETANOL: AVALIAÇÃO DA CINÉTICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E COMPOSTOS FENÓLICOS**

No presente capítulo, extratos de *Synadenium grantii* foram obtidos a partir de duas técnicas diferentes de extração: pelo CO<sub>2</sub> supercrítico, com a adição do etanol a esse solvente, e extração por Soxhlet com diferentes solventes. A eficiência de extração foi avaliada pelo rendimento de extração, atividade antioxidante e composição dos extratos. Os resultados mostraram que o rendimento da extração aumenta com a polaridade do solvente. O maior rendimento de extração foi obtido com água e o menor rendimento com hexano para extração de Soxhlet. Em relação à extração supercrítica de CO<sub>2</sub>, a adição do etanol aumentou o rendimento de extração e os parâmetros cinéticos devido ao aumento da polaridade do solvente. Os resultados demonstrados pela metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>) dos extratos obtidos com solventes polares foi menor, mostrando sua maior atividade antioxidante. Para a extração supercrítica, o IC<sub>50</sub> mais baixo foi obtido para a razão entre o etanol e a massa supercrítica de CO<sub>2</sub> de 1:1. Os compostos mais importantes identificados nos extratos de *S. grantii* por espectrometria de massas foram euphol, carvacrol, betuíno aldeído e friedelan-3-ona, que apresentam grande potencial para aplicações industriais como cosméticos, farmacêuticos e alimentícios.

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

O *Synadenium grantii* é uma planta arbustiva nativa da África que pertence à classe das Euphorbiaceae (SPOERKE; MONTANIO; RUMACK, 1985). Os extratos obtidos da planta apresentam vários benefícios para a saúde, tais como antitumoral (DE OLIVEIRA et al., 2013; CAMPOS et al., 2016), anti-ulcerativa (COSTA et al., 2012), antinociceptiva (DA ROCHA et al., 2019), antiparásitica (HASSAN; MOHAMMED, MOHAMED, 2012) e atividade moluscicida (HARTMANN et al., 2011). No entanto, o látex puro é um irritante da pele (SPOERKE; MONTANIO, RUMACK, 1985; KINGHORN, 1980; DOCAMPO et al., 2010) e pode ser tóxico, dependendo da dosagem (COSTA et al., 2012). Portanto, para o consumo, o látex é geralmente diluído em água. Popularmente, esse látex é preparado com a adição de dezoito gotas de

látex a 1 litro de água, armazenamento em geladeira e consumido 3 vezes ao dia (DE OLIVEIRA et al., 2013).

As principais substâncias bioativas do látex de *S. grantii* são os triterpenóides, compostos fenólicos (taninos hidrolisáveis e condensados, cumarinas e antraquinonas) e substâncias insaponificáveis. A presença de antocianinas com açúcar de furanose incomum (apiose) também foi relatada nas folhas (ANDERSEN et al., 2010). Além disso, o látex contém proteínas com atividade fibrino(geno)lítica (RAJESH et al., 2006), atividade proteolítica (MENON et al., 2002) e lectinas (DURGAWALE et al., 2001).

Apesar do látex ser popularmente consumido misturado com água, os principais compostos bioativos são não-polares. A extração de *S. grantii* foi estudada usando vários solventes como etanol (HARTMANN et al., 2011; MUNHOZ et al., 2014), acetona, metanol (CAMPOS et al., 2016), éter de petróleo, diclorometano e acetato de etila (DAWIDAR et al., 2011). Andersen et al. (2010) observaram uma composição diferente dependendo do solvente usado para a extração do látex, os extratos de diclorometano contêm constituintes cerosos (cetinas de cadeia longa) e os extratos de acetona contêm triterpenóides. Assim, o procedimento de extração de *Synadenium grantii* resulta em potencial bioativo distinto. Campos et al. (2016) mostraram que os extratos obtidos da acetona demonstram maior inibição de células cancerígenas do que extratos brutos de metanol.

O látex de *S. grantii* diluído em água pode ser facilmente preparado e consumido em casa, no entanto, para a indústria, a extração de substâncias bioativas da planta inteira pode ser mais vantajosa devido ao maior rendimento. A extração convencional de substâncias bioativas é comumente realizada usando solventes como etanol, metanol e acetona. No entanto, essa técnica demanda outras etapas de processo para a separação e recuperação do solvente, gerando um grande volume de resíduos, tornando-se cara e potencialmente prejudicial ao meio ambiente. Assim, o uso de solventes alternativos, como fluidos supercríticos, pode ser promissor por superar algumas desvantagens inerentes aos métodos convencionais. O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é um fluido muito utilizado por ser mais vantajoso na extração de substâncias bioativas, já que as extrações podem ser realizadas em temperaturas amenas. Também é um solvente inerte, e por ser um subproduto presente na atmosfera, é amplamente disponível e considerado benigno (OLIVEIRA; SILVESTRE; SILVA, 2011).

Até onde é conhecido, não há relatos na literatura sobre a extração de *S. grantii* usando fluidos supercríticos ou solventes comprimidos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos extratos de *S. grantii* obtidos a partir do uso de CO<sub>2</sub> supercrítico a diferentes temperaturas e pressões e, comparar com as extrações de CO<sub>2</sub> supercrítico + etanol, além daqueles extraídos pelo método de Soxhlet. A eficiência de extração foi avaliada em termos de rendimento, atividade antioxidante e composição química desses extratos.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada no presente estudo consistiu de folhas e caules de *S. grantii* que foram colhidas em uma plantação localizada em Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, no Brasil. A exsicata da planta foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob número de registro CGMS 66160.

Após a colheita, a amostra foi seca em estufa de circulação de ar a  $40 \pm 2$  °C por cerca de 24 h até que atingisse peso constante. Então, foram moídas em um processador de alimentos doméstico e separada granulometricamente com a ajuda de peneiras da série Tyler (com Mesh 12, 20, 24, 32 e 48) acopladas a um agitador mecânico (Produtest, Estado de São Paulo, Brasil).

Após essa separação, as amostras foram devidamente embaladas a vácuo e armazenadas em congelador a -18 °C para utilização nas extrações subsequentes. As amostras pertencem a um único lote colhido no mês de novembro em 2017.

### 3.2.2 Reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes utilizados nesse trabalho são de grau analítico e foram utilizados sem purificação adicional. Um deles é o dióxido de carbono (> 99% de pureza na fase líquida) da White Martins (Curitiba, Brasil). Os outros mais utilizados como etanol (99,8% de pureza), reagente de Folin-Ciocalteu fenol (2N), DPPH (99,9% de pureza) e ácido gálico (99,9% de pureza) foram obtidos da Sigma – Aldrich.

### 3.2.3 Extração Soxhlet

A extração com o Soxhlet (Nova Ética, Brasil) foi realizada de acordo com o método da AOAC (1999), e esses resultados foram referência para comparação com os outros obtidos na extração por meio de fluido supercrítico. Os solventes utilizados foram etanol, hexano, água, éter de petróleo, acetona, acetato de etila e metanol. O conteúdo extraível de cerca de 2,5 g de matéria-prima em diferentes solventes (200 mL) foi determinado em triplicata no ponto de ebulição do solvente à pressão atmosférica, seguido de remoção do solvente a 40 °C por rotaevaporação. O rendimento de extração foi calculado como a massa do extrato obtido após remoção do solvente dividido pela massa do material seco.

### 3.2.4 Extração por fluido supercrítico

O aparato experimental e o procedimento foram utilizados conforme apresentados anteriormente (GUEDES et al., 2018; DE SOUZA et al., 2018; DE SOUZA et al., 2008). Resumidamente, o equipamento consiste em uma unidade de extração supercrítica em escala de bancada ( $8,0 \times 10^{-5} \text{ m}^3$  de volume interno,  $L = 0,16 \text{ m}$ ,  $\Phi = 2,52 \times 10^{-2} \text{ m}$ ). Em outras palavras, o sistema consiste em um recipiente encamisado (extrator), com um banho ultra-termostatizado para ajuste de temperatura, uma válvula agulha para controlar o fluxo dentro do extrator, uma bomba tipo seringa (ISCO, modelo 500D) para estabelecer a pressão do fluido, sensores de pressão e temperatura e transdutores. Para as extrações de alta pressão,  $\text{CO}_2$  puro e  $\text{CO}_2$  com etanol foram usados como solventes. Para determinar a influência de dois fatores principais, temperatura e pressão, foi utilizado um delineamento experimental de  $2^2$  com triplicata no ponto central, variando a temperatura e a pressão de 40 a 80 °C e de 15 a 25 MPa.

O extrator foi carregado com aproximadamente 20 g de amostra em todas as análises, formando um leito fixo. Uma vez que a pressão e a temperatura da análise foram definidas e atingidas no equipamento, o fluido é inserido e um tempo de confinamento (período estático de extração) dessa amostra dentro do vaso de extração começa a contar. Esse período foi previamente definido em 60 minutos. No



final do período estático, a extração dinâmica foi iniciada usando uma taxa de fluxo de CO<sub>2</sub> comprimido de cerca de 2 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> (controlada e medida pela bomba tipo seringa a 10 °C), onde temperatura e pressão eram controlados por todo período. O período de extração dinâmica foi determinado pela cessação do extrato, ou seja, quando não há mais extrato visível e não há mais variação no peso do tubo de vidro. Como consequência, cada extração pode variar o tempo total.

De modo a avaliar a influência de etanol sobre os rendimentos e na recuperação de componentes bioativos, foram realizadas extrações utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico e etanol como solvente (scCO<sub>2</sub> + EtOH). A temperatura e pressão utilizadas nestes experimentos foram de 60 °C e 20 MPa, referentes ao ponto central do delineamento experimental. Diferentes proporções iniciais de massa de etanol por massa de amostra foram utilizadas, sendo 0,5: 1,0, 1,0: 1,0 e 1,5: 1,0, ou seja, aproximadamente 10:20 g, 20:20 g e 30:20 g de etanol por matéria-prima, respectivamente. Para essa extração, o procedimento de inclusão de amostras é diferente. O etanol na razão de massa especificada foi primeiramente adicionado à matéria-prima antes de ser introduzido no recipiente. Após, a mistura foi carregada no extrator e este foi preenchido com cerca de 60mL de CO<sub>2</sub>. Com o extrator preenchido com a amostra/etanol e CO<sub>2</sub> na pressão e temperatura desejadas, é definido um tempo de extração estático (período de confinamento), que neste trabalho foi fixado em 60 minutos. No final do período estático, o procedimento é exatamente o mesmo que o descrito acima com scCO<sub>2</sub> puro. O rendimento da extração foi calculado como a massa do extrato obtida após a evaporação do etanol (em gramas) dividida pela massa do material seco (em gramas) fornecido ao extrator.

As curvas de extração globais, em termos de cinética de extração, foram modeladas usando um modelo empírico de primeira ordem Equação (4) onde os parâmetros do modelo foram ajustados usando as curvas de extração experimentais usando o software Origin 8.0.

$$Y = Y_e [1 - e^{(-kt)}] \quad (4)$$

Os parâmetros do modelo cinético  $Y_e$  e  $k$  estão relacionados com o rendimento de recuperação de solutos em condições de equilíbrio e resistências de transporte de massa, respectivamente (GUEDES et al., 2018; DE SOUZA et al., 2018).

