



UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO CAMPUS DE
ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANDRÉIA DALLA ROSA

EXTRAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS DA FOLHA DE OLIVEIRA
(*Olea Europaea*) UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO

ERECHIM, RS

2018

ANDRÉIA DALLA ROSA

**EXTRAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS DA FOLHA DE OLIVEIRA
(*Olea europaea*) UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

Orientadora: Dra. Geciane Toniazzi Backes

Orientador: Dra. Eunice Valduga

Orientador: Dr. Elton Franceschi

ERECHIM, RS

2018

ANDRÉIA DALLA ROSA

**EXTRAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS DA FOLHA DE OLIVEIRA
(*Olea europaea*) UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

Erechim, 30 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Geciane Toniazzo Backes, D.Sc.
Orientadora URI Erechim

Prof. Alexander Junges, D.Sc.
URI Erechim

Prof. Eunice Valduga, D.Sc.
Orientadora URI Erechim

Prof. Marcos Corazza D.Sc.
UFPR – Curitiba

Prof. Elton Franceschi, D.Sc.
Orientador – UNIT Aracajú

Prof. Nei Fronza D.Sc.
IFC – Campus Concórdia

Prof. Wagner Luíz Priamo, D.Sc.
IFRS - Campus Erechim

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigas (os) pelo apoio e incentivo.

Ao Instituto Federal Catarinense pela concessão do afastamento integral para realização da Pós Graduação ao nível de doutorado.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões de Erechim e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

À CAPES pela concessão da bolsa taxa que permitiu a realização dos estudos.

Aos professores orientadores Dra. Geciane Toniazzi Backes, Dra. Eunice Valduga e Dr. Elton Franceschi e aos professores dos cursos de Engenharia de Alimentos pelo compartilhamento do conhecimento e empenho dedicado a nossa pesquisa.

À Universidade Tiradentes de Aracajú, aos professores e alunos do ITP e NUESC em especial o prof Elton e a Manuela pelo auxílio, atenção, dedicação e disponibilidade de estrutura.

Ao professor Marcos L. Corazza da Universidade Federal do Paraná, ao prof Marcelo Lanza e Rodrigo Battisti da Universidade Federal de Santa Catarina, ao prof Nei Fronza do Instituto Federal Catarinense pelo auxílio em análises.

Aos professores Alexander, Cláudio e Ilizandra e as colegas Alana, Aline e Maiara pelo auxílio com equipamentos e análises.

A Epagri unidade de Chapecó e ao Dorli Da Croce e Anacleto Canan pelo fornecimento de matéria prima.

A todos que mesmo não citados, me auxiliaram em algum momento, meu reconhecimento e gratidão.

RESUMO

O objetivo da presente tese de doutorado foi estudar os processos de extração em alta pressão de compostos de folha de oliveira (*Olea europaea*) utilizando líquido pressurizado (PLE) e CO₂ sub e supercrítico (EFS) como solvente, bem como o encapsulamento do extrato utilizando CO₂ como antisolvente. A extração com PLE foi conduzida isobaricamente (10,3MPa), variando a temperatura (20, 40 e 60°C) e o solvente (acetato de etila, acetona, etanol, etanol:água - 80:20, v:v), a pressão (10,3MPa), vazão do solvente (2mL.min⁻¹) e o tempo (110min) foram constante. Nas extrações com CO₂ supercrítico a temperatura foi variada entre 20 e 60°C e a pressão entre 8.0 e 25MPa, mantendo-se constante o tempo (210min.) e a vazão de CO₂ de 2mL.min⁻¹. Nas extrações foi avaliado o rendimento, o comportamento cinético de transferência de massa e a modelagem matemática das curvas globais de extração utilizando os modelos Sovová e Pardo-Castaño. Nos extratos avaliou-se a atividade antioxidante (DPPH), fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e flavonoides totais. O maior rendimento global em extrato na PLE foi de 30,9% a 60°C empregando etanol:água (80:20, v:v) como solvente e na EFS foi de 0,68% empregando CO₂, 60°C e 25MPa. Ao empregar PLE, com etanol a 60°C obteve-se a maior concentração de compostos fenólicos totais (386,42mg AG.g⁻¹ de extrato), flavonoides (33,43mgCAT.g⁻¹ de extrato), oleuropeína (73,65mg.g⁻¹ de extrato) e atividade antioxidante (IC₅₀) de 0,47mg.mL⁻¹. O extrato obtido por PLE (etanol, 60°C e 10,3MPa) foi submetido encapsulado em biopolímero utilizando a técnica de *SEDS* com dióxido de carbono supercrítico como antissolvente. A vazão de antisolvente foi variada entre 20 e 50mL.min⁻¹, diclorometano como solvente orgânico, poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) como polímero (concentração entre 10 e 30mg.mL⁻¹), na vazão de 0,75 a 1mL.min⁻¹ da solução e com temperatura na câmara de precipitação variando de 40 a 60°C. As variáveis e suas faixas foram investigadas empregando um planejamento fatorial 2⁴⁻¹. As partículas geradas foram caracterizadas via análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR) e a estabilidade acompanhada ao longo do tempo. A maior eficiência de encapsulamento (EE) foi de 86% empregando temperatura de 60°C, 1mL.min⁻¹ de vazão da solução, concentração de 30mg de polímero.mL⁻¹ de solvente e vazão de CO₂ de 50mL.min⁻¹. As partículas apresentam tamanho médio de 0,30 a 0,71µm, sendo o menor tamanho de partícula (0,30µm) nas condições de 60°C, 0,5mL.min⁻¹ vazão da solução, 10mg.mL⁻¹ concentração de polímero e 50mL.min⁻¹ de vazão de CO₂. Conforme análise de DSC e FTIR, houve a incorporação dos extratos ao polímero. Após 210 dias de análise de estabilidade das partículas geradas, as mesmas mantiveram-se praticamente estável.

Palavras-chave: Extração com líquido pressurizado (PLE). Folha oliveira. Estabilidade. Dispersão da Solução Aumentada por Fluido Supercrítico.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to study the high pressure extraction processes of olive leaf (*Olea europaea*) using pressurized liquid (PLE) and subcritical and supercritical CO₂ (SFE) as solvent, as well as the encapsulation of the extract using CO₂ as antisolvent. The extraction with PLE was conducted isobarically (10.3 MPa), varying the temperature (20, 40 and 60°C) and the solvent (ethyl acetate, acetone, ethanol, ethanol:water - 80:20, v:v), pressure (10.3MPa), solvent flow (2mL.min⁻¹) and time (110 min) were constant. In the extractions with supercritical CO₂ the temperature was varied between 20 and 60°C and the pressure between 8.0 and 25MPa, keeping the time constant (210 min) and the CO₂ flow of 2mL.min⁻¹. In the extractions, yield, kinetic mass transfer behavior and mathematical modeling of global extraction curves were evaluated using the Sovová and Pardo-Castaño models. In the extracts the antioxidant activity (DPPH), total phenolics (Folin-Ciocalteu) and total flavonoids were evaluated. The highest total extract yield in the PLE was 30.9% at 60°C employing ethanol: water (80:20, v: v) as the solvent and in the SFE was 0.68% using CO₂, 60°C and 25MPa. The highest concentration of total phenolic compounds (386.42mgAG.g⁻¹ extract), flavonoids (33.43mgCAT.g⁻¹ extract), oleuropein (73.65mg.g⁻¹ extract) and antioxidant activity (IC₅₀) of 0.47mg.mL⁻¹. The extract obtained by PLE (ethanol, 60°C and 10.3MPa) was encapsulated in biopolymer using the *SEDS* technique with supercritical carbon dioxide as antisolvent. The antisolvent flow rate was varied between 20 and 50mL.min⁻¹, dichloromethane as organic solvent, poly(hydroxybutyrate co-valerate) (PHBV) as polymer (concentration between 10 and 30mg.mL⁻¹), in the 0.75 to 1mL.min⁻¹ of the solution and with temperature in the precipitation chamber varying from 40 to 60°C. Variables and their ranges were investigated using a factorial planning 2⁴⁻¹. The particles generated were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and stability monitored over time. The best encapsulation efficiency (EE) was 86% using a temperature of 60°C, 1mL.min⁻¹ of solution flow, 30 mg polymer concentration.mL⁻¹ of solvent and CO₂ flow of 50mL.min⁻¹. The particles had a mean particle size of 0.30 to 0.71 µm, the smallest particle size (0.30 µm) under the conditions of 60°C, 0.5mL.min⁻¹ solution flow, 10 mg.mL⁻¹ polymer concentration and 50mL.min⁻¹ CO₂ flow rate. According to DSC and FTIR analysis, the extracts were incorporated into the polymer. After 210 days of stability analysis of the particles generated, they remained practically stable.

Keywords: Extraction pressurized liquid (PLE). Bioactivity. Olive leaf. Stability. Dispersion of the Solution Increased by Supercritical Fluid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1- Estabilização do radical livre DPPH	22
Figura 3.2- Diagrama de fases pressão-densidade do dióxido de carbono.	23
Figura 3.3- Diagrama de pressão-volume/molar para o etanol utilizando a equação de estado de Peng – Robinson (1976).....	26
Figura 4.1- Unidade extratora com dióxido de carbono.....	38
Figura 4.2- Unidade extratora com líquido pressurizado.	40
Figura 4.3- Rendimento das extrações com dióxido de carbono de extratos de folha de oliveira em diferentes pressões e temperaturas.....	51
Figura 4.4- Diagrama de Pareto com os efeitos dos parâmetros das variáveis independentes sobre o rendimento das extrações com fluído sub e supercrítico.	52
Figura 4.5- Diagrama de Pareto com os efeitos dos parâmetros das variáveis independentes sobre FT (8.a), flavonoides (8.b) e Aa (8.c) das extrações com fluído sub e supercrítico.	56
Figura 4.6- MEV folhas de oliveira antes da extração (a) e depois da extração com fluído supercrítico a 60°C e 16,5MPa (b).....	57
Figura 4.7- Modelagem das curvas de extração com EFS utilizando os modelos Pardo-Castaño (a e b) e Sovová (c e d) agrupados pela pressão em diferentes temperaturas.	60
Figura 4.8- Rendimento da extração com PLE de extratos de folha de oliveira com diferentes solventes e temperaturas.....	62
Figura 4.9- MEV de fragmentos foliares de oliveira antes da extração (a) e após a extração com acetato de etila (b), acetona (c), etanol (d) e Etanol:água(80:20, v:v) (e) a 10,3MPa e 60°C. .	66
Figura 4.10- Modelagem das curvas de extração com PLE utilizando o modelo Sovová agrupados por solventes (a) acetato de etila, (b) Acetona, (c) Etanol e (d) Etanol:água e em diferentes temperaturas.....	71
Figura 4.11- Modelagem das curvas de extração com PLE utilizando o modelo Pardo-Castaño agrupados por solventes (a) acetato de etila, (b) acetona, (c) etanol e (d) etanol:água (80:20v:v) e em diferentes temperaturas.	72
Figura 5.1- Diagrama esquemático do aparato experimental de precipitação e encapsulamento utilizando extratos de folha de oliveira e técnica SEDS.....	78
Figura 5.2- Morfologia das partículas obtidas do PHBV precipitado puro (Branco) (a) e ensaios de coprecipitação dos tratamentos 1 a 11(b a l) respectivamente, com condições experimentais de pressão fixa de 10MPa e concentração de extrato de 10mg.mL ⁻¹	87

Figura 5.3- Distribuições de tamanho de partículas dos ensaios de coprecipitação dos tratamentos 1, 2, 3 e 5(a), tratamento 4 (b) e tratamentos 6, 7, 8, 9, 10 e 11(c) e com condições experimentais de pressão fixa de 10MPa e concentração de extrato de 10mg.mL ⁻¹	90
Figura 5.4- Diagrama de Pareto com os efeitos estimados sobre o tamanho médio das partículas coprecipitadas de PHBV com extratos de folha de oliveira.	91
Figura 5.5- Curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) obtidas para determinação das temperaturas de fusão e entalpia dos ensaios de coprecipitação dos tratamentos 1 a 11(a a k) respectivamente, PHBV Puro (l) e extrato puro (m) com condições experimentais de pressão fixa de 10MPa e concentração de extrato de 10mg.mL ⁻¹	92
Figura 5.6- Diagrama de Pareto com os efeitos estimados sobre as análises de DSC das partículas coprecipitadas de PHBV com extratos de folha de oliveira.....	96
Figura 5.7- Espectros de FTIR do PHBV puro antes do encapsulamento, após o encapsulamento sem extrato (branco) (a), extrato de folha de oliveira puro (b) e tratamento 8, extrato puro e PHBV (c).....	98
Figura 5.8- Acompanhamento da estabilidade dos extratos de folha de oliveira encapsulados Tratamento 7, 8 e extrato bruto via análise de Aa (a), FT e flavonoides (b).....	100
Figura A.1- Curvas de calibração com padrão catequina para análises de flavonoides (a) e com padrão ácido gálico para análises de fenólicos (b).	123
Figura A.2- Curva de calibração com padrão oleuropeína para análises de HPLC.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^3 para EFS.	37
Tabela 4.2- Rendimento, Aa, flavonoides e FT dos extratos de folha de oliveira com EFS...	52
Tabela 4.3- Condições sub e supercrítica de densidade do CO_2 em diferentes pressões e temperaturas.....	53
Tabela 4.4- Rendimento, densidade do CO_2 e solubilidade dos extratos de folhas de oliveira com fluido sub e supercrítico.....	58
Tabela 4.5- Parâmetros ajustados para o modelo Sovová para extrações com CO_2 sub e supercrítico.	61
Tabela 4.6- Parâmetros ajustados para o modelo cinético Pardo-Castaño para extrações com CO_2 sub e supercrítico.	61
Tabela 4.7- Rendimento, IC_{50} , teores de flavonoides, FT e oleuropeína dos extratos da folha de oliveira obtidos por PLE.....	63
Tabela 4.8- Parâmetros ajustados para o modelo cinético Pardo-Castaño nas extrações com PLE	67
Tabela 4.9- Parâmetros ajustados para o modelo Sovová nas extrações com PLE.....	70
Tabela 5.1- Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^{4-1} para o processo de coprecipitação de extratos de folha de oliveira.....	76
Tabela 5.2- Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} (valores reais e codificados) e respostas em rendimento (R), carga teórica (CT), porcentagem de encapsulamento (PE), eficiência de encapsulamento (EE), fenólicos totais (FT), atividade antioxidante (Aa), flavonoides (F), temperatura de fusão, entalpia, tamanho mínimo ($X_{\min}$), tamanho máximo ($X_{\max}$), tamanho médio ($\bar{x}$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) das partículas coprecipitadas de PHBV dos extratos de folha de oliveira por SEDS.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa: atividade antioxidante

AG: ácido gálico

ASES: extração de solvente aerosol

CAT: catequina

CV: coeficiente de variação

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DSC: calorimetria exploratória diferencial

EE: eficiência encapsulamento

EFS: extração com fluído supercrítico

Eq.mg: equivalente miligrama

FT: fenólicos totais

FTIR: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

GPC: cromatografia de permeação em gel

GRAS: geralmente reconhecido como seguro

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HV: hidroxivalerato

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MPa: Mega Pascal

PE: percentual encapsulamento

PGSS: processos de solução saturada de gás

PHBV: poli-(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)

PLE: extração com líquido pressurizado

RESS: rápida expansão da solução supercrítica

RMN-1H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SAA: atomização assistida supercrítica

SAS: antissolvente supercrítico

SEDS: dispersão da solução melhorada por fluído supercrítico

T_{Cer}: taxa constante de extração

T_{Fer}: taxa de queda da extração

TGA: análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO GERAL	18
2.1 Objetivos Específicos.....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 A oliveira e os compostos bioativos	19
3.2 Obtenção de compostos ativos em extração com fluido sub e supercrítico (EFS)	22
3.3 Obtenção de compostos ativos em extração com líquido pressurizado (PLE).....	25
3.4 Modelagem matemática	27
3.4.1 Modelo Sovová	28
3.4.2 Modelo Pardo-Castaño	29
3.5 Nanotecnologia e nanociência aplicada à produção de partículas utilizando fluido sub e supercrítico	29
3.6 Nanoencapsulação de produtos naturais.....	32
3.7 Características gerais do PHBV	34
4 CAPÍTULO I - EXTRAÇÃO	35
4.1 MATERIAL E MÉTODOS CAPÍTULO I	36
4.1.1 Reagentes.....	36
4.1.2 Coleta e preparo das amostras de folha oliveira.....	36
4.1.3 Extração com fluido sub e supercrítico (EFS)	37
4.1.3.1 Condições de EFS	37
4.1.3.2 Aparato experimental com EFS	37
4.1.3.3 Curvas de extração e cálculo de rendimento com EFS.....	39
4.1.4 Extração com líquido pressurizado (PLE)	39
4.1.4.1 Condições de PLE.....	40
4.1.4.2 Aparato experimental para PLE.....	40
4.1.4.3 Curvas de extração e cálculo de rendimento com PLE.....	41
4.1.5 Extração com solvente a pressão ambiente (convencional)	42
4.1.6 Modelagem matemática aplicada a EFS e PLE	42
4.1.6.1 Modelo Sovová	43
4.1.6.2 Modelo Pardo-Castaño	45
4.1.7 Metodologias analíticas aplicada a EFS e PLE.....	48

4.1.7.1 Preparo dos extratos.....	48
4.1.7.2 Atividade antioxidante (Aa).....	48
4.1.7.3 Fenólicos Totais (FT).....	49
4.1.7.4 Flavonoides	49
4.1.7.5 Quantificação oleuropeína	50
4.1.7.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50
4.1.8 Tratamento estatístico	50
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO CAPÍTULO I.....	51
4.2.1 Extração com EFS	51
4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com EFS	57
4.2.3 Modelagem matemática das extrações com EFS	58
4.2.4 Extração com PLE e extração convencional	62
4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com PLE.....	65
4.2.6 Modelagem matemática com PLE	67
4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS CAPÍTULO I.....	73
5 CAPÍTULO II - ENCAPSULAMENTO	74
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS CAPÍTULO II.....	75
5.1.1 Reagentes, caracterização do PHBV e definição do extrato a ser encapsulado.....	75
5.1.2 Preparo das soluções e variáveis de coprecipitação	76
5.1.3 Aparato experimental para coprecipitação.....	77
5.1.4 Análise de rendimento, carga teórica, percentual e eficiência de encapsulamento	79
5.1.5 Análise de Aa, fenólicos totais e flavonóides.	80
5.1.6 Caracterização das partículas geradas	80
5.1.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e determinação do tamanho de partícula	80
5.1.6.2 Calorimetria exploratória diferencial - DSC.....	81
5.1.7 Estabilidade dos extratos encapsulados.....	82
5.1.8 Análise estatística.....	82
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO CAPÍTULO II	83
5.2.1 Caracterização do PHBV e do extrato utilizado para o encapsulamento	83
5.2.2 Análise de rendimento, carga teórica, percentual e eficiência de encapsulamento	84
5.2.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)	97

5.2.6 Estabilidade do extrato encapsulado	99
5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS CAPÍTULO II	101
6 CONCLUSÕES.....	102
7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
APÊNDICE I.....	123
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	125

APRESENTAÇÃO

Os termos “tecnologias limpas” ou “tecnologias verdes” ou ainda “tecnologias sustentáveis” são mencionados com frequência em vários artigos e estudos na literatura. Esta menção está relacionada ao desenvolvimento crítico das pessoas pela busca do desenvolvimento produtivo sem afetar o meio ambiente e os recursos naturais.