### 3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Para a determinação da eliminação de radicais livres presentes no extrato de *Synadenium grantii*, foi utilizado o método descrito por Mensor et al. (2001). Resumidamente, 2,5 mL dos extratos diluídos em etanol em diferentes concentrações (45 - 3350 µg mL<sup>-1</sup>) foram misturados com 1 mL de DPPH (0,3 mM). As amostras foram bem misturadas e deixadas em repouso à temperatura ambiente, protegidas da luz durante 30 minutos. Após, a absorbância das amostras ( $abs_{amostra}$ ) foi medida em 518 nm usando um espectrofotômetro (Bel Photonics, 2000 UV). As determinações de controle foram realizadas com 1 mL de etanol misturado com 2,5 mL de extrato ( $abs_{branco}$ ) e 1 mL de solução de DPPH misturada com 2,5 mL de etanol ( $abs_{controle}$ ). Os resultados foram obtidos em triplicata e a atividade antioxidante (AA) foi calculada a partir da Equação (5).

$$AA(\%) = \left\{ \frac{abs_{controle}(abs_{amostra} - abs_{branco})}{abs_{controle}} \right\} \times 100 \quad (5)$$

A concentração de extratos vegetais e o percentual médio de atividade antioxidante foram plotados e a concentração inibitória semi-máxima (IC<sub>50</sub>) foi calculada por regressão linear. O IC<sub>50</sub> foi definido como a concentração (µg mL<sup>-1</sup>) de extrato necessária para inibir a produção de radicais em 50%.

### 3.2.6 Análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS)

Para a identificação do perfil químico dos extratos de *S. grantii*, as amostras foram diluídas em diclorometano de grau espectroscópico (pureza de 99,9%, Sigma-Aldrich) na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>, analisada por GC-MS (Shimadzu TQ8040). Foi utilizada uma coluna capilar não polar HP-5MS (30 m x 0,25 mm id, espessura de 0,25 µm, 5% fenil / 95% dimetilpolisiloxano). O gás de arraste utilizado foi o hélio com um volume de injeção de 1,0 µL. As temperaturas de fonte e quadrupolo foram 230 °C e 150 °C, respectivamente. O espectrômetro de massa foi programado para varrer de 40,0 a 1000,0 m / z. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C e mantida por 1 min. Assim, a temperatura aumentou a uma taxa de 50 °C min<sup>-1</sup> até 200 °C e mantida por

1 min. Os compostos presentes nos extratos foram identificados com base no banco de dados da biblioteca NIST-14, comparando seus índices de retenção (IR), a uma série homóloga de n-alcanos (C8-C40), e através de comparação com dados MS apresentados na literatura.

### 3.2.7 Análises estatísticas

Os resultados obtidos em triplicata neste estudo foram analisados estatisticamente utilizando o software Statistica 7.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EUA), e cada resposta foi avaliada de forma independente. Os dados experimentais foram analisados para a variância (ANOVA), e o teste de Tukey foi usado para comparar a significância das amostras a um nível de confiança de 95% (valor de  $p < 0,05$ ).

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Efeito da polaridade do solvente no rendimento da extração de Soxhlet

A TABELA 7 mostra os rendimentos de extração obtidos por diferentes solventes usando a extração de Soxhlet. Foi observado o aumento nos rendimentos de extração com o aumento da polaridade do solvente. O menor rendimento foi obtido quando se utilizou hexano, que é um solvente não polar e o maior rendimento foi obtido com água, que é o solvente mais polar.

TABELA 7 - EFEITO DA POLARIDADE DO SOLVENTE NO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE SOXHLET POR 6 HORAS DE *S. GRANTII*

Solventes	Polaridade	Rendimento (%)
Hexano	0,0	3,82±0,17 <sup>a</sup>
Éter de Petróleo	0,1	4,60±0,09 <sup>a</sup>
Acetato de Etila	4,3	6,36±0,27 <sup>ab</sup>
Acetona	5,4	7,20±0,58 <sup>ab</sup>
Etanol	5,2	10,97±0,53 <sup>bc</sup>
Metanol	6,6	15,78±0,81 <sup>c</sup>
Água	10,2	23,23±8,23 <sup>d</sup>

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem na coluna a um nível de confiança de 95%, de acordo com o teste de Tukey.

O látex de *S. grantii* é a principal fonte de compostos bioativos da planta e consiste em uma emulsão complexa que tem a função de impedir a entrada de fungos e bactérias em caso de lesões e ressecamento (MOHAMED et al., 2011). Os metabólitos secundários do látex são alcalóides, cardenólidos, terpenóides (incluindo borracha), compostos fenólicos e proteínas (proteases, inibidores de proteases, lectinas, quitinases e oxidases) (AGRAWAL; KONNO, 2009). Substâncias provavelmente extraídas por solventes polares podem ser proteínas como lectinas e proteases e compostos fenólicos, além disso, as substâncias emulsionadas também podem ser extraídas pela água, por exemplo. Os solventes não polares provavelmente extraíam terpenos e alcalóides. No entanto, apesar de os menores rendimentos de extração obtidos serem com solventes menos polares, os compostos anticâncer são compostos principalmente por substâncias não polares, como o euphol triterpênico e o citrostadienol (ANDERSEN et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2013; CAMPOS et al., 2016).

Andersen et al., (2010) separaram diferentes frações do látex de *Synadenium grantii* utilizando acetona como solvente mais polar, uma fração foi separada em saponificável e insaponificável, e utilizando-se diclorometano, foram separadas frações em "borracha" e "ceras". Segundo esses autores, os constituintes insaponificáveis que podem ser obtidos pela acetona são predominantes no látex das espécies de Euphorbiaceae. As substâncias insaponificáveis são compostas por alcanos, cetonas triterpênicas e triterpenóis e as substâncias saponificáveis são ácidos graxos, ácidos aromáticos e fenilacéticos e ionol. A fração "cera" da *S. grantii* é composta de cetonas de cadeia longa e a "borracha" de cis-1,4-poliisopreno.

Nesse estudo, as extrações com Soxhlet utilizando água como solvente resultou no maior rendimento, entretanto a temperatura de ebulição elevada pode resultar na degradação de alguns compostos bioativos, como polifenóis (BAHRIN et al., 2018) e na desnaturação de proteínas (MENON et al., 2002). Os polifenóis relacionam-se à atividade antioxidante (MOHAMED et al., 2011) e as proteases desempenham um papel importante em muitos processos regulatórios (MENON et al., 2002). Além do efeito negativo do aquecimento na extração de Soxhlet, alguns solventes convencionais, como a acetona, podem diminuir a atividade das enzimas de *Synadenium grantii* (DURGAWALE et al., 2001). Assim, para a preservação de compostos bioativos e atividade proteica dos extratos, o uso do CO<sub>2</sub> supercrítico surge como uma alternativa vantajosa. Os resultados da extração de Soxhlet mostram que

o etanol pode ser usado como solvente para auxiliar na extração supercrítica com CO<sub>2</sub>, já que este tem uma menor toxicidade e resultou em um bom rendimento de extração ( $10,97 \pm 0,53$  %) comparado ao metanol ( $15,78 \pm 0,81$  %). Apesar da água apresentar maior rendimento de extração e não ser tóxica, para a extração supercrítica com CO<sub>2</sub> seu uso como aliada no solvente pode não ser vantajoso, pois pode diminuir o coeficiente de dispersão do fluido devido ao aumento da pressão relacionada à baixa solubilidade mútua, densidade e viscosidade do solvente (SOLANA et al., 2014).

Os resultados obtidos por Soxhlet mostram que o rendimento de extração varia dependendo da polaridade do solvente, resultando em mudanças na composição do extrato. A *S. grantii* é composta por uma ampla gama de substâncias tanto polares como não polares, assim, para a extração convencional, os compostos alvos podem ser obtidos com base na polaridade de seus constituintes. Pode-se destacar que, como o látex é uma emulsão, a água apresenta maior rendimento, uma vez que substâncias polares e não polares podem ser extraídas.

### 3.3.2 Efeito da temperatura e pressão na extração de *S. grantii* usando CO<sub>2</sub> supercrítico

A FIGURA 10 mostra o efeito da temperatura e pressão no rendimento de extração da *S. grantii*. Tanto a temperatura (40 a 80 °C) quanto a pressão (15 a 25 MPa) não influenciaram significativamente os rendimentos de extração e a cinética de extração, com exceção da extração a 80 °C e 15 MPa, que resultou em um menor rendimento.

A TABELA 8 apresenta o rendimento e os parâmetros do modelo cinético  $Y_e$  e  $k$  da extração realizada com CO<sub>2</sub> supercrítico a diferentes temperaturas e pressões. Quase todas as amostras apresentaram parâmetros cinéticos semelhantes. A extração realizada a 80 °C e 15 MPa resultou em um baixo rendimento quando comparada com as demais amostras do delineamento experimental e conseqüentemente um baixo  $Y_e$  que está relacionado ao rendimento no equilíbrio e um maior valor de  $k$  que está relacionado ao tempo da extração. Isso se deve à baixa densidade do CO<sub>2</sub> nessa condição experimental que dificulta o poder de solvência do fluido supercrítico (GUEDES et al., 2018; DE SOUZA et al., 2018).

FIGURA 10 - CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO DA *S. GRANTII* COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO (scCO<sub>2</sub>) NA TEMPERATURA VARIANDO DE 40 °C A 80 °C E PRESSÃO VARIANDO DE 15 A 25 MPa

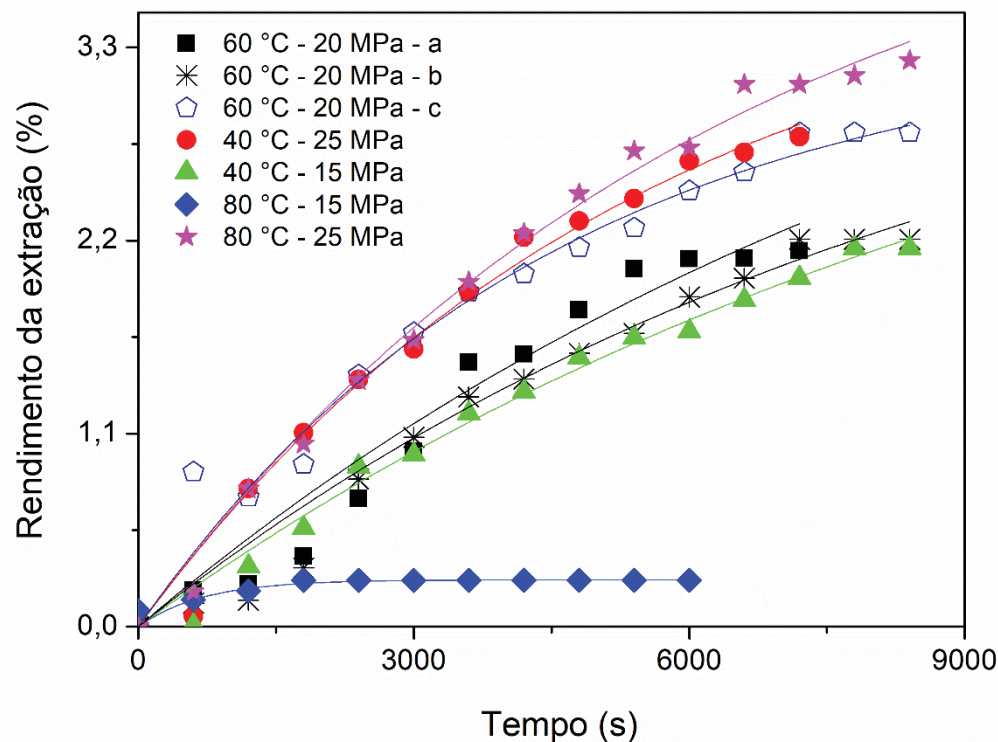


TABELA 8 - RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PARÂMETROS CINÉTICOS ( $Y_e$  E  $k$ ) DA EXTRAÇÃO DE *S. GRANTII* REALIZADA COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO

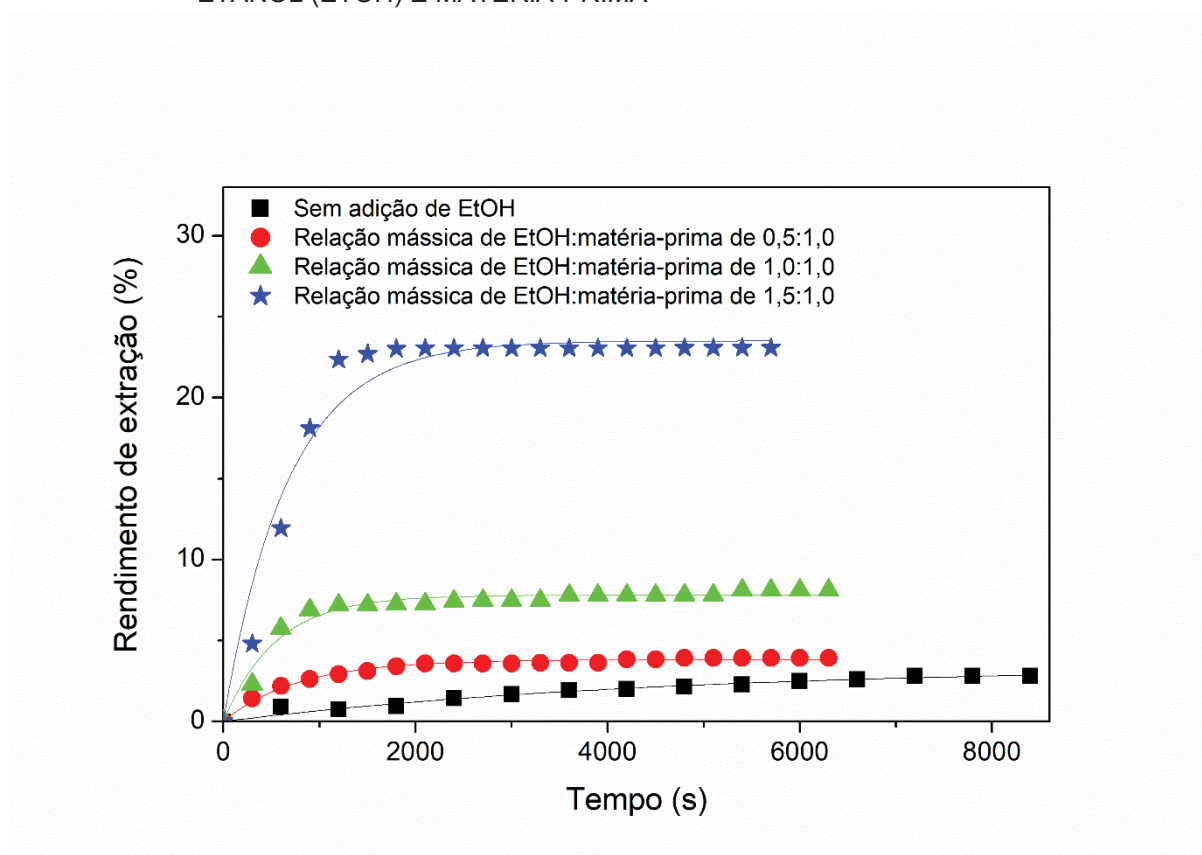
Temperatura (°C)	Pressão (MPa)	Densidade CO <sub>2</sub> (kg m <sup>-3</sup> )	Rendimento (%)	$Y_e$ (%)	$k \times 10^4$ (s <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
60	20	723,68	2,14	4,51±1,60	0,99±0,46	0,96787
60	20	723,68	2,21	3,38±0,25	2,22±0,32	0,99275
60	20	723,68	2,81	3,83±0,40	1,10±0,16	0,99275
40	25	879,49	2,96	3,93±0,39	1,81±0,23	0,98716
40	15	780,23	2,16	4,03±0,63	0,95±0,20	0,98785
80	25	686,22	2,16	4,57±0,30	1,56±0,16	0,99241
80	15	427,15	0,26	0,27±0,01	14,00±3,73	0,71446

Em geral, a extração de *S. grantii* usando CO<sub>2</sub> supercrítico resultou em um baixo rendimento, provavelmente devido à baixa polaridade do solvente. Este resultado está de acordo com os obtidos pela extração com Soxhlet que mostrou o menor rendimento para o solvente menos polar. Assim, o uso do etanol como co-solvente foi utilizado afim de se verificar o aumento da eficiência de extração.

### 3.3.3 Extração usando CO<sub>2</sub> supercrítico e etanol (scCO<sub>2</sub> + EtOH)

As extrações utilizando o CO<sub>2</sub> supercrítico foram realizadas a 60 °C e 20 Mpa, que são valores do ponto central do planejamento. O etanol foi utilizado em diferentes proporções de massa de etanol (EtOH) para massa de matéria-prima, a fim de avaliar o efeito desse no rendimento de extração. Os resultados são apresentados na FIGURA 11.

FIGURA 11 - CURVAS DE EXTRAÇÃO GLOBAL DA *S. GRANTII* EM DIFERENTES RELAÇÕES ETANOL (EtOH) E MATÉRIA-PRIMA



A extração de *S. grantii* com scCO<sub>2</sub> resultou em menor rendimento ao longo do tempo, similar aos obtidos pela extração Soxhlet utilizando hexano. O dióxido de carbono apresenta uma baixa polaridade e é ideal para a extração de substâncias lipídicas, gordurosas e não polares, mas é menos eficiente para a maioria dos fármacos e amostras de fármacos (AZMIR et al., 2013). Assim, um solvente adicional com maior polaridade pode ser adicionado para aumentar o rendimento de extração. No presente trabalho foi utilizado o etanol. Como esperado, o uso do etanol aumentou o rendimento de extração e diminuiu o tempo de extração. Além do aumento na polaridade do solvente, o etanol pode aumentar a área da superfície de extração na

matriz sólida devido à expansão do material e maior miscibilidade do gás (JESSOP; SUBRAMANIAM, 2007; DE SOUZA et al., 2018) resultando na maior eficiência da extração.

A TABELA 9 mostra o rendimento e os parâmetros do modelo cinético  $Y_e$  e  $k$  da extração realizada com CO<sub>2</sub> supercrítico e etanol. Observou-se um aumento no rendimento de extração e, como pode ser observado, os parâmetros  $Y_e$  e  $k$  aumentaram com o acréscimo da concentração de etanol. Tais parâmetros estão relacionados ao rendimento de recuperação de solutos em condições de equilíbrio e resistências de transporte de massa, respectivamente (GUEDES et al., 2018; DE SOUZA et al., 2018), portanto, pode-se supor que o etanol aumenta a transferência de massa do soluto para o solvente, resultando em um aumento de rendimento de extração e reduzindo o tempo de extração.

TABELA 9 - RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PARÂMETROS CINÉTICOS ( $Y_e$  E  $k$ ) DA EXTRAÇÃO DE *S. GRANTII* REALIZADA COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO E ETANOL

Relação mássica (EtOH:matéria-prima)	Rendimento (%)	$Y_e$ (%)	$k \times 10^4$ (s <sup>-1</sup> )	$R^2$
Sem adição de etanol	2,15	3,38±0,25	2,22±0,32	0,97
0,5:1	3,92	3,81±0,03	12,90±0,61	0,98503
1:1	8,11	7,79±0,10	18,50±1,46	0,96606
1,5:1	23,06	23,50±0,40	14,90±1,35	0,96047

Os fluídos supercríticos, em geral, permitem uma transferência de massa mais eficiente de solutos a partir de matrizes, quando comparados aos líquidos orgânicos convencionais, com maior difusividade e menor viscosidade (GANDHI; ARORA; KUMAR, 2017). A adição de etanol na maior proporção de massa resultou em um maior rendimento de extração quando comparado à extração de Soxhlet usando etanol. A combinação de CO<sub>2</sub> supercrítico e etanol resulta em uma extração altamente eficiente, relacionada ao rendimento e ao tempo de extração, preservando as substâncias termolábeis da amostra. Assim, o CO<sub>2</sub> supercrítico e o etanol podem ser utilizados para extrair substâncias polares e não polares de *S. grantii*. Além disso, quando comparado ao Soxhlet, a extração com fluido supercrítico elimina longos períodos de extração, o uso em grande quantidade de solventes e etapas de evaporação dos mesmos (ÖZCAN; ÖZCAN, 2000).



### 3.3.4 Atividade antioxidante

Os antioxidantes consistem em substâncias que podem prevenir ou retardar o dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. No presente trabalho, a atividade antioxidante é expressa em concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>), ou seja, quanto menor o valor de IC<sub>50</sub> do extrato, maior seu potencial antioxidante (eliminação dos radicais) (LIM; LIM; TEE, 2007). A TABELA 10 mostra a atividade antioxidante do extrato de *S. grantii* obtido por diferentes métodos de extração.

TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE *S. GRANTII* POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Solventes	Extração	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Hexano	Soxhlet	2836,21±44,16 <sup>a</sup>
Éter de petróleo	Soxhlet	2367,72±35,20 <sup>b</sup>
Acetato de Etila	Soxhlet	137,53±1,81 <sup>gh</sup>
Acetona	Soxhlet	158,17±4,51 <sup>g</sup>
Etanol	Soxhlet	85,18±0,60 <sup>gh</sup>
Metanol	Soxhlet	66,32±0,09 <sup>h</sup>
Água	Soxhlet	328,25±6,08 <sup>f</sup>
CO <sub>2</sub>	ScCO <sub>2</sub>	761,39 ± 8,07 <sup>d</sup>
EtOH:matéria-prima (0,5:1)	scCO <sub>2</sub> + EtOH	1185,00±74,85 <sup>c</sup>
EtOH:matéria-prima (1:1)	scCO <sub>2</sub> + EtOH	282,61±3,75 <sup>f</sup>
EtOH:matéria-prima (1,5:1)	scCO <sub>2</sub> + EtOH	475,33±7,23 <sup>e</sup>

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem na coluna a um nível de confiança de 95%, de acordo com o teste de Tukey.

A concentração mínima inibitória (IC<sub>50</sub>) dos extratos obtidos por diferentes solventes e técnicas de extração variaram de 66,32 ± 0,09 a 2836,21 ± 44,16 µg mL<sup>-1</sup>, valores superiores ao IC<sub>50</sub> do extrato bruto da casca do caule (12,1 ± 0,3 µg mL<sup>-1</sup>) relatado por Munhoz et al. (2014). Estes resultados mostram que, apesar do maior rendimento da extração, os solventes não extraem todo o potencial antioxidante de *S. Grantii*.