Assim, estratégias que visam o desenvolvimento de processos mais brandos, com baixa geração de resíduos e com aproveitamento de subprodutos têm despertado interesse de pesquisadores nas diversas áreas do conhecimento.

Neste contexto destaca-se a utilização de um subproduto, como a folha de oliveira proveniente da poda, como alternativa para obtenção de extratos naturais, com o objetivo destes se tornarem uma alternativa rentável, que as propriedades funcionais sejam mantidas e que sejam passíveis de aplicação em escala industrial.

A obtenção dos extratos fenólicos oriundos da folha de oliveira para aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos é facilitada por processos tecnológicos de alta pressão como extração por fluido supercrítico (EFS) e extração com líquido pressurizado (PLE) que utilizam solvente a base de etanol, viabilizando a sua utilização na indústria.

Além da obtenção, existem técnicas à alta pressão, que possibilitam a criação de barreiras de proteção que porlongam a vida útil e qualidade destes extratos através do encapsulamento.

Com intuito de reunir todas estas características em um único estudo, a presente Tese de Doutorado será dividida em dois capítulos distintos, a saber:

Capítulo I: Obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) via extração com fluido sub e supercrítico (EFS) e com líquido pressurizado (PLE) e modelagem da cinética de extração;

Capítulo II: Formação de micropartículas de extratos de folha de oliveira (*Olea europaea*) pela técnica de Dispersão da Solução Aumentada por Fluido Supercrítico (SEDS), utilizando dióxido de carbono (CO₂) como antisolvente e PHBV como agente encapsulante.

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea*) na etapa de colheita e poda, gera um volume considerável de biomassa em forma de folhas e ramos, sendo considerados como subprodutos ou resíduos agroindustriais, os quais poderão agregar valor se reaproveitadas, como na extração de compostos bioativos. Há relatos que as mesmas possuem alguns compostos fenólicos tais como, oleuropeína, verbascoside, tirosol e hidroxitirosol, com propriedades antioxidantes, benéficas a saúde (ABAZA et al., 2011; GUINDA et al., 2015; KIRITSAKIS et al., 2017).

Neste contexto destaca-se a utilização deste subproduto, a folha de oliveira, que, além das vantagens econômicas associadas à produção, colheita e processamento das azeitonas e do azeite de oliva, possibilita a obtenção do extrato rico em compostos fenólicos através de técnicas de extração não tradicionais.

A aplicação de técnicas de extração possibilita a agregação de valor à matéria prima, reaproveitamento de subprodutos, geração de empregos durante todo o seu ciclo produtivo, por isso a necessidade da realização de estudos sobre os mais diversos âmbitos buscando torná-la uma alternativa rentável e promissora ao meio acadêmico, à indústria e aos agricultores.

Além disso, a crescente preocupação dos consumidores com o uso de substâncias sintéticas na indústria de alimentos tem despertado o interesse em pesquisas na área de processamento de biomateriais e no controle da poluição para o desenvolvimento de tecnologias limpas.

Uma tecnologia limpa de crescente interesse é a extração com fluido supercrítico (EFS), que tem uma aplicação potencial na área de produtos naturais, intensamente investigada durante as duas últimas décadas (ARMENTEROS et al., 2016; ZHONG e SHAHIDI, 2015; DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014; BOLAÑOS et al., 2006; ARAÚJO et al., 2000).

A EFS apresenta-se como uma alternativa para a obtenção de compostos de alto valor agregado, sem a necessidade de uma etapa adicional para a remoção de solventes, como é comum nos processos convencionais de extração com solventes, isso porque uma vez encerrado o procedimento de extração, com a despressurização do sistema, o CO₂ se transforma em gás, enquanto que os compostos extraídos são precipitados (HERRERO et al., 2013).

A extração com fluido supercrítico é uma tecnologia sustentável que apresenta uma ampla gama de aplicações tais como extração e purificação de compostos bioativos, aromas e fragrâncias, alimentos nutraceuticos e funcionais, óleos essenciais, técnicas analíticas como cromatografia, micro e nano precipitação, produtos farmacêuticos entre outros (LINDY, 2015;

MEIRELES, 2009; ROSTAGNO; PRADO, 2013; SHARIF et al., 2014, WILLIAMS; CLIFFORD, 2000).

No entanto, o CO₂ possui baixa polaridade, tornando inviável a extração de compostos polares. Este inconveniente pode ser superado empregando pequenas quantidades de modificadores ou co-solventes polares (1-10%) (MACHADO et al., 2013; HERRERO et al., 2013) ou ainda pela substituição total do CO₂ por solventes líquidos pressurizados. Desta forma, a extração com líquido pressurizado (PLE) é uma alternativa interessante principalmente por permitir extração rápida, com consumo reduzido de solvente, facilidade de automação, menor impacto ambiental e pode ser realizada numa vasta gama de condições operacionais (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013; HERRERO et al., 2013).

O método da PLE baseia-se na utilização de solventes submetidos a altas pressões e temperaturas, abaixo dos seus pontos críticos, de modo que o estado líquido do solvente é mantido durante a totalidade da extração (SUMERE et al., 2018; HERRERO et al., 2013).

Nestas condições, a PLE tem sido utilizada na extração de vários compostos bioativos e nutracêuticos, tais como os flavonóides, antocianinas, polifenóis e vários compostos antioxidantes a partir de matrizes naturais como plantas, frutas, vegetais e micro-organismos, com proporções de princípios ativos maiores em comparação com Soxhlet, além do tempo de extração reduzido (AZMIR et al., 2013; GUINDA et al., 2015; HU et al., 2011; MACHADO et al., 2015; OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

Diante das hipóteses apresentadas anteriormente nos processos de extração, torna-se razoável a aplicação da modelagem matemática, porque assim, podemos descrever matematicamente os fenômenos envolvidos, ampliando a compreensão dos mesmos e, a partir deles, ajustar parâmetros com os quais se possam simular processos de extração em outras escalas e condições operacionais.

Além de ser um vegetal abundante em biomassa, a folha de oliveira contém vários compostos fenólicos, secoiridóides e flavonoides passíveis de extração, que têm forte atividade antioxidante que oferecem benefícios à saúde (RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015), entretanto, o uso comercial destes compostos, no geral, apresentam algumas limitações, devido alta instabilidade frente a diversos fatores como luz, ar e enzimas oxidativas (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Para amenizar estas limitações, aumentar a eficácia, a preservação, estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade e minimizar o gosto desagradável destes compostos, técnicas

de encapsulamento são aplicadas para aliviar essas deficiências (DE MELO, SILVESTRE; SILVA, 2014; MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

A microencapsulação é uma técnica de revestimento de materiais bioativos sob a forma de micro e nano partículas, com a finalidade de oferecer proteção ou controlar a liberação de compostos encapsulados através da construção de uma barreira entre o componente particulado e o ambiente (GANJE et al., 2016; ESFANJANI et al., 2015).

Neste sentido, a tecnologia com fluido supercrítico surge como importante alternativa aos processos tradicionais para a produção de micro e/ou nano partículas, por oferecer vantagens na melhoria da qualidade do produto, aspectos operacionais e ambientais (MONTES et al., 2013).

As principais técnicas baseadas em fluido supercrítico para a produção de micro ou nanopartículas podem ser classificadas em Rápida Expansão de Soluções Supercríticas (RESS), processo Antissolvente Supercrítico (SAS), processo Antissolvente Gasoso (GAS), Partículas de soluções saturadas de gás (PGGS) e Extração supercrítica de uma emulsão (SFEE) (SALDAÑA; COIMBRA; CARDOZO-FILHO, 2015; JIN et al., 2012).

A técnica “*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*” (SEDS) ou dispersão da solução melhorada por fluidos supercríticos consiste em copulverização da solução de substrato e uma corrente de dióxido de carbono supercrítico, através de bocais apropriados. É uma versão modificada da técnica SAS e a diferença entre ambos os métodos é a forma do contato entre a mistura soluto-solvente e do antissolvente (PRIAMO et al., 2011; JUNG; PERRUT, 2001).

Associada à técnica de precipitação, a escolha do polímero adequado, pode auxiliar no atendimento às exigências anteriormente relatadas, a citar o poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) – PHBV, um poliéster biodegradável atóxico, biocompatível, produzido a partir de fontes de carbono por uma grande variedade de micro-organismos em condições de crescimento favoráveis (JUN et al., 2017; COSTA et al., 2007; RIEKES et al., 2011)

Desta forma, novas estratégias de utilização desses subprodutos são desenvolvidas de acordo com as novas tendências de consumo, contextualizando o objetivo da presente Tese de investigar a extração e encapsulamento de compostos da folha de oliveira (*Olea europaea*), utilizando fluido pressurizado.

2 OBJETIVO GERAL

- Extração e encapsulamento de compostos da folha de oliveira (*Olea europaea*) utilizando fluido pressurizado.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da pressão e temperatura no rendimento da extração e na concentração de compostos fenólicos pela técnica de EFS;
- Avaliar o efeito da temperatura e do tipo de solvente na extração com líquido pressurizado sobre o rendimento de extração e composição do extrato obtido;
- Avaliação da atividade antioxidante, fenólicos totais e flavonoides dos extratos obtidos visando selecionar a melhor condição para encapsulamento do extrato de folha de oliveira;
- Realizar modelagem matemática das curvas cinéticas de extração obtidas;
- Investigar o efeito de variáveis de processo (concentração de polímero, vazão de antisolvente, vazão de solução e temperatura) no percentual e eficiência de encapsulamento do extrato da folha de oliveira em PHBV empregando a técnica SEDS;
- Realizar a caracterização físico-química das partículas obtidas;
- Avaliar a estabilidade do extrato de folhas de oliveira encapsulado em biopolímero em termos de concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante;

3 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção foi dedicada à compilação de alguns aspectos teóricos apresentados por vários autores relacionados às folhas de oliveiras, como biodisponibilidade de compostos ativos, composição, efeitos benéficos entre outros, assim como as metodologias para análises de atividade antioxidante, FT e flavonoides dos extratos obtidos pelos métodos de extração por EFS e PLE, avaliando as variáveis de processo que podem influir no rendimento e na atividade antioxidante, FT e flavonoides.

Na sequência da literatura são apresentadas as diferentes técnicas de obtenção de micro e nano partículas que utilizam fluidos sub ou supercríticos para precipitação ou cristalização dos mais diversos tipos de materiais orgânicos e inorgânicos e como estas técnicas podem influenciar na preservação e disponibilidade do composto ou mistura de compostos em estudo. Também apresentará uma breve explanação sobre nanotecnologia, técnicas empregadas para produção de microcápsulas utilizando fluídos supercríticos e estudos experimentais de micro e nano encapsulamento de compostos fenólicos.

3.1 A oliveira e os compostos bioativos

A oliveira (*Olea europaea*) é uma árvore característica do Mediterrâneo, onde quase 98% de todas as oliveiras são plantadas, consiste em uma árvore perene de vida longa, desenvolve-se preferencialmente em lugares com clima subtropical, mas apenas *Olea europaea* produz frutos comestíveis e, durante o cultivo, necessita de poda para o desenvolvimento de novos brotos para diminuir o sombreamento da planta (JILANI et al., 2016; ABAZA et al., 2015; KAILIS; HARRIS, 2007; TANILGAN et al., 2007; MARTINS, 2008).

No cultivo da oliveira, a etapa de colheita e poda geram um volume considerável de biomassa em forma de folhas e ramos da oliveira, sendo considerados como subprodutos ou resíduos agroindustriais, fornecendo no ano cerca de 6 milhões de toneladas de biomassa somente na Espanha, a maioria dos quais são destruídas imediatamente para evitar pragas nos olivais e eliminar dificuldades adicionais no manejo agrícola (SAHIN; BILGIN, 2017; GUINDA et al., 2015; ABAZA et al., 2015; LAPUERTA et al., 2007; RADA et al., 2007; BOLAÑOS et al., 2006; BOAUZIZ; SAYADI, 2005).

Parte desta matéria orgânica é utilizada no confinamento de ovinos e caprinos, outras aplicações possíveis é o uso de extrato de folhas de oliveira para amenizar danos oxidativos em alimentos e na saúde humana na forma de fitoquímicos, sendo assim as propriedades benéficas

das folhas aliadas à necessidade de valorizar estes produtos conduziram a novas investigações que visam averiguar o seu real valor e eventual exploração industrial (XYNOS et al., 2014; GONÇALVES, 2009; BOUAZIZ; SAYADI, 2005).

As folhas de oliveiras, contém vários compostos fenólicos, tal como secoiridóides e flavonoides, que têm forte atividade antioxidante (LANGUERRE et al., 2009; LEE et al., 2009; BOUAZIZ; SAYADI, 2005) na literatura, outros benefícios também foram relatados, tais como antimicrobianos, antifúngicos, leveduras e outros parasitas, anti-inflamatórios e anti-viral (TALHAOUI et al., 2016; GONÇALVES, 2009; ABAZA et al., 2011).

Os efeitos benéficos anteriormente citados, estão associados à biodisponibilidade dos compostos fenólicos e seus derivados, que fazem parte da família de secoiridóides, conhecidos pela sua capacidade de sequestrar o peróxido de hidrogênio e definidos como sendo compostos mais prevalentes representados pela forma dialdeídica do ácido decarboximetil elenólico ligado ao hidroxitirosol ou tirosol, isômeros das agliconas oleuropeína e ligstrosídeo com atividade antioxidante, que atuam doando hidrogênio aos radicais alquila e peroxila gerados pela oxidação lipídica, com consequente formação de derivados estáveis (DI MAIO et al., 2013; GONÇALVES, 2009).

Geralmente, a oleuropeína é o composto fenólico mais proeminente em azeite e pode atingir concentrações de até 140 mg.g⁻¹ em uma base de matéria seca em azeitonas imaturas (OMAR, 2010) e nas folhas pode ter uma concentração de 19% (JIMÉNEZ et al., 2017).

A extração dos compostos ativos de plantas e ervas é uma das etapas mais críticas em produtos naturais. Muitos parâmetros afetam o processo de extração, sendo que a eficiência da extração depende da natureza da matriz da amostra, do analito a ser extraído e da sua localização dentro da matriz. Não existe um protocolo específico para cada fonte de polifenóis naturais, mas estes métodos devem ser projetados e otimizados a fim de atender esta demanda (SAHIN; SAMLI, 2013).

Existem vários estudos sobre métodos de extração de polifenóis em diferentes matrizes, sendo que os estudos aplicados a extratos de folha de oliveira foram realizados com extração com fluído supercrítico, processo de extração assistida por micro-ondas, extração líquido-líquido, extração com pressão reduzida com auxílio de ultrassom (URPE) e extração com líquido pressurizado (PLE) (XYNOS et al., 2014; XIE et al., 2013; SAHIN; SAMLI, 2013; JAPÓN-LUJÁN; LUQUE DE CASTRO, 2008 e 2006; JAPÓN-LUJÁN; LUQUE-RODRÍGUEZ; LUQUE DE CASTRO, 2006; LE FLOCH, 1998).

Os ensaios utilizados para a análise de compostos fenólicos são geralmente classificados para medida do conteúdo total de compostos fenólicos ou por quantificação de um grupo ou classe específica de compostos fenólicos, que podem ser influenciados pela natureza química do analito. Além disso, pode ser influenciado pelo método utilizado, a seleção de padrões e a presença de substâncias interferentes, sendo que na maioria dos casos o método de Folin-Ciocalteu é preferível em relação aos outros métodos (DAÍ; MUMPER, 2010; NACZK; SHAHIDI, 2006; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

O método Folin-Ciocalteu baseia-se na reação com formação de um cromóforo azul constituído por um complexo fosfomolibdênio-fosfotúngstico, onde a absorção máxima dos cromóforos depende da concentração de compostos fenólicos, do excesso da solução alcalina e na concentração de outros solventes que não seja a água. Na reação pode resultar em precipitados e alta turvação, tornando a espectrofotometria impossível, para resolver este problema normalmente, é adicionado sais de lítio no reagente (o qual diminui a turbidez e melhora a resolução dos resultados) ou a diminuição da concentração de carbonato de sódio quando concentrações de álcool superiores a 1 % são utilizadas (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; DAÍ; MUMPER, 2010; CICCIO et al., 2009).

As folhas de oliveira são uma fonte robusta de flavonoides, independentemente dos parâmetros de amostragem como a cultivar de oliveira, idade da folha ou a data de amostragem (RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015).

Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular, contendo quinze átomos de carbono dispostos na configuração $C_6-C_3-C_6$, podem ocorrer em suas fontes naturais nas formas livre (aglicona) ou na forma hidroxilada, metoxilada ou glicosilada (HICHRI et al., 2011; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Aos flavonoides são atribuídas atividades fisiológicas tais como, anti-úlceras, antibacteriano, anti-inflamatória, anti-hiperlipidemia, e atividades analgésica (YIN et al., 2015; MERKEN; BEECHER, 2000).

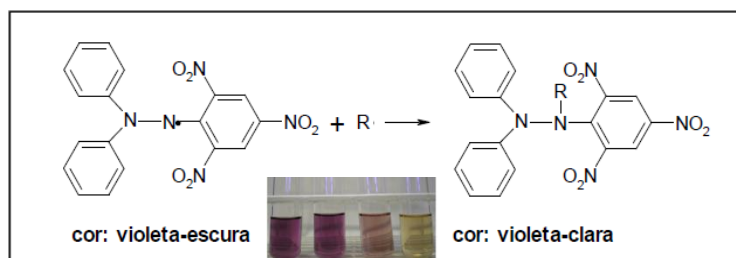
Existem ferramentas e técnicas importantes como marcadoras de flavonoides, no entanto documentos oficiais como as Farmacopéias Francesa, Européia e Brasileira ainda adotam a espectrometria UV-Visível como método para análise quantitativa de flavonoides em material vegetal, devido seu menor custo e simplicidade operacional (CHABARIBERI et al., 2015).

Segundo Ryan et al. (2002), existem diferenças nos níveis e tipos de compostos fenólicos nas folhas, frutos e sementes da *Olea europaea*, assim como há diferenças significativas na composição fenólica de frutos e folhas durante o período de maturação

(BRIANTE et al., 2002), por isso há diversos métodos disponíveis para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*, entre eles, o 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), o método de redução do ferro (FRAP), o 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) e a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) são alguns dos mais usados (HAYES et al., 2011; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURACALIXTO, 2006).

Conforme estudos descritos por Xynos et al. (2014), Sahin; Samli (2013), Stamatopoulos et al. (2012), Xynos et al. (2012), Brahmi et al. (2012), Hayes et al. (2011), Lafka et al. (2013), Lee et al. (2009), Hayes et al. (2009), o método mais utilizado para análise da atividade antioxidante em extrato de folhas de oliveira é o método DPPH, que se baseia na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515nm (BRAND-WILIAMS; CUEVELIER; BERSSET, 1995). É um método foto colorimétrico do radical livre estável DPPH que pode doar um átomo de hidrogênio quando é misturado a uma substância, sendo que sua forma reduzida do radical gerado é acompanhada da perda de cor violeta (ALI et al., 2008) conforme mostra a Figura 3.1, originando uma solução de cor violeta clara ou amarelada (RUFINO et al., 2007).

Figura 3.1- Estabilização do radical livre DPPH



Fonte: Rufino et. al. (2007) adaptado.

3.2 Obtenção de compostos ativos em extração com fluido sub e supercrítico (EFS)

A extração com fluido supercrítico (EFS) é uma tecnologia sustentável, tem uma ampla gama de aplicações desde a década passada além de permitir a adequação de sistemas em diferentes escalas, desde escala de miligramas até escalas industriais atingindo toneladas de matéria prima (SHARIF et al., 2014; LANG; WAI, 2001).

Um fluido supercrítico é qualquer substância a uma temperatura e pressão acima do seu ponto crítico, assim o fluido pode se difundir em um sólido como um gás e dissolver materiais como um líquido, sendo que perto do ponto crítico, pequenas mudanças na pressão ou

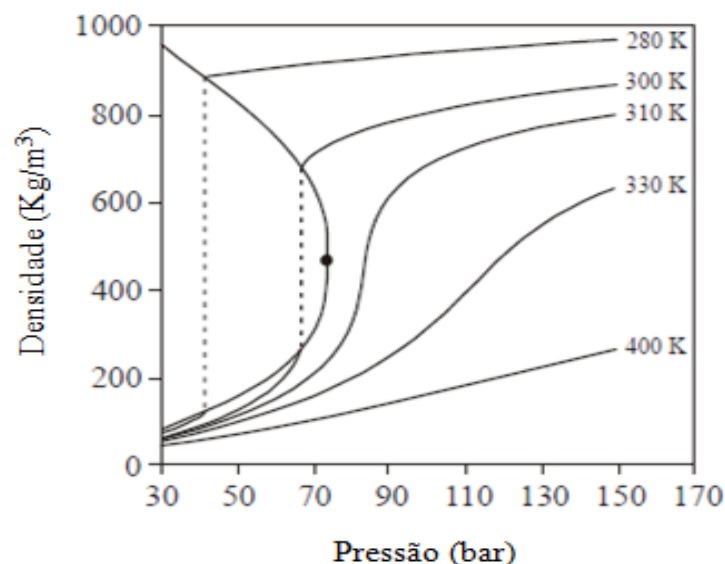
temperatura resultam em grandes mudanças na densidade e acima da pressão crítica, as propriedades do líquido e do gás se tornam idênticas (LUTHER; BRAEUER, 2012; SAPKALE et al., 2010).

Estas propriedades intermediárias entre líquidos e gases variam em função da temperatura e pressão, mais especificamente com a densidade relativamente elevada (típica de um líquido) resultam em um bom poder solvente enquanto que a baixa viscosidade e alta difusividade possibilita maior poder de penetração na matriz, sendo estas propriedades responsáveis pelas maiores taxas de transferência de massa do soluto em um fluido supercrítico (TEMELLI; SALDAÑA; COMIN, 2012; MAUL, 1999; HEDRICK; MULCAHEY; TAYLOR, 1992; PARHI; SURESH, 2013).

Entre todos os possíveis fluídos supercríticos, o dióxido de carbono (CO_2) em condições supercríticas é utilizado principalmente devido à sua temperatura crítica relativamente baixa ($31,1^\circ\text{C}$) e da pressão (7,38 MPa), em função da baixa toxicidade e de baixo custo (MONTES et al., 2013).

Essa versatilidade do CO_2 como fluido supercrítico pode ser observada na Figura 3.2 onde é apresentado o diagrama de fases de pressão-densidade para o dióxido de carbono.

Figura 3.2- Diagrama de fases pressão-densidade do dióxido de carbono.



Fonte: Sapkale et al. (2010).

À medida que a temperatura aumenta a densidade do CO_2 diminui e o mesmo passa a se comportar como gás mesmo em pressões mais elevadas, assim como em baixas temperaturas sua densidade é maior e pequenas oscilações de pressões resultam em grandes variabilidades

em gradientes físico-químicas como viscosidade, permissividade relativa e poder de solvatação (SAPKALE et al., 2010).

Outro fenômeno com possibilidade de ocorrência sobre a cinética de extração com CO₂ supercrítico é o fenômeno conhecido como "*crossover*". Ele ocorre quando a temperatura aumenta e a densidade do CO₂ no estado supercrítico diminui, mas a solubilidade do soluto aumenta, como resultado do aumento da pressão de vapor do soluto (DUBA; FIORI, 2015).

A extração com EFS-CO₂ oferece vantagens especiais durante a extração em relação à extração líquido-solvente convencional, tal como o aumento da seletividade, celeridade, automaticidade e segurança ambiental, além da diminuição drasticamente do uso de solventes orgânicos sendo que resultam em extratos sem contaminantes tóxicos, outras características vantajosas são a segurança do solvente, custo, ser inodoro, incolor, insípido e não ser inflamável, prontamente disponível, de fácil remoção e permite ampla variação nos parâmetros (temperatura e pressão) operacionais (RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015; BAJEROVÁ et al., 2008; LE FLOCH et al., 1998).

A EFS com dióxido de carbono é o método mais indicado para o isolamento de compostos naturais, principalmente apolares ou lipofílicos de especiarias e subprodutos agrícolas com alto poder antioxidante, em função destes resultados a sua aplicação sobre os produtos naturais é cada vez maior (XYNOS et al., 2012; LE FLOCH et al., 1998).

Devido à sua baixa polaridade, a utilização de CO₂ como fluido supercrítico para a extração de compostos polares é inviável, no entanto a adição de um solvente polar ou modificador - um co-solvente, podem atuar de forma significativa, alterando as características do processo e favorecendo a extração de compostos polares (SOLANA et al., 2015; MACHADO et al., 2013).

A utilização de um co-solvente em concentrações relativamente pequenas (1-10 %) aumenta a possibilidade de aplicação do CO₂ como um fluido para a extração de compostos polares. Os co-solventes ou modificadores alteram o poder de solvatação do CO₂ supercrítico quando não é possível extrair os compostos polares. O metanol, etanol, acetonitrila, tolueno, água e isopropila, são alternativas de co-solvente, no entanto o etanol tem sido mais utilizado como modificador na presença de CO₂ supercrítico, especialmente devido à sua baixa toxicidade, fácil disponibilidade e por ser considerado um solvente tipo "*generally recognized as safe - GRAS*" (sigla em inglês que traduz geralmente reconhecido como seguros) (MACHADO et al., 2013; HEDRICK; MULCAHEY; TAYLOR, 1992).

Mesmo assim, não sendo possível a extração dos compostos desejados, outras variáveis de processo devem ser alteradas ou a necessidade de substituição da técnica de extração, por isso na sequência, será apresentada a técnica de extração com líquido pressurizado (PLE).

3.3 Obtenção de compostos ativos em extração com líquido pressurizado (PLE)

A extração com líquido pressurizado (PLE) foi apresentada pela primeira vez em 1995 na Conferência Pittcon, utilizada para a extração dos contaminantes ambientais de amostras de resíduos e mais tarde para a extração de hidrocarbonetos contaminantes do solo. Atualmente tem sido utilizada principalmente para otimizar os procedimentos de preparação analítica e recentemente tem ganhado interesse como um método de extração verde para obtenção de compostos bioativos de diferentes polaridades (MORET et al., 2013; MUSTAFA; TURNER, 2011).

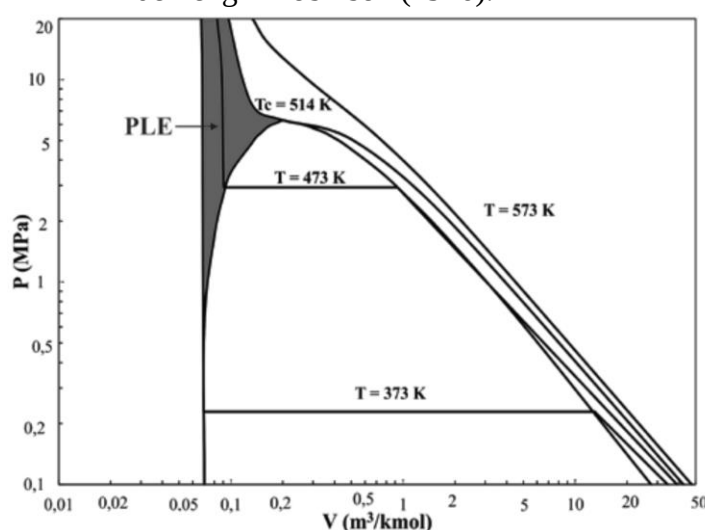
A PLE é uma técnica promissora, por ser considerada uma tecnologia “verde” porque preserva o meio ambiente e os recursos naturais, por preservar compostos através da combinação de alta pressão e temperatura, redução do tempo de extração, não tem a necessidade de intervenções do operador por ser um sistema automatizado oferecendo resultados seguros, redução do uso de solventes orgânicos, possibilita o controle de vários parâmetros, como temperatura, tempo de extração estática, ciclos de extração entre outros e, principalmente porque possibilita a utilização de água como solvente (MUSTAFA; TURNER, 2011; FRANQUIN-TRINQUIER et al., 2014; XYNOS et al., 2014).

Na PLE a seleção de um sistema adequado é um fator chave para a otimização do processo de extração. Dependendo das condições de extração, tais como as propriedades físicas (temperatura e pressão), propriedades do analito, composição química e tamanho da matriz amostral, a escolha e volume do solvente, tempo estático ou dinâmico de extração, volume de água e relação soluto-solvente podem afetar dramaticamente a eficiência, cinética e seletividade da extração (JACQUES et al., 2008; LUTHRIA, 2008; MUSTAFA; TURNER, 2011).

A PLE é uma técnica de extração que utiliza solventes orgânicos líquidos em altas pressões e temperaturas acima do seu ponto de ebulição normal, aumentando seu desempenho quando comparado com as técnicas desenvolvidas à temperatura ambiente e pressão próxima da atmosférica, pois melhoram as propriedades de solubilidade, taxas de transferência de massa e difusividade (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013; MUSTAFA; TUNER, 2011; GARCIA-SALAS et al., 2010).

A PLE é realizada numa vasta gama de condições, sobre a região do líquido comprimido, localizadas à esquerda da curva de líquido saturado e abaixo da linha da temperatura crítica (T_c) (Figura 3.3). Nesta região, os líquidos são altamente incompressíveis e quando os solventes são submetidos a mudanças de pressão a uma temperatura constante a sua densidade e energia de solvatação não são afetados significativamente, no entanto o aumento da temperatura pode melhorar a eficiência por causa do aumento da taxa de difusão de transferência de massa (OSÓRIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

Figura 3.3- Diagrama de pressão-volume/molar para o etanol utilizando a equação de estado de Peng – Robinson (1976).



Fonte: Osório-Tobón; Meireles (2013).

A utilização de temperaturas e pressões mais altas reduzem a viscosidade, tensão superficial e o consumo do solvente, envolve tempos de extração mais curtos e torna as extrações mais eficientes, pois ajudam no rompimento da matriz da amostra, aumentando as taxas de difusão, dessorção e transferência de massa auxiliando na solubilidade dos analitos (SUMERE et al., 2018; MORET et al., 2013; MUSTAFA; TUNER, 2013; WIJNGAARD; BALLAY; BRUNTON, 2012; CAMPONE et al., 2009).

Algumas das vantagens da PLE são: menor tempo de extração e consumo de solvente, a facilidade de operação, alta reprodutibilidade dos parâmetros de extração (temperatura de extração, pressão, volume de lavagem, ciclos e tempos estáticos, tipos de solventes), simplificação no preparo das amostras antes da extração, extração de compostos termicamente degradáveis e a manutenção do solvente abaixo do ponto de ebulição, mesmo em temperaturas elevadas, mantendo o mesmo no estado líquido, forçando o solvente penetrar nos poros da

matriz, diminuindo a tensão superficial do solvente e aumentando a solubilidade do analito e a cinética de dessorção da matriz (OTERO et al., 2018; MORET et al., 2014; MUSTAFA; TUNER, 2013 ; CAMPONE et al., 2009; ABAD, 2006).

Na literatura alguns estudos foram publicados com o uso da PLE em várias áreas do conhecimento conforme destacamos posteriormente, pois a mesma permite a obtenção de extratos de grau alimentício quando a água ou outros solventes “GRAS” são utilizados (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

Segundo Ameer, Shahbaz e Kwon (2017) e Lafka et al. (2013), a extração com solvente é um processo destinado a separar os compostos fenólicos solúveis por difusão a partir de matriz sólida (folhas de oliveira) utilizando um solvente (matriz líquida), sendo que muitos fatores contribuem para a eficácia do processo de extração como o tipo dos solventes, pH, temperatura, processo e o número de ciclos de extração, proporção solvente/sólido e o tamanho de partícula da matriz sólida.