As extrações por Soxhlet mostraram que solventes não polares resultaram em maior valor de IC<sub>50</sub>, indicando assim menor atividade antioxidante. As substâncias antioxidantes encontradas nas amostras de *S. grantii* são antocianinas presentes principalmente nas folhas (ANDERSEN et al., 2010), quercitina (DAWIDAR et al., 2011), ionol (1,3-ditertiobutil-2-hidroxi-5-metil-benzeno) que é um agente estabilizante no organismo, látex (BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1988) e alguns terpenos (MUNHOZ et al., 2014). A maioria dessas substâncias são solúveis em solventes polares, resultando em maior atividade antioxidante dos extratos de etanol e metanol.

A água é capaz de extrair todos esses compostos antioxidantes, uma vez que as substâncias polares e não polares são emulsionadas, porém a maior temperatura empregada na extração com Soxhlet provavelmente resultou na degradação de substâncias antioxidantes.

A amostra com maior rendimento de extração em massa, relação EtOH:matéria-prima de 1,5:1, apresentou um IC<sub>50</sub> de 475,33 ± 7,23 µg mL<sup>-1</sup>, sendo maior que o valor de IC<sub>50</sub> do extrato obtido por Soxhlet utilizando etanol como solvente. Este resultado mostra que o etanol é mais seletivo para substâncias antioxidantes e quando se utiliza CO<sub>2</sub> supercrítico, outras substâncias também podem ser obtidas, diminuindo a atividade antioxidante total do extrato. O extrato com menor IC<sub>50</sub> foi obtido com scCO<sub>2</sub> na presença de etanol na relação EtOH:matéria-prima de 1:1 (1185,00 ± 74,85 µg mL<sup>-1</sup>). Este resultado mostra que, apesar do maior rendimento obtido quando se utiliza uma maior razão de massa, a eficiência de extração de substâncias antioxidantes não aumenta. Este resultado, de acordo com a literatura (DE SOUZA et al., 2018; SANTOS et al., 2017), aponta que um excesso de etanol não altera o rendimento de extração e, também, pode diminuir a solubilidade aparente dos extratos. O CO<sub>2</sub> supercrítico é um solvente ideal quando se trata da extração de componentes termicamente lábeis (GANDHI; ARORA; KUMAR, 2018) e os resultados apresentados nesta seção mostram que apresentam um bom potencial na preservação de compostos antioxidantes apesar da menor atividade antioxidante quando comparada à extração com solvente polar convencional.

### 3.3.5 Composição química dos extratos de *S. grantii*

O efeito das condições do processo, como pressão, temperatura e método de extração na composição dos extratos de *S. grantii* foram verificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). A composição da área relativa (%) dos principais compostos dessas amostras é apresentada na TABELA 11.

TABELA 11 - COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS EXTRATOS DE S. GRANTII OBTIDOS PELA EXTRAÇÃO COM SOXHLET, CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO + ETANOL E CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO

Compostos	T <sub>r</sub> <sup>a</sup> (min)	Área relativa (%)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Germacrene D	30.79	0.79	0.15	-	-	0.36	0.43	0.54	-	0.78	-	1.28	0.45	
Heptadecano	31.48	0.28	0.32	0.20	-	0.90	0.61	0.8	0.80	0.76	1.17	1.38	0.59	
α-Murolene	31.65	0.54	0.27	0.26	-	0.10	0.36	-	-	-	-	-	-	
Acetato de Lupan-3-ol	46.70	0.67	0.45	0.49	-	1.13	1.29	1.14	1.57	1.10	-	1.22	3.82	1.78
α-Terpineno	47.27	0.15	0.15	-	-	0.23	-	-	-	-	-	-	-	
Phytol	52.78	0.87	-	0.57	-	-	0.13	0.9	-	-	-	-	0.65	
Hexacontano	77.01	11.47	10.97	10.82	7.73	10.87	10.42	15.22	17.64	8.55	-	3.52	23.58	2.53
Carvacrol	78.32	1.04	1.16	0.36	0.60	1.38	0.37	0.64	-	0.85	8.25	0.80	-	0.49
Euphol	80.68	68.84	75.05	71.31	79.81	69.29	69.72	59.94	62.94	67.75	73.62	68.45	54.82	75.44
Aldeído de Betulina	82.34	8.47	3.05	10.92	9.94	4.79	7.65	7.46	8.50	4.91	9.92	6.14	6.02	10.45
Friedelan-3-one	88.31	3.34	5.18	3.54	1.43	5.75	6.84	10.41	4.20	14.34	4.47	16.24	6.38	4.58

<sup>a</sup> Tempo de retenção.

Condições de corrida: **1** (Soxhlet – *n*-hexano); **2** (Soxhlet – éter de petróleo); **3** (Soxhlet – acetato de etila); **4** (Soxhlet – acetona); **5** (Soxhlet – etanol); **6** (Soxhlet – metanol); **7** (EtOH:matéria-prima relação de massa de 0.5:1.0); **8** (EtOH:matéria-prima relação de massa de 1.0:1.0); **9** (EtOH:matéria-prima relação de massa de 1.5:1.0); **10** (scCO<sub>2</sub> – 80 °C, 25 MPa); **11** (scCO<sub>2</sub> – 40 °C, 25 MPa); **12** (scCO<sub>2</sub> – 40 °C, 15 MPa); **13** (scCO<sub>2</sub> – 60 °C, 20 MPa). Extração com Soxhlet foi realizada no ponto de ebulição de cada solvente a pressão atmosférica e extração com CO<sub>2</sub> supercrítico a 60 °C e 20 MPa.

Dentre as substâncias identificadas, o euphol foi o principal constituinte apresentado em todos os extratos, variando de 54,82% a 79,81%. Este composto é um triterpeno tetracíclico amplamente divulgado como constituinte principal nos extratos das espécies de Euphorbiaceae (CRUZ et al., 2018). Estudos anteriores atribuíram à essa substância, importantes capacidades biológicas como atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (CHEN et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2013).

O aldeído de betulina e friedelan-3-ona são compostos triterpenóides e também foram identificados em todos os extratos de *S. grantii* (3,05% - 10,92%). Esses compostos são de interesse no campo médico, pois são capazes de prevenir doenças cancerígenas (pulmão, mama, câncer colorretal e câncer cervical, leucemia e vários tipos de melanoma) (CHROBAK et al., 2019; ODEH et al., 2016). Como pode ser visto na TABELA 10, a amostra 2, que obtida pelo método de Soxhlet usando éter de petróleo, mostrou uma área relativa mais baixa (3,05%) em comparação com os outros extratos.

O composto de carvacrol é um monoterpenóide e ganhou atenção por suas várias propriedades biológicas, como anti-inflamatório, incluindo fortes propriedades antibacterianas, anticâncer e antioxidante (KHAN et al., 2019). Este composto foi identificado na maioria dos extratos de *S. grantii*. Vale ressaltar que o uso de CO<sub>2</sub> supercrítico na temperatura mais alta do processo (80 °C) avaliada neste estudo levou à maior área relativa (8,25%).

Foi observado que o método de extração e a polaridade do solvente influenciaram a recuperação do composto  $\alpha$ -terpeneno. As amostras extraídas com solventes não polares (hexano e éter de petróleo) apresentaram áreas relativas numericamente menores (0,15%) em comparação com a amostra 5 (0,23%) obtida com solvente etanol. O  $\alpha$ -terpineno é um monoterpeno com capacidade antioxidante identificada em óleos essenciais de uma grande variedade de alimentos e plantas aromáticas, como *Mentha piperita*, *Melaleuca alternifolia* e orégano (QUIROGA; NEPOTE; BAUMGARTNER, 2019).

Outras substâncias importantes foram detectadas nos extratos de *S. grantii*, como fitol, acetato de lupan-3-ol,  $\alpha$ -Muurolene e Germacrene D. O fitol é um diterpeno que possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticancerígenas e diuréticas (DE SOUZA et al., 2018). O acetato de lupan-3-ol é um triterpeno relacionado a prevenção e o tratamento de tumores malignos (RAMÍREZ et al., 2016). O  $\alpha$ -Muurolene e o Germacrene D são hidrocarbonetos de sesquiterpenos

que apresentaram áreas relativas menores neste estudo. No entanto, eles têm um papel significativo na atividade antioxidante, mesmo em baixas concentrações (CARRILLO; TENA, 2006). De acordo com Abd-ElGawad et al. (2019), esses constituintes menores podem estar relacionados em sinergismo com os outros compostos ativos majoritários.

De maneira geral, as técnicas de extração e as condições operacionais aplicadas neste estudo foram eficazes na recuperação de diferentes compostos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes das folhas e caules da janaúba. No entanto, com base em um processo de extração mais rápido e eficiente, sem geração de resíduos tóxicos, o fluido scCO<sub>2</sub> + etanol seria a melhor escolha para a extração desses compostos.

### 3.4 CONCLUSÃO

Os extratos de *S. grantii* obtidos por diferentes polaridades do solvente mostram que o rendimento varia dependendo do solvente utilizado, resultando em alterações na composição do extrato. Assim, para a extração convencional, as substâncias-alvo podem ser obtidas com base na polaridade de seus constituintes. Em relação à extração supercrítica de CO<sub>2</sub>, a adição do etanol aumentou a eficiência da extração devido ao aumento da polaridade do solvente. A atividade antioxidante dos extratos também aumentou com a polaridade do solvente. Para a extração supercrítica, a maior atividade antioxidante foi obtida para a relação EtOH:matéria-prima de 1:1. As substâncias identificadas nos extratos de *S. grantii* por espectrometria de massas foram euphol, carvacrol, aldeído de betulina e friedelan-3-one e sua quantidade variava em função do solvente utilizado.

Os extratos de *S. grantii* obtidos neste trabalho podem ser utilizados para diversas aplicações nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia. As diferentes substâncias e o potencial bioativo dos extratos podem ser modulados pelo solvente utilizado e, conseqüentemente, um melhor fracionamento e aproveitamento da planta pode ser obtido. A extração com fluido supercrítico pode ser vantajosa em comparação com o Soxhlet, uma vez que a remoção do desse solvente é mais simples.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas existentes preocupam-se em buscar alternativas que possam contribuir com informações científicas e técnicas para que as diferentes plantas tenham utilização criteriosa trazendo benefícios comprovados.

Dentre as plantas utilizadas visando a prevenção ou cura de patologias, selecionamos a citronela (*Cymbopogon winterianus*) e a janaúba (*Synadenium grantii*). A citronela, muito utilizada pelo efeito calmante, aromatizador, bactericida e, também, relacionada como repelente ao mosquito *Aedes Aegypti* causador de inúmeros problemas de saúde já tem larga utilização industrial em diferentes campos. A janaúba, difundida como possibilidade de cura de diferentes tipos de câncer tem uso mais restrito e extração quase sempre artesanal.

Alguns vegetais com histórico para cura de doenças, têm sido utilizados com poucas orientações técnicas, pela falta de estudos científicos. Nesse sentido, torna-se realmente importante colaborar com a literatura. Logo, o objetivo central desta pesquisa foi estudar um processo de extração que pudesse contribuir nos diferentes campos onde as duas espécies são empregadas.

Dentre as possíveis contribuições, uma que se torna interessante é a obtenção de extrato dessas plantas pela extração com fluido supercrítico, que é uma técnica que permite o controle de parâmetros como temperatura e pressão com algumas vantagens, considerando que fornece um extrato de maior qualidade sem solvente ou com solvente não tóxico. É uma alternativa aos processos tradicionais e por ser feita em baixa temperatura evita a degradação dos compostos ativos.