A técnica de PLE tem sido relatada para a extração de alguns compostos como: compostos fenólicos totais e antocianinas de amora (ESPADA-BELLIDO et al., 2018), compostos bioativos da folha de *Lippia citriodora* (LEYVA-JIMÉNEZ et al., 2018), carotenóides de *Neochloris oleoabundans* (CASTRO-PUYANA et al., 2017), antocianinas da jabuticaba (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012), compostos fenólicos de maçã (GRIGORAS et al., 2012) compostos fenólicos e antocianinas de uvas vermelhas (OTERO-PAREJA et al., 2015), conteúdo fenólico dos extratos de aspargos (SOLANA et al, 2015), compostos antioxidantes de resíduo de amoras pretas (MACHADO et al., 2015), oleuropeína em folhas de oliveira (XYNOS et al., 2014 e 2012), monômeros e compostos fenólicos de maçã (FRANQUIN-TRINQUIER et al., 2014), isoflavonas da raiz da *Radix puerariae* (LEE; LIN, 2007), compostos de folhas da salsa (LUTHRIA, 2008) entre outros.

3.4 Modelagem matemática

A modelagem matemática dos dados experimentais é uma tarefa comum no campo da engenharia e ciências aplicadas, que não deve ser uma mera ferramenta matemática, mas deve refletir a visão física decorrente do conhecimento da estrutura sólida e que possam reproduzir dados experimentais existentes e, a partir deles, ajustar parâmetros com os quais se possam simular processos de extração em outras escalas e condições operacionais (HUANGA; SHI; JIANG, 2012).

A seleção do modelo matemático apropriado para descrever o processo de extração depende da distribuição inicial do soluto no interior do substrato sólido. Esta distribuição se dá de diferentes formas: as substâncias de interesse podem estar livres na superfície do material sólido, adsorvidas na superfície exterior, situadas dentro dos poros ou uniformemente distribuídas dentro das células vegetais (REVERCHON, 1997).

Todas estas proposições associadas à escolha de um modelo fenomenológico apropriado para descrever o processo de extração, que consistem em equações diferenciais de balanço de massa para solutos em fase sólida e em fase fluida e que é calculado pela integração destas equações e dos perfis de concentração que são dependentes do tempo em ambas as fases, obtidas nas curvas de extração a partir da concentração de fase fluida na saída do extrator podem propiciar desenvolvimento de novos produtos alimentícios funcionais, surgimento de técnicas emergentes de extração de compostos bioativos, assim como a recuperação e estabilidade destes compostos (STAMATOPOULOS; KATSOYANNOS; CHATZILAZAROU, 2014; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012; SOVOVÁ, 2005; CAMEL, 2001).

3.4.1 Modelo Sovová

Sovová (1994) descreve o fenômeno de transferência de massa na extração considerando que o soluto a ser extraído encontra-se dividido em duas frações: soluto facilmente acessível e soluto de difícil acesso e que o perfil da concentração do soluto na fase fluída é dividido em três períodos, fases ou etapas:

1. O primeiro período de extração considera que apenas o soluto de fácil acesso a ser extraído está em contato direto com o solvente porque está disponível na superfície das partículas e vai se esgotando ao longo do tempo. Esta fase é conhecida como taxa constante de extração (T_{CER} - *Constant Extraction Rate*) e o mecanismo dominante de transferência de massa é a convecção;
2. O segundo período considera que o soluto de fácil acesso no interior da partícula sólida é gradualmente extraído, denominado como taxa de queda de extração (T_{FER} - *Falling Extraction Rate*) os mecanismos combinados que atuam nesta fase são os de convecção e difusão;
3. O terceiro período tem apenas soluto de difícil acesso contido no interior das partículas. Esta etapa de extração conhecida como baixa taxa de extração (LER) ou período de difusão controlada (DC - *Diffusion Controlled*) descreve a etapa na qual a transferência de massa ocorre

dentro das partículas sólidas é dominada pelo mecanismo de difusão (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

3.4.2 Modelo Pardo-Castaño

O modelo Pardo-Castaño foi desenvolvido com base na Teoria de Brunauer-Emmett-Teller – BET (1938) da adsorção física de moléculas de gás sobre uma superfície sólida.

A teoria de BET prevê a adsorção física de moléculas de gás sobre uma superfície sólida em infinitas camadas e a ausência de interação entre as camadas adsorvidas. As equações obtidas pelo modelo de BET são capazes de representar de forma geral as isotermas experimentais e prever os valores compatíveis médios para o calor de adsorção e o volume de gás necessário para completar a primeira camada de adsorção em um sólido (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, (1938)).

Até esta etapa da revisão foi abordado os diferentes métodos de extração utilizados para extrair compostos de folha de oliveira, ou seja, PLE e EFS, juntamente com as diferentes variáveis que podem influenciar no processo de extração como temperatura, pressão e solventes, que posteriormente podem alterar rendimento e atividade antioxidante, FT e flavonoides. Geralmente os estudos com diferentes métodos de extração são realizados isoladamente não possibilitando a comparação entre os métodos de extração e de que forma as variáveis influenciam no processo, neste sentido este trabalho aborda uma comparação entre estas técnicas possibilitando identificar com mais clareza qual a metodologia mais eficiente na obtenção de extratos de folhas de oliveira com alto rendimento, efetiva atividade e ajuste dos modelos que melhor descrevem o processo de extração via modelagem matemática.

3.5 Nanotecnologia e nanociência aplicada à produção de partículas utilizando fluido sub e supercrítico

A nanotecnologia e a nanociência (N & N) são consideradas como um dos mais fascinantes avanços nas áreas de conhecimento e constituem um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados (PIRES, 2004; ARNALDI; TYSHENKO, 2014).

Diferentes interpretações das dimensões que definem a fronteira entre os materiais normais e nano materiais têm sido propostos (REVERCHON; ADAMI, 2006).

Segundo Durán; Mattoso; Moraes (2006), a nanotecnologia engloba a pesquisa com estruturas que tenham pelo menos uma dimensão menor que 100nm. Anandharamakrishnan (2014) e Safari; Zarnegar (2013) definem as nanopartículas poliméricas (NPs) como os compostos de polímeros biodegradáveis ou bioestáveis e que tenham tamanhos menores que 1000nm. Della Porta; Campardelli; Reverchon (2013) descrevem que no campo biomédico e farmacêutico, partículas com diâmetro médio de 100 e 500nm geralmente são indicadas como nanopartículas. Yadav; Kumar (2014) classificam nanopartículas submicron, partículas com medidas entre 100-1000nm. Campardelli; Baldino; Reverchon (2015) definiram 250nm a definição métrica para nanopartículas.

Schmid (2008) resumiu algumas definições literárias e cita que a nano tecnologia compreende a aplicação emergente da Nanociência e a define como sendo o designer, a caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas por controlar forma e tamanho em escala nano métrica.

A nano encapsulação é um importante campo da nanotecnologia é um processo que envolve o aprisionamento de agentes bioativos dentro de suportes materiais com uma dimensão em nano escala (FATHI; MARTÍN; MC CLEMENTS, 2014).

Segundo Anandharamakrishnan (2014), as nano partículas, oriundas do processo de nano encapsulação, são partículas coloidais com tamanho de diâmetros que variam de 10 a 1000nm e são expressas como nano cápsulas ou nano esferas, sendo que nas nano cápsulas o composto bioativo é confinado dentro de um sistema vesicular ou uma cavidade rodeada por uma membrana de polímero ao passo que as nano esferas são constituídas de um sistema disperso entre a matriz polimérica e o composto bioativo.

Comparando a escala micro com a escala nano, em escala nano as partículas proporcionam uma maior área superficial de contato, tem potencial para aumentar solubilidade devido a uma grande área interfacial de adsorção do composto de núcleo, maior biodisponibilidade, melhora a liberação controlada o que permite uma melhor precisão e direcionamento dos materiais encapsulados (MOZAFARI et al., 2006).

A tecnologia com fluido supercrítico, atrelada à técnica de precipitação com fluido supercrítico surgiu como importante alternativa aos processos tradicionais para a produção de micro e nano partículas, ela oferece oportunidades e vantagens, tais como maior qualidade do produto em termos de pureza, redução do tamanho das partículas e o controle da morfologia e distribuição de tamanho de partícula, variedade de compostos que podem ser processados sem degradação ou contaminação do produto, melhoria substancial em termos ambientais, além da

possibilidade operacional de micronização de solutos termolábeis (MONTES et al., 2013; REVERCHON; ADAMI, 2006).

Os fluídos supercríticos têm sido propostos como elementos para produção de nano materiais. As propriedades que fazem os fluidos supercríticos particularmente atraentes são a difusividade dos gases, densidade próxima a de líquidos, poder solvente ajustável o que proporciona melhor seletividade e a possibilidade de eliminação total no final do processo (REVERCHON; ADAMI, 2006).

No que diz respeito a técnicas que envolvem o uso de fluidos supercríticos, o dióxido de carbono é, quase impreterivelmente, a substância escolhida. A sua pressão e temperatura críticas, respectivamente, 7,38 MPa e 31°C, são facilmente atingíveis e permitem o processamento, em condições moderadas e que não degradam produtos sensíveis à temperatura, como é o caso da maioria dos produtos de origem e aplicação biológica. Adicionalmente, o dióxido de carbono tem ainda as vantagens de sua natureza inerte, seletividade, atóxica, baixo custo e compatível ao ambiente (CHINANNARASU et al., 2015; MONTES et al., 2013; ANTUNES, 2007).

Na micronização supercrítica o fluído supercrítico pode atuar como solvente ou antissolvente e, dependendo da maneira em que ele desempenhe seu papel no processo dará origem a diferentes técnicas de produção de nano e micropartículas (ANTUNES, 2007).

Para a produção de partículas, fluídos supercríticos têm sido utilizados como solventes (RESS), como solutos nos processos baseados na solução saturada de gás (PGSS) e como antissolventes nas técnicas Gás Antissolvente (GAS), anti-solvente supercrítico (SAS) e na técnica de solução dispersa por fluído supercrítico (SEDS) (KIRAN, 2016; YEO; KIRAN, 2005), no processo de extração de solvente aerosol (ASES) ou até mesmo como uma hélice, como no processo de Atomização Assistida Supercrítica (SAA) (COCERO; CALVO, 1996).

Ainda como antissolvente, o fluído supercrítico pode ser usado nas técnicas de emulsão e SAS a qual originaram a “Supercritical Fluid Extraction of Emulsions” (SFEE) (GOMES; SANTOS; MEIRELES, 2012) ou então no processo SAE, onde o fluído supercrítico é colocado em contato com o extrato líquido pulverizado e a precipitação é obtida devido ao efeito anti-solvente (GUAMÁN-BALCÁZAR et al., 2017).

Segundo Jung; Perrut (2001) a SEDS é uma aplicação específica da ASES e consiste em co-pulverização da solução de substrato e uma corrente de dióxido de carbono supercrítico, através de bocais apropriados. Este processo é uma versão modificada da técnica SAS e a

diferença entre ambos os métodos é a forma de contato entre a mistura soluto-solvente e antissolvente que é diferente (PRIAMO et al., 2011).

A solução orgânica e o CO₂ supercrítico são pulverizados em conjunto através de um injetor coaxial, especialmente concebido para melhorar o efeito de dispersão das gotas da solução. Durante o processo de formação das partículas, a temperatura, pressão e a vazão da solução e do CO₂ vão afetar a distribuição e o tamanho das partículas resultante do processo (NEROME et al., 2013).

Em outras palavras, a solução contendo a substância a ser precipitada e o antissolvente comprimido é aspergido através de um único bocal para a câmara de precipitação já contendo o antissolvente pressurizado ocorrendo contato espontâneo da corrente de alta velocidade da solução líquida e do fluido supercrítico gerando a mistura finamente dispersa e viabilizando a precipitação rápida das partículas (YEO; KIRAN, 2005; PRIAMO et al., 2011).

Diversos dispositivos e formas de aspersão têm sido propostos na literatura, pois estes afetam o tamanho das gotículas, a taxa de extração do solvente pelo antissolvente, influenciando assim a morfologia e tamanho das partículas formadas (PRIAMO et al., 2011).

3.6 Nanoencapsulação de produtos naturais

No período de 2000 e 2013, os extratos de mais de 300 espécies de plantas foram estudados empregando a extração com fluidos supercríticos. Enquanto muitos extratos e componentes puros dessas espécies já estão em uso para fins de saúde e nutrição humana, outros representam potencial para novas aplicações envolvendo plantas, cujo conhecimento, na maioria dos casos, tem sido empiricamente estabelecido ou ainda carece de cobertura científica (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014).

As implicações econômicas de compostos polifenólicos são, portanto, substanciais. Eles são usados em vários setores da indústria de processamento de alimentos como aditivos naturais (corantes naturais, agentes conservadores, antioxidantes naturais, aditivos nutricionais, entre outros...) (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

No entanto, a eficácia dos polifenóis depende da preservação, estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade dos ingredientes ativos dos polifenóis e o gosto desagradável da maior parte dos compostos fenólicos também limita a sua aplicação. Assim o encapsulamento de polifenóis, pode efetivamente minimizar essas deficiências (FANG; BHANDARI, 2010; MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Além de amenizar o gosto amargo, o principal objetivo do encapsulamento é proteger o material do núcleo a partir de condições ambientais adversas, como efeitos indesejáveis da luz, umidade e oxigênio, contribuindo assim para um aumento da vida de prateleira do produto e a promoção de uma liberação prolongada do encapsulado (FANG; BHANDARI, 2010).

Algumas características físico-químicas e principais propriedades alimentares dos polifenóis têm a sua estabilidade limitada e condicionada à solubilidade (FANG E BHANDARI, 2010), portanto a administração de compostos fenólicos requer a formulação de um produto protegido e capaz de manter a integridade estrutural do polifenol até o consumo ou a administração do mesmo (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Alguns estudos estão sendo realizados com a aplicação de diferentes técnicas e de encapsulamento de compostos fenólicos. Su et al. (2008) prepararam nano partículas de pó bruto *R. miltiorrhiza*, popular “sálvia” através de um método emulsionado de spray-drying, Deladino et al. (2008) e Anbinder et al. (2001) avaliaram o efeito de extratos de erva-mate liofilizados e encapsulados em alginato de cálcio com e sem uma camada de quitosana. Belščak-Cvitanović et al. (2011) realizaram o encapsulamento de seis ervas (urtiga, espinheiro, folhas de framboesa, folha de oliveira, yarrow e erva de São João), utilizando a técnica de extrusão eletrostática em alginato-quitosano e Donsi et al. (2011) apresentaram no *11^o International Congress on Engineering and Food* (I CEF 11), um estudo que se centrou-se na fabricação de nano emulsões estáveis com ingredientes comestíveis natural e aceitável, como lecitina de soja, éster de açúcar e amido modificado, para encapsulação de dois compostos polifenólicos, (curcumina e resveratrol).

Visentin et al. (2012) realizaram a precipitação e encapsulamento de extratos alcoólicos do alecrim por processos antissolvente supercrítico (SAS). Da Rosa et al. (2014) utilizaram compostos fenólicos de amora, os quais foram extraídos e microencapsulados em matrizes de β -ciclodextrina, quitosano, goma de xantana e de hidrogel (xantano de quitosano) e, extrato de cacau foi encapsulado por emulsificação/gelificação interna em microesferas de alginato de cálcio (LUPO et al., 2015).

Gou; Giusti; Kaletunç (2018) encapsulados em partículas de hidrogel de pectina e alginato extratos de milho roxo e mirtilo, Lee et al. (2018) microencapsularam óleo de palma vermelho utilizando a técnica SEDS, Kaga et al. (2018) encapsularam astaxantina em polivinilpirrolidona, empregando a técnica SEDS e Aguiar et al. (2018) aplicaram a técnica SEDS para o encapsulamento de trans-resveratrol.

Especificamente utilizando a técnica SEDS e o polímero PHBV, diferentes compostos foram encapsulados, como β -caroteno (FRANCESCHI et al., 2010; PRIAMO et al., 2010), extratos de semente de uva (BOSCHETTO et al., 2013), astaxantina (MACHADO et al., 2014 e 2016), bixina (BOSCHETTO et al. 2014), acetato de eugenila (LOSS et al., 2016) e *trans*-resveratrol (DAL MAGRO et al., 2017).

3.7 Características gerais do PHBV

O poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) ou PHBV é entre os poli (β -hydroxialcanoato) ou simplesmente PHA, o principal polímero microbiano biodegradável estudado. Ele pode ser produzido por adição de ácido propiônico à matéria-prima fornecida como nutriente às bactérias, é altamente cristalino com um ponto de fusão de 108 a 180°C, temperatura de transição vítrea na faixa de -5 a 20°C e propriedades mecânicas fracas, sendo que estas variáveis podem ser alteradas dependendo da quantidade de unidades hidroxivalerato (HV) presente no polímero (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2010; VROMAN; TIGHZERT, 2009). Sofre degradação térmica e hidrólise em temperaturas acima de 170°C, é frágil e tem baixa resistência ao impacto (PILLA, 2011), pouco solúvel em água, etanol, mas solúvel em clorofórmio e diclorometano (POUNTON; AKHTAR, 1996).

Uma das principais aplicações do PHBV é na área médica na utilização em curativos, terapia de substituição óssea (POUTON; AKHTARD, 1996), sistemas de administração de fármacos, engenharia de tecidos (PICH et al., 2006), materiais descartáveis, artefatos médicos para uso humano ou veterinário, produtos da indústria automobilística (BRUNEL et al., 2014), libertação controlada de drogas, embalagens, dispositivos ortopédicos (KAPLAN, 2013), utilidades domésticas, eletrodomésticos, eletroeletrônicos, agricultura e estabilização do solo, adesivos, tintas e revestimentos (BRITO et al., 2011).



4 CAPÍTULO I - EXTRAÇÃO

**EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUB E SUPERCRÍTICO E LÍQUIDO
PRESSURIZADO DE EXTRATOS DE FOLHA DE OLIVEIRA (*Olea
europaea*)**

Esta seção foi dedicada à compilação dos dados e das metodologias para análises de atividade antioxidante, FT e flavonoides dos extratos obtidos pelos métodos de extração por EFS e PLE, avaliando as variáveis de processo que podem influir no rendimento e na atividade.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS CAPÍTULO I

4.1.1 Reagentes

Os padrões de referência para oleuropeína, hidroxitirosol, e 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) foram obtidos da Sigma e Aldrich Chemical®. A água foi obtida a partir de um sistema de desionização de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Metanol, acetonitrila e ácido acético de grau HPLC foram obtidos da J.T. Baker®. O fluido empregado foi o dióxido de carbono com procedência da White Martins S.A., com pureza mínima de 99,9% na fase líquida. Álcool etílico 99%, acetona, acetato de etila, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido gálico, catequina, Folin-Cicalteu, carbonato de sódio, cloreto de lítio, nitrito de sódio, cloreto de alumínio, metanol, clorofórmio e hidróxido de sódio utilizados em grau analítico.

4.1.2 Coleta e preparo das amostras de folha oliveira

As folhas de *Olea europaea* (variedade Negrinha do Freixó) foram coletadas no mês de março de 2015 e dezembro 2016, na unidade experimental da Epagri – Chapecó (Santa Catarina - Brasil; latitude -27°05'04" e longitude 52°37'06"). A coleta ocorreu no período matutino, no momento em que as folhas já estavam sem orvalho, de forma aleatória em vários pontos das plantas, coletando pequenos ramos na copa, ramificações laterais e inferiores (Tsimidou e Patoti, 2010) e, submetidas à secagem em estufa a 40°C com circulação forçada de ar (Solab modelo 102/152), por aproximadamente 48 h (umidade de 6%). Posteriormente as folhas foram trituradas em multiprocessador doméstico (Arno) e peneiradas e agitador magnético (Bertel®) com obtenção de partículas variando 1 a 3 mm (XYNOS et al., 2014 e 2012; SAHIN; SAMLI, 2013; SAHIN; BILGIN, 2012; JAPÓN-LUJÁN; LUQUE DE CASTRO, 2008) e armazenadas em embalagens de polipropileno, em frações de 30g e submetidas à refrigeração até o momento de uso.

4.1.3 Extração com fluido sub e supercrítico (EFS)

O equipamento montado e as condições para a realização das extrações foi baseada na técnica que emprega dióxido de carbono em condições sub e supercrítica e é descrito detalhadamente nesta seção.

4.1.3.1 Condições de EFS

Para a extração com fluido supercrítico empregou-se um planejamento fatorial 2^3 apresentados na Tabela 4.1, onde variou a pressão e a temperatura, mantendo-se constante a granulometria da amostra (1-3mm) e o tempo de extração 210min definido previamente em testes experimentais, em função da estabilidade da curva de extração, resultando num total de nove tratamentos realizado em duplicata. As variáveis dependentes foram o rendimento de extrato, fenólicos totais (FT), flavonoides e atividade antioxidante (Aa).

Tabela 4.1- Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^3 para EFS.

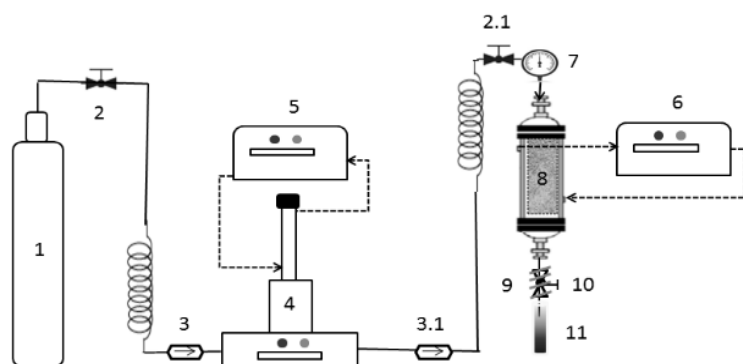
Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	1
Pressão (MPa)	8,0	16,5	25
Temperatura (°C)	20	40	60

A coluna de extração foi empacotada com aproximadamente 0,022Kg de folha, sendo utilizado CO₂ como fluido extrator. A coluna de extração com amostras de folha de oliveira permaneceu pressurizada estaticamente com CO₂ por 15min. antes do início da extração para estabilizar a temperatura e pressão em estudo e após a taxa de fluxo de CO₂ foi mantida constante a 2mL.min⁻¹ por 210min.

4.1.3.2 Aparato experimental com EFS

A unidade experimental utilizada nos tratamentos com EFS é apresentada na Figura 4.1 e os tratamentos foram realizados em uma unidade em escala laboratorial, descrito detalhadamente em publicações anteriores (MAZUTTI et al., 2008 e SARMENTO; FERREIRA; HENSE, 2006), a qual é composta de diferentes partes e constitui todo aparato experimental para a realização das extrações e sua finalidade na unidade extratora.

Figura 4.1- Unidade extratora com dióxido de carbono.



Cilindro de CO₂ [1]; Válvula tipo agulha [2 e 2.1]; Válvula anti-refluxo [3 e 3.1]; Bomba de seringa a alta pressão [4]; Banho Ultratermostático de Recirculação [5 e 6]; Manômetro [7]; Coluna extratora [8]; Válvula micrométrica [9]; Fita de aquecimento [10]; Frascos coletor de vidro [11].

A válvula tipo agulha (Marca Hip – modelo 15-11AF1) [2]: permite a alimentação do CO₂ a partir do cilindro de CO₂ [1] que armazena o dióxido de carbono utilizado como fluido extrator para a bomba de alta pressão. Entre a bomba de alta pressão e a válvula tipo agulha [2] dispomos de uma válvula antirefluxo (Marca Hip – modelo 316SS HT) [3] que impossibilita o refluxo do CO₂ pressurizado na bomba de alta pressão para o cilindro. A bomba de seringa a alta pressão (Marca ISCO, Modelo 500 D) [4] possui cilindro encamisado com capacidade de 506 mL, pressão de trabalho até 25,8MPa e taxa máxima de 170mL.min⁻¹, define a condição de pressão em estudo e é responsável por deslocar o dióxido de carbono para a unidade extratora. A temperatura da bomba se mantém constante a 7°C com água circulando na camisa da bomba por banho ultratermostatizado [5]. Entre a bomba de alta pressão e a unidade extratora foi instalado as válvulas antirefluxo (Marca Hip – modelo 316SS HT) [3.1] e a válvula tipo agulha [2.1] para impossibilitar o refluxo do dióxido de carbono da unidade extratora para a bomba de alta pressão e isolar o sistema extrator em caso de vazamento durante a extração. A coluna extratora [8] é composta de um tubo cilíndrico, encamisado e em aço inox 316L (Suprilab), com 20cm de altura e 2cm de diâmetro interno, totalizando um volume de 63cm³. Suas extremidades são rosqueadas permitindo a adaptação interna de duas telas de aço inox que impedem a passagem de sólidos a qual é reforçada com o acoplamento de um chumaço de algodão de aproximadamente 1,5cm de altura. A temperatura de operação no extrator foi mantida através de um banho ultratermostato [6] conectado à camisa do mesmo. Para o controle da pressão internamente à coluna extratora é acoplado um manômetro [7] (Warnig, modelo

1136120, pressão máxima de 27,58MPa). O fluido extrator (CO₂) que foi deslocado do cilindro até a bomba de alta pressão onde é comprimido se desloca até a coluna de extração por tubulação constituída de aço inox com diâmetro interno de 2mm e passa pela matriz de extração (folhas de oliveira) saindo por uma válvula micrométrica [9] (modelo Whitey®, SS-31RF2) adaptada na saída da coluna extratora, que possibilita o controle do fluxo de dióxido de carbono e a saída do extrato em um tubo coletor de vidro [11]. Devido à expansão do CO₂ ao sair na válvula micrométrica [9] e evitar possíveis congelamentos desta válvula é acoplado uma fita de aquecimento [10] com controle de temperatura sendo feito através de um potenciômetro (Coel, modelo HW1440).

4.1.3.3 Curvas de extração e cálculo de rendimento com EFS

Os tratamentos cinéticos para a obtenção das curvas de extração consistiram na determinação da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração. Para a determinação das curvas de extração foram utilizados frascos de coleta previamente pesados em balança analítica e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos em tempos pré-determinados (10 em 10min.) para se obter a massa de extrato em função do tempo de extração. As curvas de extração podem ser construídas através da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração ou da massa de CO₂ consumido; ou ainda pelo rendimento de extração *versus* a razão massa de solvente por massa de amostra. Neste estudo os valores experimentais do rendimento (%) de extrato *versus* tempo de extração obtidos nas curvas com dióxido de carbono de folhas de oliveira são apresentados em porcentagem de rendimento e são calculados de acordo com Equação 4.1.

$$Rendimento (\%) = \frac{\text{massa do soluto}}{\text{massa de folha oliveira}} * 100 \quad \text{Eq.(4.1)}$$

4.1.4 Extração com líquido pressurizado (PLE)

A montagem do equipamento e as condições para a realização das extrações é baseada na técnica que emprega líquido pressurizado, foi estruturado com base em estudos anteriores (RODRIGUES et al., 2014) e é descrito detalhadamente nesta seção.

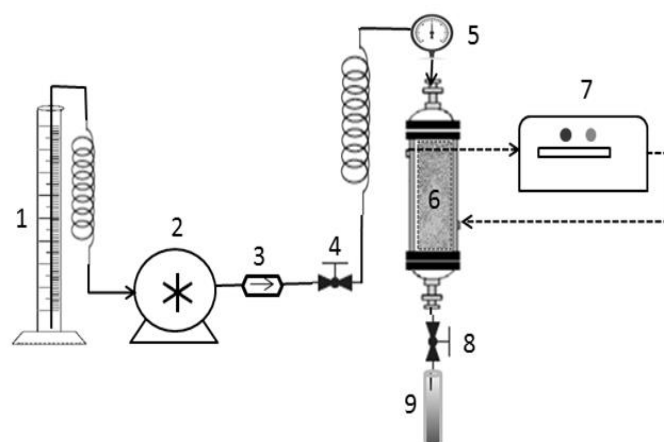
4.1.4.1 Condições de PLE

As extrações foram realizadas utilizando a unidade extratora de líquidos pressurizados conforme Figura 4.2, sendo operada com diferentes solventes de padrão analítico - PA (acetona, acetato de etila, etanol 99% e mistura hidro-alcoolica de etanol:água destilada (80:20, v:v)) e a temperatura de 20, 40 e 60°C mantendo-se a pressão constante em 10,3MPa. A coluna de extração, com capacidade de comportar o empacotamento de aproximadamente 0,022Kg de folha, foi pressurizada a 10,3MPa com o solvente por 15min. antes do início da extração e após a taxa de fluxo do solvente foi mantida a 2mL.min⁻¹ por 110min.

4.1.4 2 Aparato experimental para PLE

A unidade extratora apresentada na Figura 4.2 é composta de diferentes partes a qual constitui todo aparato experimental para a realização das extrações e sua finalidade na unidade extratora.

Figura 4.2- Unidade extratora com líquido pressurizado.



Cilindro do solvente [1]; Bomba de deslocamento positivo [2]; Válvula antirefluxo [3]; Válvula tipo agulha [4]; Manômetro [5]; Coluna extratora [6]; Banho Ultratermostato com circulação [7]; Válvula micrométrica [8]; Frascos coletor de vidro [9].

A bomba de deslocamento positivo [2] Digital Serie (Marca SSI) possui apenas um pistão que permite operar com taxa constante (0,1 a 10mL.min⁻¹) e é utilizada para deslocar o solvente extrator em temperatura ambiente armazenado no Cilindro de solvente [1] para a coluna de extração [6]. Entre a bomba de deslocamento positivo e a coluna de extração colocamos duas válvulas, uma válvula antirefluxo [3] (Marca Hip – modelo 316SS HT) e que

impossibilita o refluxo do solvente e a válvula tipo agulha [4] (Marca Hip – modelo 15-11AF1) que permite isolar o sistema em caso de algum vazamento na coluna de extração. Por vez a coluna extratora [6] que é um tubo cilíndrico, encamisado e em aço inox 316L, possui 20cm de altura e 2cm de diâmetro interno, totalizando um volume de 62cm^3 , tem suas extremidades rosqueadas permitindo a adaptação interna de duas telas de aço inox de 200 mesh que impedem a passagem de sólidos a qual é reforçada com o acoplamento de um chumaço de algodão de aproximadamente 1,5cm e opera com temperatura constante no interior do extrator via banho ultratermostático [7] Marca Nova Ética - Sppencer conectado à camisa do mesmo. O solvente extrator é conduzido do cilindro até a coluna de extração por tubulação constituída de aço inox com diâmetro de 2mm e passa pela matriz de extração (folhas de oliveira) e sai por uma válvula micrométrica [8] (modelo Whitey[®], SS-31RF2) adaptada na saída da coluna extratora, que possibilita o controle do fluxo do solvente com o extrato e a pressão do processo. Para auxiliar na manutenção constante da pressão é adaptado na entrada da coluna de extração um manômetro [5] (Warnig, modelo 1136120, pressão máxima de 27,58MPa) que controla a pressão de extração na entrada do extrator. Por fim o frasco coletor de vidro [9] é onde que ficam armazenados os extratos coletados.

4.1.4.3 Curvas de extração e cálculo de rendimento com PLE

Os tratamentos cinéticos para a obtenção das curvas de extração consistiram na determinação da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração. Para a determinação das curvas de extração foram utilizados frascos de coleta previamente pesados em balança analítica e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos em tempos pré-determinados obtendo-se a massa de extrato em função do tempo de extração. Após a coleta, os frascos com os extratos eram submetidos à secagem em estufa a vácuo (Quimis - modelo Q819V2) a temperatura de 40°C e 0,05MPa. As curvas de extração podem ser construídas através da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração ou da massa ou volume de solvente consumido; ou ainda pelo rendimento de extração *versus* a razão massa de solvente por massa de amostra. Neste estudo os valores experimentais do rendimento (%) de extrato *versus* tempo de extração obtidos nas curvas com diferentes solventes em folhas de oliveira são apresentados em porcentagem de rendimento e são calculados de acordo com Equação 4.2.

$$Rendimento (\%) = \frac{\text{massa do soluto após secagem em estufa}}{\text{massa de folha oliveira}} * 100 \quad \text{Eq.(4.2)}$$

4.1.5 Extração com solvente a pressão ambiente (convencional)

A extração convencional foi realizada para fins de comparação com a melhor condição, em termos de atividade antioxidante, FT e flavonoides, dos extratos obtidos pela técnica PLE. Na extração empregou-se 0,022Kg de folha de oliveira e volume de etanol total 220mL, em reator encamisado com circulação de água a 60°C, submetido à agitação de 1000 rpm por 110min e na pressão ambiente ($\cong 0,098\text{MPa}$). Após a extração, os extratos foram filtrados a vácuo com uma camada de algodão compactada de 1,5cm sobre papel filtro whatman, concentrado em rota evaporador (Biotech®) a 40°C, seco em estufa (Edutec) com circulação de ar forçado a 40°C até a obtenção de pó. O cálculo do rendimento foi feito a partir da razão da massa de extrato acumulada após a secagem em estufa *versus* a massa de folha de utilizada na extração conforme equação 4.2 (item 4.1.4.3). O extrato seco foi ressuspensionado em 1mL de etanol 99%, completando o volume com água destilada ($1\text{mg.mL}^{-1} \text{ m:v}$). Nestes extratos foram avaliados os teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante.

4.1.6 Modelagem matemática aplicada a EFS e PLE

Foram aplicados dois modelos cinéticos, o modelo clássico Sovová (2005) e o modelo de cinética de extração baseado na teoria BET de adsorção proposto por Pardo-Castano et al., (2015) com algumas modificações, tal como apresentado por Correa (2016), em que o modelo foi resolvido sem a contrapartida de baixa solubilidade do soluto na fase de solvente. Ambos os modelos foram comparados com os parâmetros estatísticos de desvio quadrático médio da raiz (*rmsd*) (Equação 4.3) e o coeficiente de determinação (R^2).

$$rmsd(x100) = 100x \sqrt{\sum_i^{NOBS} \frac{(y_i^{\text{exp}} - y_i^{\text{calc}})^2}{NOBS}} \quad \text{Eq. (4.3)}$$

Onde NOBS representa o número de dados experimentais disponíveis, y_i^{exp} e y_i^{calc} são, respectivamente, o rendimento de extração experimental e o rendimento de extração previsto

pelo modelo *menos* rendimento expresso em massa (g) de extrato extraído por massa (g) de folha.