Este trabalho viabilizou, com bons rendimentos, a obtenção de extratos de citronela e janaúba utilizando a extração supercrítica. Em relação à citronela, os resultados mostram que o aumento da pressão nos experimentos com scCO<sub>2</sub> puro e propano comprimido foi responsável pela redução do tempo de extração. Apesar do propano comprimido ser um solvente que oferece vantagens em termos de cinética de extração, a aplicação do CO<sub>2</sub> ainda é mais requerida já que é um gás que pode ser reciclado, barato, essencialmente não-tóxico, não inflamável e ter facilidade para atingir às condições críticas. Ainda, aprimorando os resultados, a extração pelo processo supercrítico com adição de etanol como co-solvente, indica que a técnica é mais rápida e leva a maiores rendimentos em equilíbrio, uma vez que a citronela é

rica em compostos polares, além de demonstrar capacidade extrativa de uma grande quantidade de compostos importantes como: citronelal, citronelol, elemol, geraniol, germacreno D-4-ol e ácido agatólico.

Devido a essas vantagens que a extração supercrítica com CO<sub>2</sub> proporciona, em relação a extração com propano comprimido, o estudo da janaúba foi providenciado a partir desse gás. Logo, com os extratos obtidos pelos diferentes solventes com diferentes polaridades, foi observado que o rendimento varia dependendo do solvente utilizado, resultando em alterações na composição do extrato. Em relação à eficiência da extração e atividade antioxidante houve uma melhora com o aumento da polaridade do solvente. As substâncias identificadas nos extratos de *S. grantii* por espectrometria de massas foram euphol, carvacrol, aldeído de betulina e friedelan-3-one, que são substâncias de uso medicinal por serem relacionadas ao combate ou prevenção de algumas doenças.

Por fim, a presente pesquisa consegue demonstrar o potencial que as extrações com fluidos supercríticos ou comprimidos possuem, em relação as técnicas de extrações convencionais, para obtenção de extratos mais aprimorados para uso dentro dos setores industriais de alimentos, fármacos e químicos. E, apesar do gás CO<sub>2</sub> ser elegido como o principal, é importante salientar que dependendo do tipo de composição da planta e qual substância se quer extrair em proeminência, a polaridade do solvente afetará no rendimento total desse extrato e/ou no rendimento da substância em questão.

#### 4.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para os trabalhos futuros em relação aos temas apresentados recomenda-se:

1. Estudo da viabilidade econômica dos métodos testados;
2. Otimização dos processos de extração de *Cymbopogon winteranius* e *S. grantii* buscando a recuperação máxima de compostos.
3. Avaliar o isolamento dos compostos de interesse com elevado potencial biológico.
4. Avaliar demais potenciais bioativos dos extratos de *Cymbopogon winteranius*, como antimicrobiano.
5. Avaliar o potencial extrativo de outros solventes orgânicos.



6. Realizar testes *in vivo* da atividade antioxidante dos extratos.
7. Realizar testes *in vitro* e *in vivo* de atividade anti-tumoral dos extratos
8. Avaliar a citotoxicidade dos extratos de *Synadenium grantii* Hook. f.
9. Avaliar o micro encapsulamento dos extratos, a fim de verificar sua estabilidade biológica neste cenário.

## REFERÊNCIAS

- ABAROUDI, K.; TRABELSI, F.; CALLOUD-GABRIEL, B.; RECANSENS, F. Mass transport enhancement in modified supercritical fluid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 3505-3518, 1999.
- ABD-ELGAWAD, M. A.; ELSHAMY, A. I.; AMIER, Y. A. E.; GENDY, A. E. N. G. E.; BARATI, S. A. A.; DAR, B. A.; ROWAILY, S. L. A.; ASSAEED, A. M. Chemical composition variations, allelopathic, and antioxidant activities of *Symphotrichum squamatum* (Spreng.) Nesom essential oils growing in heterogeneous habitats. **Arabian Journal of Chemistry**, 2019.
- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 40, p. 311-331, 2009.
- AHMAD, T.; MASOODI, F. A.; RATHER, S. A.; WANI, S. M.; GULL, A. Supercritical Fluid Extraction: A Review. **Journal of Biological and chemical Chronicles**, v. 5, n. 1, p. 114-122, 2019.
- AKHILA, A. **Essential oil-bearing grasses: the genus *Cymbopogon***. Flórida: CRC Press, 2010.
- AMARO, M. S.; MEDEIROS FILHO, S.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E. M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. – Apocynaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 63-71, 2006.
- AMAZÔNIA FITOMEDICAMENTOS LTDA. Pianowski, L. F.; Batista, J. C.; Leal, P. C.; Chaves, C. P. **Pharmaceutical uses of Lanosta-8,24-dien-3-ols**. US 20110136773 A1, 05 ago. 2008, 30 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.google.st/patents/US20110136773>>. Acesso em: 13 jun. 2016.
- ANDERSEN, Ø. M.; JORDHEIM, M.; BYAMUKAMA, R.; MBABAZI, A.; OGWENG, G. SKAAR, I.; KIREMIRE, B. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 71, p. 1558-1563, 2010.
- ANITESCU, G.; DONEANU, C.; RADULESCU, V. Isolation of *Coriander* oil: comparison between steam distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, n. 3, p. 173-176, 1997.
- ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. Vol. 1 e 2. Brasília: Anvisa, 2010.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**. Arlington, 1999.
- ARANCIBIA, M. Y.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Release of volatile compounds and biodegradability of active soy

protein lignin blend films with added citronella essential oil. **Food Control**, v. 44, p. 7-15, 2014.

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, n. 11, p. 419-421, 2000.

ASSIS, R. J.; DOS SANTOS, L. F.; PERES, V. F.; DARIVA, C.; DE OLIVEIRA, J. V.; BASTOS CARAMÃO, E. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): A study of extraction methods. **Journal of separation science**, v. 29, n. 18, p. 2780-2784, 2006.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27-36, 2005.

AURELI, P.; COSTANTINI, A.; ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 5, p. 344-348, 1992.

AZEVEDO, A. B. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S.; VIEIRA DE MELO, S. A. B.; KIECKBUSCH, T. G. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 3, p. 543-552, 2008.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BAGAVATHI, R.; SORG, B.; HECKER, E. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. **Planta Med**, v. 54, p. 506-510, 1988.

BAHRIN, N.; MUHAMMAD, N.; ABDULLAH, N.; TALIP, B. H. A.; JUSOH, S.; THENG, S. W. Effect of Processing Temperature on Antioxidant Activity of *Ficus carica* Leaves Extract. **Journal of Science and Technology**, v. 10, n. 2, 2018.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BASER, H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**. 2. ed. Flórida: CRC Press, 2016.

BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on elemol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11 SUPPL., p. 147–148, 2008.

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

BLASZYK, M.; HOLLEY, R. A. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 175-183, 1998.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-2000, 1959.

BOWLES, B. L.; JUNEJA, V. K. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by naturally occurring food additives. **Journal of Food Safety**, v. 18, p. 101-112, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LebensmWiss u-Technol**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Decreto nº. 50.040, de 24 de janeiro de 1961. **Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1961.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849 – 854, 2009.

CAMPOS, A.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; LONGATO, G. B.; ZERMIANI, T.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; CECHINEL FILHO, V. Antiproliferative effect of *Synadenium grantii* Hook f. stems (*Euphorbiaceae*) and a rare phorbol diterpene ester. **International journal of toxicology**, v. 35, n. 6, p. 666-671, 2016.

CANADÁ. Chemical Health Hazard Assessment Division. Safety summary of citronella oil as a flavouring agent. **Health Canada**, Ottawa, 19 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/facts-faits/citron-eng.php>>. Acesso em: 18 mai. 2016.

CARDOZO, E. L.; CARDOZO-FILHO, L.; FERRARESE FILHO, O.; ZANOELO, E. F. Selective liquid CO<sub>2</sub> extraction of purine alkaloids in *different Ilex paraguariensis* progenies grown under environmental influences. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 17, p. 6835-6841, 2007.

CARLSON, L. H. C.; MACHADO, R. A. F.; SPRICIGO, C. B.; PEREIRA, L. K.; BOLZAN, A. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, n. 1, p. 33-39, 2001.

CARMONA-JIMÉNEZ, Yolanda; GARCÍA-MORENO, Maria V.; IGARTUBURU, Jose M.; BARROSO, Carmelo G. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. **Food Chemistry**, v. 165, p. 198-204, 2014.

CARRILLO, J. D.; TENA, M. T. Determination of volatile compounds in antioxidant rosemary extracts by multiple headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 626-633, 2016.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamento fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; DE LA OSSA, E. M. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 1, p. 43-49, 2007.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

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

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 414-420, 2013.

CHEN, C. L.; CHEN, Y. P.; LIN, M. W.; HUANG, Y. B.; CHANG, F. R.; DUH, T. H.; WU, D. C.; WU, W. C.; KAO, Y. C.; YANG, P. H. Euphol from *Euphorbia tirucalli* Negatively Modulates TGF- $\beta$  Responsiveness via TGF- $\beta$  Receptor Segregation inside Membrane Rafts. **PLoS ONE**, v. 10, p.1-22, 2015.

CHROBAK, E.; KADELA-TOMANEK, M.; BĘBENEK, E.; MARCINIEC, K.; WIETRZYK, J.; TRYNDA, J.; PADUSZYŃSKI, P. New phosphate derivatives of betulin as anticancer agents: Synthesis, crystal structure, and molecular docking study. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 613-628, 2019.

CLAIN, E.; BARANAUSKIENÉ, R.; KRAUJALIS, P.; SIPAILIENE, A.; MAZDZIERIENE, R.; KAZERNAVICIUTE, R.; KALAMOUNI, C. E.; VENSKUTONIS, P. R. Biorefining of *Cymbopogon nardus* from Reunion Island into essential oil and antioxidant fractions by conventional and high pressure extraction methods. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 158-167, 2018.

COELHO, R.; KANDA, L. R.; HAMERSKI, F.; MASSON, M. L.; CORAZZA, M. L. Extraction of Kiwifruit Seed (*Actinidia Deliciosa*) Oil Using Compressed Propane. **Journal of Food Process Engineering**, v 39, n. 4, p. 335-344, 2016.

CORAZZA, S. **Aromacologia**: uma ciência de muitos cheiros. São Paulo: SENAC, 2002.

CORREA, M.; MESOMO, M. C.; PIANOSKI, K. E.; TORRES, Y. R.; CORAZZA, M. L. Extraction of inflorescences of *Musa paradisiaca* L. using supercritical CO<sub>2</sub> and compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 128-135, 2016.

CORREA, M.; BOMBARDELLI, M. C.; FONTANA, P. D.; BOVO, F.; MESSIAS-REASON, I. J.; MAURER, J. B. B.; CORAZZA, M. L. Bioactivity of extracts of *Musa*

paradisiaca L. obtained with compressed propane and supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 63-69, 2017.

CORSO, M. P.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; SILVA, E. A.; CARDOZO FILHO, L.; SANTOS, J. N.; FREITAS, L. S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 52, p. 56-61, 2010.

COSTA, L. L. G. **Screening fitoquímico e estudo biológico de *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae)**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

COSTA, L. L.; DAVID, V. C.; PINTO, R.; MINOZZO, B. R.; KOZLOWSKI JUNIOR, V. A.; CAMPOS, L. A.; BELTRAME, F. L. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1070-1078, 2012.