4.1.6.1 Modelo Sovová

Neste trabalho foi aplicado o modelo proposto por Sovová (1994), com fluidez do solvente na direção axial, em um extrator cilíndrico de leito fixo considerado homogêneo em relação ao tamanho das partículas (1-3mm) e a distribuição inicial de soluto. Os principais parâmetros ponderados para o modelo são: a concentração de inicial do extrato no sólido, as propriedades do sistema (pressão, temperatura e vazão do solvente), a porosidade do leito, o coeficiente de transferência de massa externa e interna, a densidade da fase fluída e fase sólida.

Com base nestas ponderações é possível admitir as seguintes equações para o modelo Sovová:

$$O = P + K \quad \text{Eq. (4.4)}$$

Onde a massa de soluto contida inicialmente na fase sólida (O) é a soma da massa de soluto facilmente acessível (P) com a massa de soluto inacessível no interior das partículas da fase sólida (K).

O balanço material para o processo é representado pelas equações 4.5 e 4.6, associadas às fases sólida e líquida, respectivamente.

$$\rho s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad \text{Eq. (4.5)}$$

$$\rho \varepsilon \frac{\partial x}{\partial t} + \rho U \frac{\partial x}{\partial h} = J(x, y) \quad \text{Eq. (4.6)}$$

Onde h é a distância axial ou comprimento do leito, ε é a porosidade do leito, ρs é a densidade da fase sólida, x é a fração mássica do extrato na fase sólida, $\rho \varepsilon$ é a densidade do fluido, y é a fração mássica de extrato no fluido e $J(x,y)$ é taxa de transferência de massa interfacial, t é o tempo.

O termo de acúmulo associado ao balanço na fase fluida da equação 4.6 ($\rho \varepsilon \frac{\partial x}{\partial t}$) é negligenciado para facilitar a resolução dos sistemas de equações, resultando em:

$$\rho U \frac{\partial x}{\partial h} = J(x, y) \quad \text{Eq. (4.7)}$$

Para o cálculo da taxa de transferência de massa, considera-se que o soluto facilmente acessível é extraído primeiro. Quando a concentração na fase sólida diminui para x_k , a transferência de massa passa a ser controlada pela difusão na fase sólida.

A taxa de transferência de massa é representada pelas seguintes equações, para as fases fluida e sólida, respectivamente:

$$J(x > x_k, y) = x_f a_o \rho (y_r - y) \quad \text{Eq. (4.8)}$$

$$J(x \leq x_k, y) = x_s a_o \rho_s \left(1 - \frac{y}{y_r}\right) \quad \text{Eq. (4.9)}$$

A solução analítica das equações diferenciais foi realizada por Sovová (1994) e apresentada para três períodos de extração, em termos da massa de extrato relativa à massa de sólido sem contabilizar a massa de soluto (N). O autor considera três períodos distintos durante a extração: o primeiro está relacionado com a parte inicial e linear da curva, no qual o extrato extraído é de fácil acesso, a partir das células abertas pela moagem ($q < q_m$). O segundo período é relativo à faixa de transição, onde o extrato pode estar sendo extraído tanto das células abertas como das células fechadas ($q_m \leq q < q_n$) dependendo da região do leito considerada. No último período, apenas o extrato de difícil acesso, proveniente das células fechadas, está sendo extraído ($q \geq q_n$).

$$e = \begin{cases} q y_r [1 - \exp(-Z)] & q < q_m \\ y_r [q - q_m \exp(z_w - Z)] & q_m \leq q < q_n \\ x_o - \frac{y_r}{W} \ln \{ 1 + [\exp(W x_o / y_r) - 1] \exp[W(q_m - q)] x_k / x_o \} & q \geq q_n \end{cases} \quad \text{Eq. (4.10)}$$

Onde q é a quantidade específica de solvente gasto até um determinado tempo de extração, relativa à N , e x_o é a concentração inicial de soluto na fase sólida.

$$q_m = \frac{(x_o - x_k)}{y, Z} \quad \text{Eq. (4.11)}$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \frac{x_k + (x_o - x_k) \exp(W x_o / y_r)}{y, Z} \quad \text{Eq. (4.12)}$$

$$\frac{Z_w}{Z} = \frac{y_r}{W x_o} \ln \frac{x_o \exp[W(q - q_{mk})] - x_k}{x_o - x_k} \quad \text{Eq. (4.13)}$$

Os parâmetros Z e W são diretamente proporcionais aos coeficientes de transferência de massa das fases fluida e sólida (k_f e k_s), respectivamente, e inversamente proporcionais à vazão mássica de solvente (q) relativa à N .

Z é o parâmetro relacionado ao período rápido de extração e W está relacionado ao período lento.

$$Z = \frac{K_f a_o \rho}{[q(1 - \varepsilon)\rho_s]} \quad \text{Eq. (4.14)}$$

$$W = \frac{K_s a_o}{[q(1 - \varepsilon)]} \quad \text{Eq. (4.15)}$$

Onde y_r é a solubilidade e a_0 é a área específica.

4.1.6.2 Modelo Pardo-Castaño

A proposta apresentada nesta etapa do trabalho compreende a modelagem matemática das curvas cinéticas de extração utilizando o modelo proposto e apresentado por Pardo-Castaño et al. (2015), baseado na teoria de absorção de Brunauer-Emmett-Teller (BET), com algumas diferenças e considerações detalhadamente descritas por Correa (2016).

Este modelo baseia-se na extração de um substrato sólido com fluído supercrítico em um leito extrator compactado, em torno de um elemento diferencial ao longo da direção axial do extrator (Pardo-Castaño et al., 2015) descrito de acordo com a equação 4.16:

$$\frac{\partial C_f}{\partial t} + u\varepsilon \frac{\partial C_f}{\partial z} = D_{sf} \frac{\partial^2 C_f}{\partial z^2} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} a_{sf} K_{sf} (C_f^* - C_f) \quad \text{Eq. (4.16)}$$

Onde:

C_f é a concentração de soluto no fluído supercrítico

u é a velocidade intersticial do solvente

ε é a fração vazia do leito

D é o coeficiente axial de dispersão do soluto na fase fluida

a_{sf} é a área efetiva de contato sólido-fluido para a transferência de massa

k_{sf} é o coeficiente de transferência de massa para o transporte de soluto através do filme externo de fluido entorno das partículas solidas

C^* é a concentração de soluto no filme da fase fluida em equilíbrio com a superfície.

Pardo-Castaño et al. (2015), assumem que o termo que representa a dispersão axial, ou seja, o primeiro termo $[D_{sf}(\partial^2 C_f / \partial z^2)]$ do lado direito da Equação 4.16 é desprezível e esta aproximação é válida quando o comprimento do extrator é pelo menos 50 vezes o diâmetro médio de partícula e o número de Reynolds é maior que 10. Também consideramos que o termo que representa o acúmulo de soluto no fluido supercrítico, primeiro termo do lado esquerdo $[(\partial C / \partial z)]$ é desprezível em comparação com a quantidade de soluto no material sólido. Com estas suposições se obtém a equação 4.17:

$$u\varepsilon \frac{\partial y_f}{\partial z} = k(y_f^* - y_f) \quad \text{Eq. (4.17)}$$

Quando $K=[(1-\varepsilon)/\varepsilon]a_s/k_{sf}$, y é a fração de massa do soluto no fluido supercrítico e y_f^* é a condição de saturação relacionada ao filme estagnado na interface sólido-fluido.

A equação 4.17, quando integrada nas condições dentro dos limites usuais para um extrator empacotado em $z=0$, $y_f=0$ e $z=L$, $y_f=y_{fL}$, possibilita a obtenção da equação 4.18:

$$y_{fL} = y_f^* \left[1 - \exp\left(-\frac{kL}{u\varepsilon}\right) \right] \quad \text{Eq. (4.18)}$$

Onde: y_{fL} é fração mássica de soluto na fase fluida até a saída do extrator

L é o comprimento do extrator.

Segundo Correa, (2016), a equação 4.18 pode ser escrita em função de três números adimensionais: levando em consideração que existem alterações nas condições do fluxo (número de Reynolds, Re) e considerando as características de transferência de massa relacionadas às propriedades do sólido (número de Biot Bi) ou nas propriedades do fluido (Número de Schmidt, Sc), então, o argumento exponencial pode ser ajustado utilizando uma condição experimental ou nesse caso as limitações difusionais são insignificantes ($L \rightarrow \infty$ ou $k \rightarrow \infty$), então $y_L = y_e$. Além da Equação 4.18 é necessário o balanço material do soluto na matriz sólida, dado por:

$$\frac{dm_s}{dt} = -\dot{q} \left[\frac{m_l}{m_{solv}} \right] \quad \text{Eq. (4.19)}$$

Onde m_s é a massa do soluto na fase sólida (matriz), $\dot{q}$ é a vazão mássica de escoamento e m_l e m_{solv} são a massa de soluto e de solvente até a saída do extrator ($z=L$).

A equação 4.19 pode ser escrita em termos de fração mássica como:

$$\frac{dm_s}{dt} = -\dot{q} \frac{y_{fL}}{1 - y_{fL}} \quad \text{Eq. (4.20)}$$

Onde, y_{fL} é obtido usando a Equação 4.18.

Segundo Correa, 2016, adequando a proposta de Pardo-Castaño et al. (2015) e Goto et al. (1998) que propõem uma relação de equilíbrio do tipo BET na qual o soluto interage com a matriz sólida, descrita pela seguinte equação Brunauer; Emmett; Teller (1938):

$$\frac{x_s}{x_m} = \frac{K_x}{[1 - x][1 + (K - 1)x]} \quad \text{Eq. (4.21)}$$

Onde, χ é a razão entre a fração mássica de soluto no equilíbrio (y_e) e a fração mássica do soluto em uma fase fluida saturada (y^{Sat}), x_m é a fração mássica na primeira monocamada ($m_m.m_0^{-1}$), onde m_0 é a massa inicial de extrato na matriz sólida e K é o coeficiente de equilíbrio de sorção. Esta relação de equilíbrio relaciona a concentração do soluto em um filme de fluido localizado em uma distância infinitesimal da superfície do substrato sólido (y_e), com a concentração do soluto na matriz sólida (x_s). Esta relação depende das forças de atração relativas exercidas tanto pelo sólido quanto pelo solvente sobre o soluto (PARDO-CASTAÑO et al., 2015). Após algumas manipulações algébricas a equação 4.21 pode ser escrita como:

$$x = \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\gamma}}{2\gamma} \quad \text{Eq. (4.22)}$$

Onde $\beta = K(1 - x_m.x^{-1}) - 2$ e $\gamma = 1 - K$.

Finalmente, a equação 4.22 é aplicada na equação 4.18 com $y_e = \chi y^{Sat}$. Assim, a equação 4.20 é numericamente resolvida e os parâmetros y^{Sat} estão relacionados à solubilidade do soluto na fase do solvente, corrigida com limitações difusionais, K é a razão entre a constante de equilíbrio de adsorção na primeira monocamada e as camadas subsequentes (se as interações soluto-sólido são, $K \rightarrow \infty$, se não, $K \rightarrow 0$), e x_m é a razão entre a massa do soluto presente na primeira monocamada e a massa inicial de soluto que pode ser extraída (CORREA, 2016; PARDO-CASTAÑO et al., 2015).

4.1.7 Metodologias analíticas aplicada a EFS e PLE

Para a realização dos procedimentos experimentais foi feito o preparo dos extratos diluindo o mesmo e posteriormente submetido às análises de atividade antioxidante, fenólicos totais, flavonoides, análises cromatográficas e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.1.7.1 Preparo dos extratos

Para realização das análises, todos os extratos obtidos com dióxido de carbono foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de $5\text{mg.mL}^{-1}(\text{m:v})$ e os extratos obtidos com líquido pressurizado foram rotativamente evaporados a 40°C em rotavapor (Biotech®), seco em estufa. Posteriormente os extratos em pó (acetato de etila, acetona, etanol e etanol:água (80:20 v:v)) foram ressuspensos em 1mL de etanol absoluto e diluídos em água destilada a uma concentração de $1\text{mg.mL}^{-1}(\text{m:v})$ e submetidos a análise de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e análise cromatográfica. Para expressar os resultados em equivalente miligrama do padrão em uso por grama de extrato ($\text{Eqmg "padrão". g extrato}^{-1}$) foi construído a curvas de calibração com o padrão Catequina, Ácido Gálico e oleuropeína e realizado o cálculo por regressão linear.

4.1.7.2 Atividade antioxidante (Aa)

A metodologia para avaliação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata, por método espectrofotométrico descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), conduzida sob abrigo da luz, através do monitoramento do consumo do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) pelas alíquotas das amostras ($100\mu\text{L}$) através da medida do decréscimo das respectivas medidas de absorbância a 515nm após 30min de incubação. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da percentagem de atividade antioxidante (Aa%), conforme a Equação 4.23 para os extratos obtidos por EFS.

$$Aa (\%) = 100 - \frac{(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. Branco})}{\text{Abs. Controle}} * 100 \quad \text{Eq.(4.23)}$$

A concentração de extrato necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀) foi calculada por análise de regressão linear (SILVESTRI et al., 2010) após a construção de curva de calibração do referido extrato e foi utilizada para o cálculo de atividade dos extratos obtidos por PLE.

4.1.7.3 Fenólicos Totais (FT)

O teor de fenólicos totais dos extratos da folha de oliveira foi determinado seguindo metodologia proposta por Singleton et al. (1999) com adequações propostas por Blainski; Lopes; Mello (2013), Daí; Mumper (2010) e Cicco et al. (2009), onde adicionou-se 0,5mL da amostra em 2,5mL do reagente de Folin-Cicalteu a 0,2N sob agitação. A mistura permaneceu em repouso por 5min a temperatura ambiente e sob o abrigo de luz. Posteriormente foi adicionado à mistura, 2mL de da solução de Na₂CO₃ 5% e 50μL de cloreto de lítio a 10%, agitado e incubado por 2h em banho maria (Quimis®) a 25°C e sob abrigo da luz. A medida de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Bioespectro) a 760nm. Os resultados foram expressos em Eq.mg de ácido gálico na amostra analisada, após construção de curva de calibração (Apêndice I) e obtenção da equação da reta com o padrão de ácido gálico na concentração de 0,01 a 0,2mg.mL⁻¹.

4.1.7.4 Flavonoides

O teor de flavonoides totais dos extratos da folha de oliveira foi determinado, de acordo metodologia descrita por Zhishen; Mengcheng; Jianming (1999), onde se adicionou 0,25mL da amostra em tubo de ensaio com 1,25mL de água deionizada e 75uL da solução de NaNO₂ 5%, agitou-se e a mistura permaneceu em repouso por 6min a temperatura ambiente (~22°C). A esta mistura foi adicionada 150uL de da solução de AlCl₃ 10%, agitou-se novamente e a mesma permaneceu em repouso por mais 5min a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 0,5mL da solução de NaOH 1mol.L⁻¹ e 2,5mL de água destilada em agitação (1200rpm) e a medida foi feita em espectrofotômetro (Bioespectro) a 510nm. Os resultados foram expressos em Eq.mg de catequina na amostra analisada após construção de curva de calibração e equação da reta (Apêndice I) com padrão de catequina na concentração de 0,01 a 0,6mg.mL⁻¹. A análise foi conduzida sob abrigo da luz.

4.1.7.5 Quantificação oleuropeína

A análise cromatográfica da oleuropeína foi realizada seguindo a metodologia descrita por Al-Rimawi (2014), por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (Agilent, series 1100) com sistema automatizado de injeção de amostra, bomba mecânica de eluição da fase móvel composta por acetonitrila:água destilada:ácido acético 200:800:1 (v:v:v), coluna C₁₈: 150 x 4.60mm e 5micron (Phenomenex®). Para detecção foi utilizado detector DAD (UV-VIS) a 280nm (UV) com eluição isocrática, velocidade de fluxo de 1,0mL.min⁻¹, ajustando o volume de injeção de 20µL e o uso padrão oleuropeína da *Sigma-Aldrich* para construção da curva de calibração (10 a 600mg.L⁻¹; R² = 0,99) e equação da reta (Apêndice I). Os resultados foram expressos em mg de oleuropeína por g de extrato.

4.1.7.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens dos fragmentos foliar de oliveira foram ampliadas de 120-200 vezes e obtidas por microscopia eletrônica convencional sob vácuo (Tescan VEGA3 LMU microscópio eletrônico de varredura, 1771, São Paulo, SP, Brasil). Para a análise, foi necessário metalizar a amostra (MED 030 da Balzers), revestindo as mesmas com uma camada de ouro ultrafino.

4.1.8 Tratamento estatístico

Os resultados foram tratados pela metodologia de planejamento fatorial e/ou pela análise de variância (ANOVA) seguida das diferenças entre as médias pelo teste de Tukey, utilizando o Software *Statistica* versão 5,0 (*Stat SoftInc* ®, USA) com nível de confiança de 95 %.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO CAPÍTULO I

Neste capítulo são apresentadas as condições de extração com EFS e PLE e o efeito dos parâmetros comumente empregados durante o processo de extração e a influência sobre o rendimento, atividade antioxidante, FT e flavonoides dos extratos obtidos das folhas de oliveiras. Paralelamente serão apresentados e discutidos os resultados experimentais das extrações e das metodologias analíticas empregadas os correlacionando com dados existentes na literatura.

4.2.1 Extração com EFS

As curvas experimentais de extração foram construídas com o rendimento de extração *versus* o tempo, extraídas com fluido sub e supercrítico em diferentes condições de temperatura (20, 40 e 60°C) e pressão (8,0, 16,5 e 25MPa), com fluxo contínuo de 2mL.min⁻¹ e tamanho da partícula de 1 a 3mm e são apresentadas na Figura 4.3. Na Tabela 4.2 são apresentados os resultados de rendimento global, Aa, flavonoides e FT dos extratos de folha de oliveira com fluido sub e supercrítico.

Figura 4.3- Rendimento das extrações com dióxido de carbono de extratos de folha de oliveira em diferentes pressões e temperaturas.

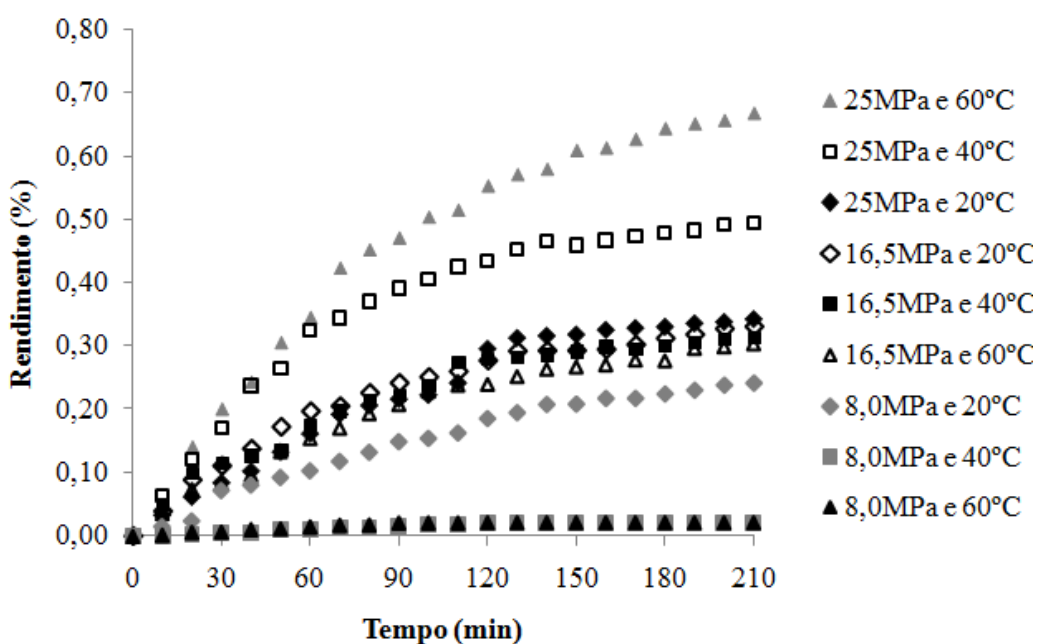


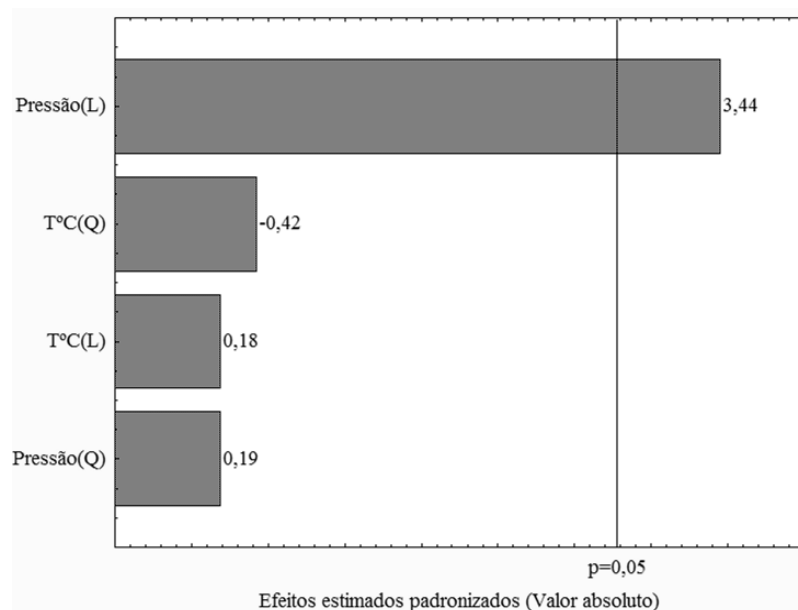
Tabela 4.2- Rendimento, Aa, flavonoides e FT dos extratos de folha de oliveira com EFS

Trat.	Pressão MPa	T°C	Pressão MPa	T°C	Rendimento (%)	Aa (%)	Flavonóides (Eq.mg CAT.g ⁻¹ extrato)	FT (Eq.mg AG.g ⁻¹ extrato)
1	-1	-1	8	20	0,24	10,51 ^{d,e} ±0,60	7,92 ^{c,d} ±1,02	2,69 ^d ±0,17
2	-1	0	8	40	<0,01	*	*	*
3	-1	1	8	60	<0,01	*	*	*
4	0	-1	16,5	20	0,33	20,91 ^a ±0,66	20,48 ^a ±1,42	11,49 ^a ±0,25
5	0	0	16,5	40	0,31	12,13 ^{c,d} ±1,31	7,97 ^{c,d} ±0,59	2,63 ^d ±0,23
6	0	1	16,5	60	0,30	13,28 ^c ±0,99	12,97 ^b ±2,62	3,73 ^c ±0,25
7	1	-1	25	20	0,34	15,85 ^b ±1,03	11,10 ^{b,c} ±0,20	4,98 ^b ±0,15
8	1	0	25	40	0,50	8,70 ^e ±0,50	7,91 ^{c,d} ±0,38	2,63 ^d ±0,23
9	1	1	25	60	0,68	3,93 ^f ±0,44	4,66 ^d ±0,60	2,21 ^d ±0,16

♦ Letras iguais na mesma coluna indica não haver diferença significativa ($p < 0,05$); Condições fixas de extração: fluxo de CO₂ de 2mL.min⁻¹, pressão estática prévia de 15min, tempo de extração de 210min, granulometria da folha de 1-3mm.

*Extrato em quantidade insuficiente para realização das análises

O maior rendimento foi de 0,68% nas extrações com 25MPa e 60°C, seguida da extração a 25MPa e 40°C com 0,50%. Os resultados foram tratados estatisticamente e demonstraram efeito significativo ($p < 0,05$) positivo da pressão sobre o rendimento, dentro da faixa de estudo conforme diagrama de Pareto Figura 4.4.

Figura 4.4- Diagrama de Pareto com os efeitos dos parâmetros das variáveis independentes sobre o rendimento das extrações com fluido sub e supercrítico.

Comportamento similar foi observado por Moura et al., (2012) em extrações com folhas de goiaba (*Psidium guajava*) a 30MPa e 35, 45 e 55°C e De Lucas et al. (2002) em extratos de

folhas de oliveiras utilizando pressão de 25MPa e 40, 50 e 60°C, onde ocorre o acréscimo da taxa de extração com o aumento da temperatura em altas pressões.

No entanto, em condições isobáricas (Figura 4.3) de 8,0 e 16,5MPa o comportamento no rendimento das extrações foram distintos. Ao empregar 8,0MPa, somente foi possível realizar extração à 20°C, a 40 e 60°C a presença de extratos foi insignificante. Na pressão de 16,5MPa, observou-se a diminuição do rendimento a medida que a temperatura de extração aumentava.

O efeito da temperatura no rendimento de extração a pressão constante está relacionado à densidade do CO₂ em função destas variáveis e, foi calculada baseada no Linstrom; Mallard (2001) e são apresentados na Tabela 4.3. A 8,0MPa, nas temperaturas de 40 e 60°C a densidade do CO₂ está abaixo da densidade crítica (0,467g.cm⁻³) referenciada na literatura (LINDY, 2015) e a 16,5MPa e sob as mesmas condições de temperatura também se observa a diminuição da densidade, justificando a ausência ou diminuição do rendimento global nestes tratamentos (Tabela 4.2 e Figura 4.3) gerada pela redução da solubilidade devido à diminuição na densidade do fluido ocasionada pelo aumento da temperatura (BRUNNER, 2015; FIORI et al., 2014; PEREIRA; MEIRELES, 2010; KITADA et al., 2009).

Tabela 4.3- Condições sub e supercrítica de densidade do CO₂ em diferentes pressões e temperaturas.

Pressão (MPa)	Temperatura		
	20°C	40°C	60°C
	293,15K	313,15K	333,15K
	Densidade (g.mL ⁻¹)		
8,0	0,78731	0,28477	0,19677
16,5	0,91910	0,77819	0,61351
25	0,98939	0,88673	0,77604

*Condição supercrítica: 7,2MPa, 31°C e densidade de 0,47g.mL⁻¹ (LINDY, 2015).

A 25MPa e com o aumento da temperatura, evidencia-se a diminuição da densidade (Tabela 4.3) no entanto o rendimento aumenta, neste caso incide o fenômeno conhecido como "*crossover*", que ocorre quando a temperatura aumenta e a densidade do CO₂ no estado supercrítico diminui, mas a solubilidade do soluto se eleva como resultado do aumento da pressão de vapor do soluto (DUBA; FIORI, 2015).

Este fenômeno, também pode ser explicado pela redução da viscosidade, elevação da energia cinética das moléculas e consequente aumento da difusividade do solvente na matriz sólida. Estas variações conferem melhores características ao solvente facilitando a transferência

de massa no interior da matriz vegetal (BRUNNER, 2015; KITADA et al., 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2010; FIORI et al., 2014).

Assim, o aumento ou a diminuição da solubilidade do soluto no fluido supercrítico irá depender da pressão e temperatura de operação do sistema. Próximo da pressão crítica (8,0 a 16,5MPa) o efeito da densidade do fluido é predominante, então um aumento moderado na temperatura conduz a uma grande diminuição na densidade do fluido, e, por conseguinte há uma diminuição da solubilidade do soluto. No entanto, na região da inversão das isothermas que se encontra entre 16,5 a 25MPa, o aumento da pressão de vapor prevalece, e, portanto, a solubilidade acresce com o aumento da temperatura e isso é chamado de comportamento retrógrado da solubilidade do sólido (BRUNNER, 2015; MENDIOLA et al., 2013; CASTRO; GARCÍA, 2002; SALDAÑA; MAZZAFERA; MOHAMED, 1997). Este mesmo comportamento foi evidenciado em extratos de flores de *Eupatorium intermedium* (CZAIKOSKI et al., 2015), folhas de *Mentha spicata* (ALMEIDA; MEZZOMO; FERREIRA, 2012), folhas de *Rosmarinus officinalis* (GENENA et al., 2008) e com frutos de *Euterpe oleracea* (BATISTA et al., 2016).

Mesmo não estando no estado supercrítico (20°C), substâncias em condições de estado próximas ou em torno a esta “região crítica” podem apresentar propriedades semelhantes à de um fluido supercrítico, neste caso o fluido é denominado subcrítico (BRUNNER, 1994) e possibilitando a extração mesmo a 20°C.

Muitos parâmetros afetam o processo de extração, sendo que a eficiência da extração depende da natureza da matriz da amostra, do analito a ser extraído e sua localização dentro da matriz, da técnica e parâmetros empregados na extração entre outros, sendo que estes fatores podem influenciar na atividade dos extratos obtidos (SAHIN; SAMLI, 2013; ROBERTO et al., 2009). Assim a Tabela 4.2 apresenta os valores de FT, flavonoides e atividade antioxidante resultantes das diferentes extrações com dióxido de carbono.

Os maiores teores foram observados nas condições de 20°C e 16,5MPa para a atividade antioxidante (20,91%), FT (11,49Eq.mgAG.g⁻¹ de extrato), e flavonoides (20,48Eq.mgCAT.g⁻¹ de extrato), havendo diferença significativa (p<0,05) em relação às demais condições de extração empregadas.

Segundo relato de vários autores (De Melo; Silvestre; Silva, 2014; Dauksas et al., 2002; De Lucas et al., 2002), um dos compostos de maior importância com atividade antioxidante presentes nas folhas de oliveiras são os tocoferóis, como a vitamina E, os quais são facilmente

extraídos por fluído supercrítico em baixas temperaturas, justificando os maiores teores para Aa, FT e flavonoides (Tabela 4.2) nos extratos obtidos em menor temperatura.

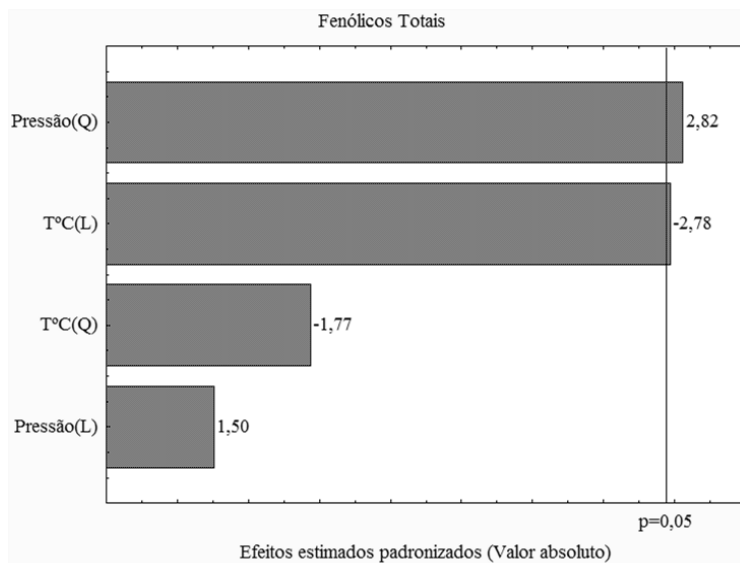
Por outro lado, ao utilizar CO₂ nas temperaturas de 40 e 60°C (Tabela 4.2) observou-se a redução do teor de flavonoides e FT. Alguns estudos reportam que em temperaturas elevadas há possibilidade de extração de compostos cerosos, apolares, lipofílicos como ácidos graxos, terpenos, triglicerídeos, hidrocarbonetos e álcoois que não contribuem muito para a atividade antioxidante além de afetar a estabilidade de polifenóis devido à degradação química e enzimática, causando a diminuição nos teores de fenólicos e a perda de atividade por desnaturação de alguns antioxidantes de baixo peso molecular sensíveis ao calor (KRISHNAIAH et al., 2013; XYNOS et al., 2012; HE et al., 2012; AKOWUAH; MARIAM; CHIN, 2009; REVERCHON; DE MARCO, 2006; TABERA et al., 2004).

Segundo Basegmez et al. (2017), o CO₂ supercrítico não é adequado para a extrações fenólicas ou de compostos polares, especialmente os fenólicos que são altamente polimerizados ou associados com outros componentes celulares, porque a solubilidade da maior parte dos compostos fenólicos é muito baixa em CO₂, independentemente da temperatura e pressão utilizada, dados estes que corroboram com o presente estudo.

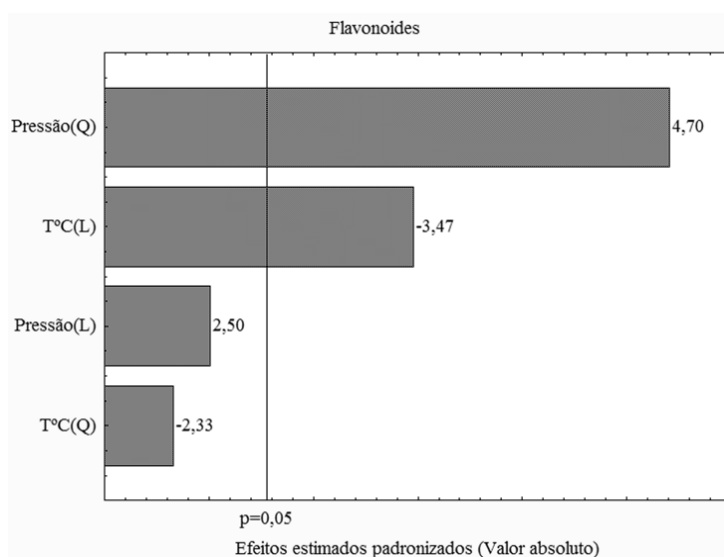
Correlacionando a Tabela 4.2 e a Figura 4.5.a e b do diagrama de Pareto, observamos que a pressão (Q) exerceu efeito significativo ($p < 0,05$) positivo no teor de FT e flavonoides respectivamente, indicando que no ponto intermediário (16,5MPa) obtemos teores mais elevados, no entanto a temperatura (L) exerceu um efeito significativo negativo, concluindo que em níveis extremos de temperaturas obtemos menor concentração de FT e flavonoides. Não evidenciamos efeitos significativos da pressão e temperatura sobre a Aa (Figura 4.5.c) no presente estudo.

Os extratos obtidos por extração com dióxido de carbono sub e supercríticos foram submetidos à análise cromatográfica de alta eficiência (HPLC), para análise do teor de oleuropeína por ser o componente majoritário presente em folhas de oliveiras, no entanto não foi identificada a presença deste composto nos extratos obtidos por extração sub e supercrítica. Este dado está de acordo com os publicados por Xynos et al. (2012), estes autores não detectaram oleuropeína em extrações com dióxido de carbono e 5% de etanol como co-solvente, sendo necessário a adição de 20% de etanol como co-solvente para a identificação de oleuropeína nos extratos obtidos.