COUNCIL OF EUROPE. Natural sources of flavourings. **Council of Europe Publishing**, n. 1, p. 169-172, 2000.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTN, J.R.; WYLLIC, S.G. The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, p. 170-175, 2000.

CRUZ, L. S.; OLIVEIRA, T. L.; KANUNFRE, C. C.; PALUDO, K. S.; MINOZZO, B. R.; PRESTES, A. P.; WANG, M.; FERNANDES, D.; DOS SANTOS, F. A.; MANDA, V. K.; KHAN, S. I.; ALI, Z.; MESSIAS-REASON, I. J.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. Pharmacokinetics and cytotoxic study of euphol from *Euphorbia umbellata* (Bruyns) Pax latex. **Phytomedicine**, v. 47, p. 105-112, 2018.

CUCO, R. P.; MASSA, T. B.; POSTAUE, N.; CARDOZO FILHO, L.; SILVA, C.; IWASSA, I. J. Oil extraction from structured bed of pumpkin seeds and peel using compressed propane as solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 152, p. 1-7, 2019.

CZAIKOSKI, K. **Cinética, composição química e atividade biológica de extratos de flores de *Eupatorium intermedium* obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido**. 106 f. Tese (Doutorado e Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; SCHEER, A. P.; SANTA, O. R. D.; QUEIROGA, C. L.; CORAZZA, M. L. Kinetics, composition and biological activity of *Eupatorium intermedium* flower extracts obtained from CO<sub>2</sub> and compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 145-153, 2015a.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; KRUEGER, R. L.; QUEIROGA, C. L.; CORAZZA, M. L. Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO<sub>2</sub> and bioactivity assessments. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 79-85, 2015b.

DA ROCHA, F. W. J.; REIS, J. P.; WHITAKER, J. C. P.; CAMPOS, A.; PASTOR, M. V. D.; CECHINEL FILHO, V.; QUINTÃO, N. L. M. Effect of *Synadenium grantii* and its isolated compound on dysmenorrhea behavior model in mice. **Inflammopharmacology**, p. 1-8, 2019.

DA SILVA, C. DE B. GUTERRES, S.S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E. E. E. Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 12, n. 1, p. 63-66, 2008.

DAWIDAR, A. A. M.; KESHK, E. M.; SAAD, H. H.; MOGIB, M. A. GC/MS analysis of sesquiterpenes in *Synadenium grantii*. **Mansoura J. Chem**, v. 38, n. 2, p. 107-119, 2011.

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

DE OLIVEIRA, T. L.; MUNHOZ, A. C. M.; LEMES, B. M.; MINOZZO, B. R.; NEPEL, A.; BARISON, A.; BELTRAME, F. L. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 263-269, 2013.

SOUZA, A. T.; BENAZZI, T. L.; GRINGS, M. B.; CABRAL, V.; DA SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. **J. Supercrit. Fluids**. v. 47, p. 182-187, 2008.

DE SOUZA, A. R. C.; GUEDES, A. R.; RODRIGUEZ, J. M. F.; BOMBARDELLI, M. C.; CORAZZA, M. L. Extraction of *Arctium Lappa* leaves using supercritical CO<sub>2</sub>+ ethanol: Kinetics, chemical composition, and bioactivity assessments. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, p. 137-146, 2018.

DEL VALLE, J. M.; AGUILERA, J. M. Revisión: Extracción con CO<sub>2</sub> a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos. **Food Science and Technology International**, v. 5, p. 1-24, 1999.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay., **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.

DEY, T. B.; CHAKRABORTY, S.; JAIN, K. K.; SHARMA, A.; KUHAD, R. C. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 60-74, 2016.

DOCAMPO, P. C.; CABRERIZO, S.; PALADINO, N.; PARREÑO, M. L.; RUFFOLO, V.; MUTTI, O. Eritrodermia secundaria a planta productora de látex (*Synadenium grantii*). **Archivos argentinos de pediatría**, v. 108, n. 6, p. 126-129, 2010.

DOGENSKI, M. **Extração do óleo essencial e oleoresina das folhas de *Corymbia citriodora* utilizando o CO<sub>2</sub> em condições sub e supercríticas**. 144 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

DOKER, O.; SALGIN, U.; SANAL, I.; MEHMETOGLU, U.; ÇALIMLI A. Modeling of extraction of-carotene from apricot bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> in packed bed extractor. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 28, p. 11-19, 2004.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of brasilian medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DURGAWALE, P. P.; SHUKLA, P. S.; SONTAKKE, S. D.; CHOUGULE, P. G. Differential erythrocyte agglutination pattern in normal and cancer patients with *Synadenium grantii* root (Hook f) lectin. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 16, n. 1, p. 110-112, 2001.

DUTRA, R. C.; DA SILVA, K. A. B. S.; BENTO, A. F.; MARCON, R.; PASZCUK, A. F.; MEOTTI, F. C.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Euphol, a tetracyclic triterpene produces antinociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain: The involvement of cannabinoid system. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 593-605, 2012.

EDGAR, D. M.; HIMMELBLAU, T. F. Optimization of Chemical Process, **McGraw-Hill International Editions**, Singapore, 1989.

EPAGRI. Normas técnicas para cultivo de capim-limão, citronela, palma-rosa e patchuli. **Sistemas de Produção**, v. 37, 2004.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; LOPES, D.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. Effects of processing conditions on the chemical distribution of mate tea leaves extracts obtained from CO<sub>2</sub> extraction at high pressures. **Journal of Food Engineering**, v. 70, n. 4, p. 588-592, 2005.

FREITAS, L. S.; DE OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2558-2564, 2008.

GALVÃO, E. L. **Extração do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* J. com CO<sub>2</sub> pressurizado**. 89 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

GANDHI, K.; ARORA, S.; KUMAR, A. Industrial applications of supercritical fluid extraction: A review. **Int. J. Chem. Stud**, v. 5, p. 336-340, 2017.

GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Rev. Bras. Ciên. Farm.** v. 39, 2003.

GOMIDE, R. **Operações Unitárias: Operações com sistemas sólidos granulares**. Vol. 1, São Paulo: Edição do autor, 1983.



GUEDES, A. R.; DE SOUZA, A. R. C.; ZANOELO, E. F.; CORAZZA, M. L. Extraction of citronella grass solutes with supercritical CO<sub>2</sub>, compressed propane and ethanol as cosolvent: Kinetics modeling and total phenolic assessment. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, p. 16-22, 2018.

GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.L., BELL, H.C.; WYLLIC, S.G.; WARMINGTON, J.R. Effects of tea tree oils on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 26, p. 194-198, 1998.

HAO, Y. Y.; BRACKETT, R. E.; DOYLE, M. P. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. **Journal of Food Microbiology**. v. 15, n. 4, p. 367-378, 1998.

HARTMANN, D. B.; MARIM, R. A.; DA SILVA, Y. L.; ZARDETO, G.; DE AZEVEDO SILVA, I.; DE ARRUDA MATTOS, D.; LAVERDE-JR, A. Letalidade do extrato de *Synadenium grantii* Hook. F.(Euphorbiaceae) frente a caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda, Planorbidae). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n. 1, 2011.

HASSAN, E. M.; MOHAMMED, M.; MOHAMED, S. M. Two New Phorbol-Type Diterpene Esters from *Synadenium grantii* Hook F. Leaves. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 3, 2012.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behing antioxidante capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ILLÉS, V.; DAOOD, H. G.; PERNECZKI, S.; SZOKONYA, L.; THEN, M. Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super – and subcritical conditions. **J. Supercrit. Fluids**, v. 17, p. 177-186, 2000.

JESSOP, P. G.; SUBRAMANIAM, B. Gas-expanded liquids. **Chemical reviews**, v. 107, n. 6, p. 2666-2694, 2007.

JUCHEN, P. T.; ARAUJO, M. N.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L.; VOLL, F. A. P. Extraction of parboiled rice bran oil with supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as co-solvent: Kinetics and characterization. **Industrial Crops & Products**, v. 139, p. 111-506, 2019.

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

KHAN, I.; BHARDWAJ, M.; SHUKLA, S.; MIN, S. H.; CHOI, D. K.; BAJPAI, V. K.; HUH, Y. S.; KANG, S. C. Carvacrol inhibits cytochrome P450 and protects against binge alcohol induced liver toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, 2019.

KIM, A. S.; NAIR, P. M. M. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 43, n. 11, p. 2839-2845, 1995.

KINGHORN, A. Douglas. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 69, n. 12, p. 1446-1447, 1980.

KOTOVICZ, V.; ZANOELO, E. F. Hydrostatic pressure cycling extraction of soluble matter from mate leaves. **Journal of food engineering**, v. 116, n. 3, p. 656-665, 2013.

LASTA, H. F. B.; LENTZ, L.; MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical CO<sub>2</sub> to recover extracts enriched in antioxidant compounds from beetroot aerial parts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101-169, 2019.

LEAL, A. **Agência Brasil**. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-04/brasil-vive-triplice-epidemia-de-virus-transmitidos-pelo-aedes-aegypti>>. Acesso em: 13 jun. 2016.

LEBOVKA, N.; VOROBIEV, E.; CHEMAT, F. **Enhancing extraction processes in the food industry**. CRC Press, 2016.

LENARDÃO, E. J.; BOTTESELLE, G. V.; AZAMBUJA, F.; PERIN, G.; JACOB, R. G. Citronellal as key compound in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, n. 29, p. 6671-6712, 2007.

LI, X.; CHEN, D.; WANG, G.; LU, Y. Probing the interaction of human serum albumin with DPPH in the absence and presence of the eight antioxidants. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 1144-1152, 2015.

LIM, Y. Y.; LIM, T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food chemistry**, v. 103, n. 3, p. 1003-1008, 2007.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 82, p. 759-762, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LUZ, H. S.; SANTOS, A. C. G.; LIMA, F. C.; MACHADO, K. R. G. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. **Rev. bras. plantas med.**, v. 16, n. 3, p. 657-662, 2014.

MACHADO, M. M. **Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos in vitro da *Euphorbia tirucalli* L.** 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

MALALUAN, L. M. A.; MALALUAN, R. M. Enzymatic extract fractionation of (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) Citronella through Supercritical Carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>). **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 656-662, 2015.

MANAF, M. A.; MUSTAPA, A. N.; MUSTAPA, K. **Supercritical fluid extraction of Citronella oil from *Cymbopogon nardus* and its optimization**. In: IEEE Business Engineering and Industrial Applications Colloquium (BEIAC), Langkawi, 2013.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1995. 374 p.

MARQUES, S. C. **Enciclopédia técnica universal**. Porto Alegre: Editora Globo, 1958.

MARTINÉZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO<sub>2</sub> supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos**. 172 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MAZURELLA, J. C. Antifungal activity of essential oils. **Soap, Perfumery and Cosmetics**, v. 33, p. 835-837, 1960.

MAZURELLA, J. C.; SICURELLA, N. A. Antibacterial activity of essential oil vapours. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 49, p. 692-694, 1960.

MCHUGH, M., KRUKONIS, V. **Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice**. 2. ed. Stoneham: Butterworth-Heinemann, 1994.

MENON, M.; VITHAYATHIL, P. J.; RAJU, S. M.; RAMADOSS, C. S. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f. **Plant Science**, v. 163, n. 1, p. 131-139, 2002.

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, p. 127-130, 2001.

MESOMO, M. C.; DE PAULA SCHEER, A.; PEREZ, E.; NDIAYE, P. M.; CORAZZA, M. L. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO<sub>2</sub> and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 102-109, 2012.

MESOMO, M. C. **Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) usando CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica**. 79 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MESOMO, M. C.; CORAZZA, M. L.; NDIAYE, P. M.; DALLA SANTA, O. R.; CARDOZO, L.; DSE PAULA SCHEER, A. Supercritical CO<sub>2</sub> extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 80, p. 44-49, 2013.

MOHAMED, S. A.; ABDEL-ATY, A. M.; HAMED, M. B.; EL-BADRY, M. O.; FAHMY, A. S. *Ficus sycomorus* latex: A thermostable peroxidase. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 76, p. 17532-17543, 2011.

MONCADA, J.; TAMAYO, J. A.; CARDONA, C. A. Techno-economic and environmental assessment of essential oil extraction from Citronella (*Cymbopogon winteriana*) and Lemongrass (*Cymbopogon citratus*): A Colombian case to evaluate

different extraction technologies. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 175-184, 2014.

MONDELLO, F.; DE BERNARDIS, F.; GIROLAMO, A.; CASSONE, A.; SALVATORES, G. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and –resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**. 6:158, 2006.

MONTES, A.; HANKE, F.; WILLIAMSON, D.; GUAMÁN-BALCÁZAR, M. C.; VALOR, D.; PEREYRA, C.; TEIPEL, U.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. Precipitation of powerful antioxidant nanoparticles from orange leaves by means of supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, v. 31, p. 235-243, 2019.

MOON, J.-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MORAES, R.; ELFVENDAHL, S.; KYLIN, H.; MOLANDER, S. Pesticide residues in rivers of a Brazilian rain forest reserve: assessing potential concern for effects on aquatic life and human health. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 32, n. 4 p. 258-263, 2003.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; WANDERLEY, P. A.; CARMO, E. S.; SOUZA, E. L. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 28-33, 2010.

MUNHOZ, A. C.; MINOZZO, B. R.; CRUZ, L. S.; OLIVEIRA, T. L.; MACHADO, W. M.; PEREIRA, A. V.; BARISON, A. Chemical and pharmacological investigation of the stem bark of *Synadenium grantii*. **Planta medica**, v. 80, n. 06, p. 458-464, 2014.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, p. 8-18, 2011.

NASCIMENTO, A. D. P.; SOARES, L. A. L.; STRAGEVITCH, L.; DANIELSKI, L. Extraction of *Acrocomia intumescens* Drude oil with supercritical carbon dioxide: Process modeling and comparison with organic solvent extractions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 1–7, 2016.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia, 2007.

NIMET, G.; SILVA, E. A.; PALÚ, F.; DARIVA, C.; FREITAS, L., S.; NETO, A. M.; CARDOZO FILHO, L. Extraction of sunflower (*Heliantus annuus L.*) oil with supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical propane: Experimental and modeling. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 1, p. 262-268, 2011.

ODEH, I. C.; TOR-ANYIIN, T. A.; IGOLI, J. O.; ANYAM, J. V. In vitro antimicrobial properties of friedelan-3-one from *Pterocarpus santalinoides* L'Herit, ex Dc. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 14, p. 531-538, 2016.

OLIVEIRA, A. R. M. F.; JEZLER, C. N.; OLIVEIRA, R. A.; MIELKE, M. S.; COSTA, L. C. B. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Hortic. bras.**, v. 30, n.1, p. 155-159, 2012.

OLIVEIRA, G. L. S. Determination in vitro of the antioxidant capacity of natural products by the DPPH•method: review study. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 1, 2015.

OLIVEIRA, E. L.; SILVESTRE, A. J.; SILVA, C. M. Review of kinetic models for supercritical fluid extraction. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 7, p. 1104-1117, 2011.

ORTÊNCIO, W. B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. 2. ed. Brasília: Thesaurus, 1997.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

ÖZCAN, A.; ÖZCAN, A. S. Supercritical fluid extraction of *Euphorbia rigida*. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, n. 5, p. 397-400, 2000.

PATRA, N. K., SINGH, H. P., KALRA, A. Isolation and development of a geraniol rich cultivar of citronella (*Cymbopogon winterianus*). **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 19, p. 672-676, 1997.

PAWLISZYN, J. Kinetic Model of Supercritical Fluid Extraction. **Journal of Chromatographic Science**, v. 31, n. 1, p. 31-37, 1993.

PEDERSSETTI, M. M.; PALÚ, F.; SILVA, E. A.; ROHLING, J. H.; CARDOZO FILHO, L.; DARIVA, C. Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 189-196, 2011.

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

PEREIRA, M. G.; HAMERSKI, F.; ANDRADE, E. F.; SCHEER, A. D. P.; CORAZZA, M. L. Assessment of subcritical propane, ultrasound-assisted and Soxhlet extraction of oil from sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis) seeds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 338-348, 2017.

PEREIRA, M. G.; MACIEL, G. M.; HAMINIUK, C. W. I.; BACH, F.; HAMERSKI, F.; SCHEER, A. P.; CORAZZA, M. L. Effect of Extraction Process on Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Oil from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* Var. Flavicarpa) Seeds. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, p. 2611-2625, 2019.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, B.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; MARQUES, A. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 224-231, 2013.

PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; DOS SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, G. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, 2017.

QUEIROZ, A.; CAJAIBA, J. A sustainable process for (-)- $\alpha$ -bisabolol extraction from *Eremanthus erythropappus* using supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 39-46, 2016.

QUIROGA, P. R.; NEPOTE, V.; BAUMGARTNER, M. T. Contribution of organic acids to  $\alpha$ -terpinene antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 277, p. 267-272, 2019.

RAJESH, R.; NATARAJU, A.; GOWDA, C. D. R.; FREY, B. M.; FREY, F. J.; VISHWANATH, B. S. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, n. 10, p. 1313-1322, 2006.

RAMÍREZ, M. H. C.; JIMÉNEZ, M. R. M.; LAREDO, R. F. G.; INFANTE, J. A. G.; GUZMÁN, N. E. R. Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: a review. **EXCLI Journal**, v. 15, p. 758-771, 2016.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and Possibilities of Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction in Food Processing Industry: An Overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 5, p. 269-284, 2002.

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

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

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 73-78, 2000.

pazSAHENA, F.; ZAIDUL, I. S. M.; JINAP, S.; KARIM, A. A.; ABBAS, K. A.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 240–253, 2009.

SANTIN, R. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SANTOS, K. A.; BARICATTI, R. A.; CARDOZO-FILHO, L.; SCHNEIDER, R.; PALÚ, F.; DA SILVA, C.; DA SILVA, E. A. Extraction of crambe seed oil using subcritical propane: kinetics, characterization and modeling. **J. Supercritic. Fluids**, v. 104, p. 54-61, 2015.

SANTOS, Ê. R.; OLIVEIRA, H. N.; OLIVEIRA, E. J.; AZEVEDO, S. H.; JESUS, A. A.; MEDEIROS, A. M.; SOUSA, E. M. Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 1-9, 2017.

SAPKALE, G. N.; PATIL, S. M.; SURWASE, U. S.; BHATBHAGE, P. K. Supercritical Fluid Extraction: A Review. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 729-743, 2010.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method., **Food Chemistry** v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**. v. 18, p. 820–897, 2015.

SHEN, Z.; KAMDEM, D. P. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 289-296, 2015.

SILVA, C. F. MOURA, F. C; MENDES, M. F.; PESSOA, F. L. P. Extraction of citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil using supercritical CO<sub>2</sub>: Experimental data and mathematical modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 343–350, 2011.

SILVA, M. R.; XIMENES, R. M.; DA COSTA, J. G. M.; LEAL, L. K. A.; DE LOPES, A. A.; DE BARROS VIANA, G. S. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 381, n. 5, 415-426, 2010a.

SILVA, M. L. C., COSTA, R. S., SANTANA, A. S., KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010b.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 1102 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2001.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SINGH, K. V.; SHUKLA, N. P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v. 55, p. 313-315, 1984.

SINHA, S.; BISWAS, D.; MUKHERJEE, A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1521-1527, 2011.

SINHA, S.; JOTHIRAMAJAYAM, M.; GHOSH, M.; MUKHERJEE, A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 71-77, 2014.

SOLANA, M.; BOSCHIERO, I.; DALL'ACQUA, S.; BERTUCCO, A. Extraction of bioactive enriched fractions from *Eruca sativa* leaves by supercritical CO<sub>2</sub> technology using different co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 245-251, 2014.

SOLOMON, B.; GEBRE-MARIAM, T.; ASRES, K. Mosquito repellent actions of the essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* and *Eucasimolyptus citriodora*: Evaluation and formulation studies. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, p. 766-773, 2012.

SOLTANI, S.; MAZLOUMI, S. H. A new empirical model to correlate solute solubility in supercritical carbon dioxide in presence of co-solvent. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 125, p. 79-87, 2017.

SOUSA, E. L. **Avaliação da atividade antitumoral de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae (Janaguba)**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPITELLER, G. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. **Mechanisms of ageing and development**, v. 122, p. 617-657, 2001.

SPOERKE, D. G.; MONTANIO, C. D.; RUMACK, B. H. Pediatric exposure to the houseplant *Synadenium grantii*. **Veterinary and human toxicology**, v. 27, n. 4, p. 283, 1985.



SURBURG, H.; PANTEN, J. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, properties and uses**. 5. ed. rev. WILEY-VCH, 2006.

TAWATSIN, A.; WRATTEN, S. D.; SCOTT, R. R.; THAVARA, U.; TECHADAMRONGSIN, Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **J. Vector Ecol.**, v. 26, p. 76-82, 2001.

TAYZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

THE PHEROBASE. Database of pheromones and semiochemicals, 2017. Disponível em: <[www.pherobase.com/database/kovats/kovatsindex.php](http://www.pherobase.com/database/kovats/kovatsindex.php)>. Acesso em: 31 de maio de 2019.

TONATO, D.; LUFT, L.; CONFORTIN, T. C.; ZABOT, G. L.; MAZUTTI, M. A. Enhancement of fatty acids in the oil extracted from the fungus *Nigrospora* sp. by supercritical CO<sub>2</sub> with ethanol as a cosolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 146, p. 180-188, 2019.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 33-43, 2014.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Setor de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade de Caxias do Sul. Disponível em: <<https://repositorio.ucs.br/xmlui/bitstream/handle/11338/564/Dissertacao%20Cristiane%20Menegotto%20Toscan.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 18 jul 2019.

TRABELSI, D.; AYDI, A.; ZIBETTI, A. W.; DELLA PORTA, G.; SCOGNAMIGLIO, M.; CRICCHIO, V.; MAINAR, A. M. Supercritical extraction from *Citrus aurantium amara* peels using CO<sub>2</sub> with ethanol as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 117, p. 33-39, 2016.

UQUICHE, E.; CAMPOS, C.; MARILLÁN, C. Assessment of the bioactive capacity of extracts from *Leptocarpha rivularis* stalks using ethanol-modified supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 147, p. 1-8, 2019.

UQUICHE, E.; CIRANO, N.; MILLAO, S. Supercritical fluid extraction of essential oil from *Leptocarpha rivularis* using CO<sub>2</sub>. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 307-314, 2015.

UZABAKILIHU, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 11, p. 3041-3045, 1987.

VARGAS, F. S.; OLIVEIRA, C. F.; GIRO, E. M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SPOLIDORIO, D. M. P.; COSTA, C. A. S. Efeito antimicrobiano e citotóxico do óleo

essencial de *Cymbopogon citratus* sobre células odontoblastóides. **Rev. Odontol. Bras. Central**, v. 19, 2010.

VICTORIA, F. N.; RADATZ, C. S.; SACHINI, M.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; MOTTA, A. S.; SILVA, W. P.; LENARDÃO, E. J. Further analysis of the antimicrobial activity of  $\alpha$ -phenylseleno citronellal and  $\alpha$ -phenylseleno citronellol. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 95-99, 2012.

WEI, L. S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iran J. Microbiol.**, v. 5, p. 147-152, 2013.

WILLIAMS, D. G. **The chemistry of essential oils**. Inglaterra: Micelle, 1996.

WIJESEKERA, R. O.; JAYEWARDENE, A. L.; FONSEKA, B. D. Varietal differences in the constituents of citronella oil. **Phytochemistry**, v. 12, n. 11, p. 2697-2704, 1973.

YOUSEF, R. T.; TAWIL, G. G. Antimicrobial activity of volatile oils. **Die Pharmazie**, v. 35, p. 698-701, 1980.

ZHANG, H. Q.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; BALASUBRAMANIAM, V. B.; DUNNE, C. P.; FARKAS, D. F.; YUAN, J. T. (Eds.). **Nonthermal processing technologies for food**. John Wiley & Sons, v. 45, 2011.

ZULKAFI, Z. D.; WANG, H.; MIYASHITA, F.; UTSUMI, N.; TAMURA, K. Cosolvent-modified supercritical carbon dioxide extraction of phenolic compounds from bamboo leaves (*Sasa palmata*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 123-129, 2014.

## ANEXO 1

TABELA - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE CITRONELA USANDO PROPANO COMPRIMIDO, scCO<sub>2</sub>, PROPANO COMPRIMIDO + ETANOL E scCO<sub>2</sub> + ETANOL

Pico	Composto	R <sup>I</sup> a		R <sup>I</sup> b								
				1	3	4	5	6	7	8	9	
1	Linalol	-	1101	0,146	0,141	0,189	0,204	0,231	0,237	0,155	0,147	
2	(3R)-(+)-Citronellal	-	-	4,352	2,540	3,749	10,472	12,259	12,742	10,213	10,301	
3	Citronellol	1230	1228	5,929	5,282	6,285	7,09	7,493	6,996	6,417	6,771	
4	Geraniol	1258	1240	8,751	8,429	9,537	10,732	11,713	10,320	9,815	10,250	
5	Citronelic acid	1308	1305	0,128	0,229	0,189	0,110	-	-	-	0,105	
6	2-(1-Hydroxy-1-methyl)-5-methylcyclohexanol	1318	-	0,920	1,081	1,143	1,006	1,017	0,777	0,913	1,051	
7	Eugenol	1330	1351	0,874	1,019	1,111	1,361	1,527	1,203	1,133	1,250	
8	Elemene	1348	-	3,269	2,538	2,987	3,063	2,864	3,244	2,593	2,639	
9	iso-β-elemene	1379	1379	0,129	-	0,113	0,112	0,115	0,142	0,133	0,117	
10	Geranyl acetate	1390	1383	0,180	0,339	0,285	-	-	0,113	0,120	0,141	
11	Citronellyl acetate	1393	1385	3,572	2,549	3,084	3,571	3,536	3,920	-	3,052	
12	β - Elemene	1395	1393	0,119	0,206	0,180	0,746	-	-	2,972	0,113	
13	(-)-β-Elemene	1399	1393	0,252	0,266	0,271	0,126	0,131	0,154	0,150	0,142	
14	Germacene	1503	1499	0,273	0,558	0,474	0,153	0,169	0,187	0,165	0,171	
15	γ-cadinene	1510	1513	0,252	0,160	0,195	0,204	0,216	0,234	0,227	0,224	
16	α-selinene	1518	1517	0,793	1,311	1,160	0,325	0,345	0,367	0,382	0,408	
17	β-elemol	1526	-	1,066	3,082	2,430	0,746	0,719	0,769	0,744	0,820	
18	3,7-seinadiene	1534	1542	0,124	-	0,122	-	-	-	-	-	
19	Elemol	1558	1547	20,926	19,422	19,742	-	21,441	20,796	18,652	20,911	
20	Germacrene D-4-ol	1584	1567	9,238	0,159	4,013	-	10,382	10,869	10,168	10,849	
21	Isoaromadendrene epoxide	1588	-	0,233	-	0,108	-	-	-	-	-	
22	Z-7- Hexadecenal	1596	-	0,354	0,182	0,203	-	0,305	0,252	0,496	0,530	
23	Methoxyeugenol	1602	-	0,381	0,268	0,220	-	0,543	0,496	0,527	0,524	
24	1,6-humulenedien-3-ol	1616	1619	0,914	0,286	0,293	0,999	0,916	0,875	1,188	1,493	

(continua)



(continuação)

Pico	Composto	RI <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Área relativa (%)										
				10	11	12	13	14	15					
1	Linalol	-	1101	0,133	0,162	0,249	-	0,116	0,452					
2	(3R)-(+)-Citronellal	-	-	9,533	10,502	3,718	39,441	2,602	0,305					
3	Citronellol	1230	1228	6,996	6,777	7,019	-	-	26,580					
4	Geraniol	1258	1240	11,351	10,303	11,483	0,118	8,186	13,850					
5	Citronellic acid	1308	1305	0,134	-	-	-	-	-					
6	2-(1-Hydroxy-1-methyl)-5-methylcyclohexanol	1318	-	1,005	0,840	0,680	6,266	1,171	-					
7	Eugenol	1330	1351	1,184	1,024	1,398	3,281	1,155	0,434					
8	Elemene	1348	-	2,644	2,618	2,165	0,106	2,362	3,046					
9	iso- $\beta$ -elemene	1379	1379	0,112	0,121	-	-	0,112	0,111					
10	Geranyl acetate	1390	1383	0,130	0,109	-	-	0,237	0,182					
11	Citronellyl acetate	1393	1385	3,049	3,157	3,070	-	2,440	2,734					
12	$\beta$ - Elemene	1395	1393	-	-	0,366	0,173	0,237	-					
13	(-)- $\beta$ -Elemene	1399	1393	0,167	0,141	0,163	-	0,263	0,212					
14	Germacene	1503	1499	0,190	0,171	-	-	0,348	0,426					
15	$\gamma$ -cadinene	1510	1513	-	0,230	0,164	-	0,174	0,202					
16	$\alpha$ -selinene	1518	1517	0,468	0,380	0,402	-	1,020	0,513					
17	$\beta$ -elemol	1526	-	0,858	0,749	1,017	-	1,821	2,841					
18	3,7-selinadiene	1534	1542	-	-	-	-	-	-					
19	Elemol	1558	1547	23,144	21,053	18,791	-	16,187	-					
20	Germacrene D-4-ol	1584	1567	11,286	11,034	8,748	-	4,551	2,401					
21	Isoaromadendrene epoxide	1588	-	0,193	-	0,347	-	0,173	0,123					
22	Z-7- Hexadecenal	1596	-	0,478	0,401	0,292	-	0,416	-					
23	Methoxyeugenol	1602	-	0,642	0,565	0,326	-	0,298	-					
24	1,6-humulenedien-3-ol	1616	1619	1,262	1,189	0,366	-	0,514	0,569					
25	$\gamma$ -eudesmol	1634	1630	1,034	1,021	0,360	-	1,543	0,319					
26	Cubenol	1643	1641	1,136	1,069	0,510	-	1,247	1,742					
27	$\beta$ -eudesmol	1648	1649	0,363	0,335	0,549	-	0,268	0,319					
28	$\alpha$ -Eudesmol	1656	1652	1,836	2,225	0,740	-	5,344	4,145					
29	$\alpha$ -bisabolol	1684	1683	-	-	-	-	0,148	-					

												(Conclusão)
<b>30</b>	2- Methyl-2-(3-methyl-oxobutyl)cyclohexanone	1913	-	0,254	0,197	0,163	-	0,491	-	-	-	-
<b>31</b>	(Z)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl acetate	1937	-	0,366	0,269	-	-	0,340	-	-	-	-
<b>32</b>	4-Isopropenyl-4,7-dimethyl-1-oxaspiro[2,5] octane	1960	-	-	0,145	0,149	-	0,325	-	-	-	-
<b>33</b>	Agatholic acid	2011	-	4,398	5,300	17,151	-	10,534	-	-	-	-
<b>34</b>	Thunbergol	2025	2094	1,278	1,441	1,549	0,195	1,273	-	-	-	-
<b>35</b>	Geranylgeraniol	2031	2026	0,123	0,140	0,157	-	-	-	-	-	-
<b>36</b>	4-(1-hydroxy-2-isopropyl-5-methylcyclohexyl)-3-butyln-2-one	2091	-	0,172	0,169	0,149	-	0,148	-	-	-	-
<b>37</b>	Phytol	2103	2114	0,359	0,419	0,425	2,204	0,706	-	-	-	-
<b>38</b>	ethyl linolenate	2132	2169	0,107	0,113	0,122	-	0,139	-	-	-	-
<b>39</b>	Ethyl Linalool	2423	-	0,132	0,161	0,231	-	0,740	-	-	-	-
<b>40</b>	Succinic acid, di (3,7-dimethyloct-6-em-1-yl) ester	2446	-	0,902	1,126	0,415	-	2,435	-	-	-	-
<b>41</b>	(E)-3,7-Dimethylocta-2,6- dienyl isobutyl carbonate	2475	-	0,886	1,159	0,357	-	1,769	-	-	-	-
<b>42</b>	vitamin E, $\alpha$ -Tocopherol	2844	-	-	-	0,114	0,448	0,116	0,135	-	-	-
<b>43</b>	Campesterol	3214	3231	-	-	-	-	-	0,128	-	-	-
<b>44</b>	Stigmasterol	3224	3247	-	-	-	-	-	0,197	-	-	-
<b>45</b>	$\beta$ -Sitosterol	3242	3290	-	-	-	-	-	1,376	-	-	-

RI: índice de retenção

a índice de retenção calculada

b índice de retenção consultada em Pherobase, Chemsbilder e Aboutabi

Condições das extrações: **1** (CP - 40 °C, 6 MPa), **3** (CP EtOH:matéria-prima 1:2 - 40 °C, 6 MPa), **4** (CP EtOH:matéria-prima 1:1 - 40 °C, 6 MPa), **5** (CP - 20 °C, 2 MPa), **6** (CP - 60 °C, 2 MPa), **7** (CP - 60 °C, 10 MPa), **8** (scCO<sub>2</sub> - 40 °C, 12 MPa), **9** (scCO<sub>2</sub> - 40 °C, 20 MPa), **10** (scCO<sub>2</sub> - 40 °C, 9 MPa), **11** (CP - 20 °C, 10 MPa), **12** (CP - 40 °C, 6 MPa), **13** (Soxhlet - Etanol), **14** (Soxhlet - hexano), **15** (scCO<sub>2</sub> EtOH:matéria-prima 1:1 - 40 °C, 20 MPa).