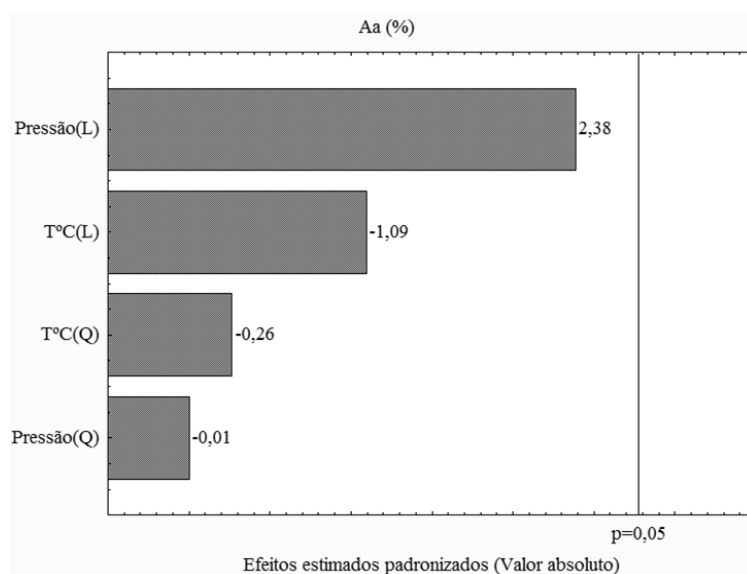
Figura 4.5- Diagrama de Pareto com os efeitos dos parâmetros das variáveis independentes sobre FT (8.a), flavonoides (8.b) e Aa (8.c) das extrações com fluido sub e supercrítico.



(a)



(b)



(c)

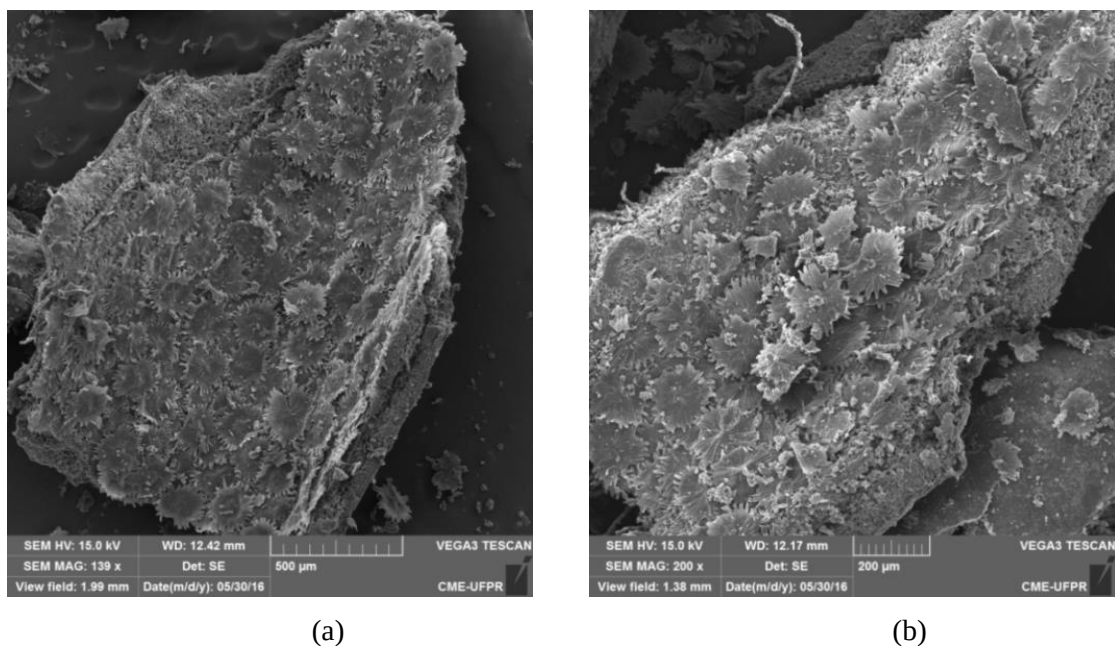
4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com EFS

Na Figura 4.6.b, a microscopia eletrônica de varredura revelou diferenças visuais na estrutura interna do fragmento foliar de oliveira com aplicação do fluido supercrítico quando comparado com o fragmento foliar antes da extração, Figura 4.6.a. Após a extração a 60°C e 16,5MPa, a estrutura interna apresenta o tecido expandido, com aspecto esponjoso e externamente observa-se ruptura parcial dos tricomas peltados.

Isto pode ser explicado pelo efeito do fluido supercrítico aplicado sobre as estruturas das folhas de oliveiras durante o processo de extração, viabilizando a sua penetração na matriz vegetal e a remoção do composto em estudo. Alguns autores observaram o mesmo comportamento (AYAS; YILMAZ, 2014; RODRIGUES et al., 2014; ZERMANE et al., 2014; HERZI et al., 2013; ZIZOVIC et al., 2005).

De acordo com Brunner (1994), o processo de solubilização do extrato em uma matriz vegetal ocorre em várias etapas, sendo necessária a penetração do fluido supercrítico na estrutura do tecido vegetal, ocasionando o “inchaço” das membranas pela dilatação dos canais intercelulares, conduzindo a uma queda na resistência à transferência de massa e propiciando a migração do extrato para o exterior da matriz vegetal.

Figura 4.6- MEV folhas de oliveira antes da extração (a) e depois da extração com fluido supercrítico a 60°C e 16,5MPa (b).



4.2.3 Modelagem matemática das extrações com EFS

A Tabela 4.4 apresenta os parâmetros de extração como rendimento, densidade do solvente e a solubilidade do soluto em cada condição de extração.

Tabela 4.4-Rendimento, densidade do CO₂ e solubilidade dos extratos de folhas de oliveira com fluido sub e supercrítico.

Tratamento	Rendimento (%) ^A	ρ solvente(g.cm ⁻³) ^B	Solubilidade (g .g ⁻¹ solvent) ^C
80 MPa/20°C	0,24	0,828	0,23E ⁻³
80 MPa/40°C	<0,01	0,278	D
80 MPa/60°C	<0,01	0,192	D
165 MPa/20°C	0,33	0,915	0,43E ⁻³
165 MPa/40°C	0,31	0,802	0,43E ⁻³
165 MPa/60°C	0,30	0,652	0,31E ⁻³
250 MPa/20°C	0,34	0,963	0,33E ⁻⁴
250 MPa/40°C	0,50	0,879	0,65E ⁻³
250 MPa/60°C	0,68	0,787	0,66E ⁻³

* Fluxo de massa do solvente (g.min⁻¹): [8,0 MPa⇒1.844; 16,5 MPa⇒1.952 e 25MPa⇒2.026].

* Para as extrações com CO₂ a temperatura de revestimento da bomba foi fixada em 7°C e as taxas de fluxo de massa foram obtidos a 7°C e cada pressão [P (MPa)/densidade (g.cm⁻³): 8,0/0,922; 16,5/0,976; 25,0/1,013].

^AValores obtidos aos 210min de extração.

^BDensidade estimadas em condições dentro do extrator (condições de extração) as quais foram calculados a partir Linstrom; Mallard (2001).

^CValores estimados pelo ajuste linear no período inicial de extração (R²>0,98)

^DExtrato insuficiente para realização da análise

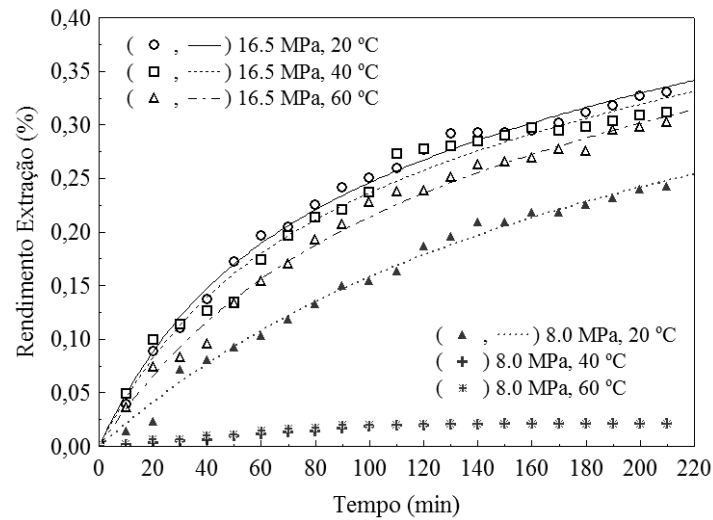
As curvas globais de extração foram modeladas considerando o modelo cinético Sovová (2005) e o modelo adaptado de Pardo-Castaño (2015). Os parâmetros cinéticos obtidos para o modelo Sovová são apresentados na Tabela 4.5 e os parâmetros ajustados para o modelo Pardo-Castaño (2015) são apresentados na Tabela 4.6. Além do parâmetro ajustado de cada modelo, a quantidade máxima de extrato disponível (M0: g de extrato.g de matéria-prima⁻¹) foram necessários para a definição e a garantia de uma montagem mais adequada dos modelos, considerando as diferentes condições de extração. Para o modelo Sovová os valores de m0 foram de 0,008 e 0,006, 25 e 16,5MPa, respectivamente e para o modelo Pardo-Castano o valor foi fixado em 0,008 para todas as condições.

É possível observar que ambos os modelos cinéticos considerados para a extração de folhas de oliveira com CO₂ sub e supercrítico foram capazes de se correlacionar bem com o processo de extração em todas as condições estudadas. Os valores experimentais e calculados do modelo cinético ajustado para extrações com CO₂ são mostrados na Figura 4.7. Os modelos

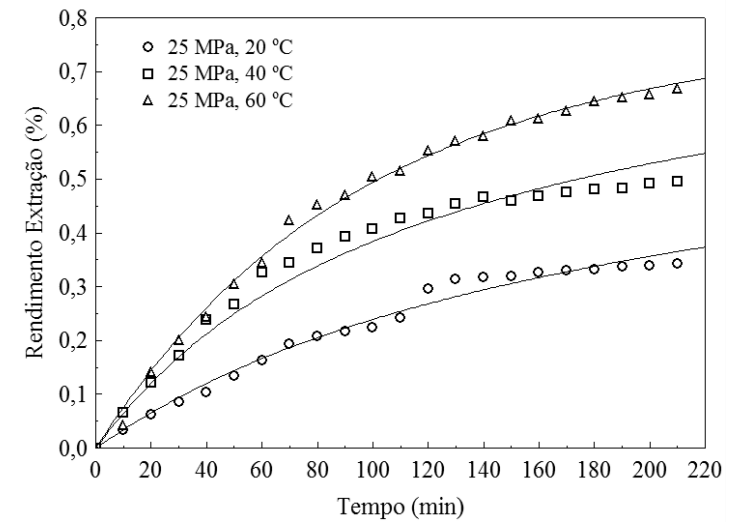
cinéticos descrevem adequadamente os resultados experimentais do processo de extração de folha de oliveira, em extrator de leito fixo usando CO₂ sub e supercrítico, sob as diferentes condições de pressão e temperatura com valores de R^2 variando de 0,977-0,999 (Tabela 4.5 e 4.6 e a Figura 4.7.a, b, c e d). Observou-se que todas as condições testadas tiveram taxas iniciais mais elevadas de extração e o rendimento máximo a extração foi alcançado em cerca de 120 minutos. A influência da temperatura (40 e 60°C) e pressão a 8,0MPa sobre a cinética da extração pode ser visualizada na Figura 4.7 (a) e (c) por ambos os modelos.

No modelo Sovová, o coeficiente de transferência de massa externa, K_a , está associada à fração de extrato facilmente extraível (R) no primeiro período da extração (CER) a qual foi mais rápido, com 6,02min e K_a 20,56min⁻¹ na extração a 25MPa e 60°C, no entanto os menores K_a estão associados às condições 16,5MPa e 40°C com K_a 3,56min⁻¹. O coeficiente de transferência de massa interna, K_{sa} , representa o período onde o extrato está menos acessível e se refere ao último período de extração. Neste período os valores do K_{sa} variaram de 0,2289 a 2,6min⁻¹x10³, com ocorrência dos maiores valores nas condições de maior rendimento de extração, pressão e temperatura (Tabela 4.5), sob estas condições, o contato ao extrato de difícil acesso é viabilizada pela associação destes parâmetros à pressão de vapor do soluto e ao aumento do poder de solvatação do solvente. Resultados semelhantes são relatados na literatura (SANTOS, et al., 2016; SODEIFIAN et al., 2016).

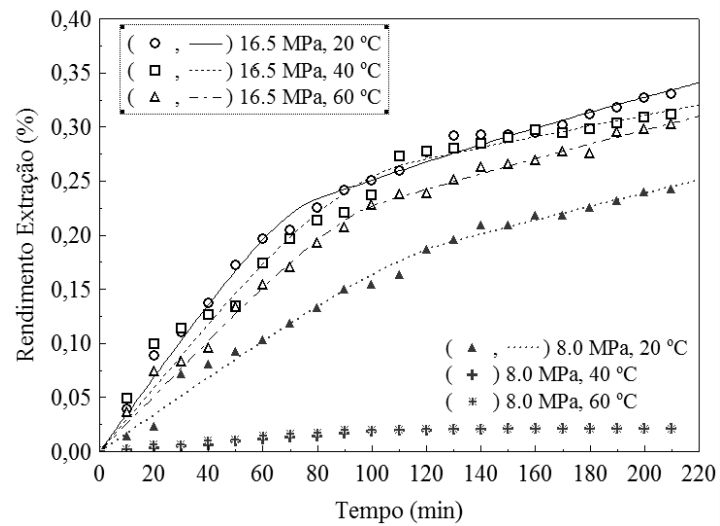
Figura 4.7- Modelagem das curvas de extração com EFS utilizando os modelos Pardo-Castaño (a e b) e Sovová (c e d) agrupados pela pressão em diferentes temperaturas.



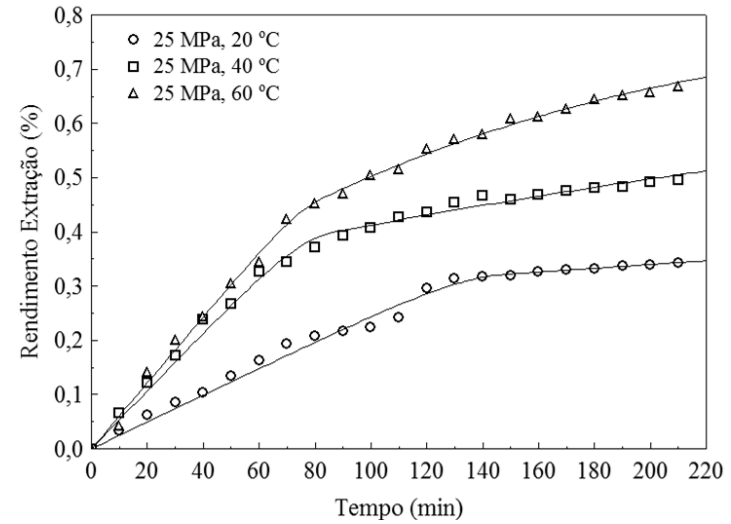
(a)



(b)



(c)



(d)

Tabela 4.5- Parâmetros ajustados para o modelo Sovová para extrações com CO₂ sub e supercrítico.

P (MPa)	T (°C)	Z	W	R	Rmsd (100)	R ²	t _{CER} (min)	t _{FER} (min)	k _q a (min ⁻¹) (x10 ²)	k _s a (min ⁻¹) (x10 ³)
8,0	20	5,16 ± 4,19	0,0273 ± 0,0109	0,76 ± 0,07	0,007	0,9916	16,60	127,98	9,74	0,5804
8,0	40	*	*	*	*	*	*	*	*	*
8,0	60	*	*	*	*	*	*	*	*	*
16,5	20	4,55 ± 3,02	0,0343 ± 0,0058	0,67 ± 0,04	0,007	0,9945	12,57	79,35	7,90	0,7844
16,5	40	1,76 ± 0,45	0,0210 ± 0,0129	0,59 ± 0,06	0,013	0,9845	39,17	113,85	3,56	0,4927
16,5	60	5,15 ± 3,40	0,0287 ± 0,0066	0,68 ± 0,04	0,007	0,9957	14,31	102,91	12,93	0,6770
25,0	20	7,18 ± 6,96	0,0098 ± 0,0133	0,63 ± 0,07	0,011	0,9929	16,70	146,77	11,59	0,2289
25,0	40	5,94 ± 4,60	0,0326 ± 0,0077	0,55 ± 0,04	0,010	0,9956	11,24	85,53	10,54	0,7588
25,0	60	9,29 ± 12,56	0,0993 ± 0,0115	0,58 ± 0,08	0,009	0,9978	6,02	81,48	20,56	2,6000

•Densidade real da folha de oliveira: 1,3746 ± 0,0004 g.cm⁻³ medido em picnômetro de gás hélio, modelo AccuPyc II 1340, (Micromeritics)
M0 (25MPa) = 0,008 e M0 (16,5MPa) = 0,006. * Não calculado.

Tabela 4.6- Parâmetros ajustados para o modelo cinético Pardo-Castaño para extrações com CO₂ sub e supercrítico.

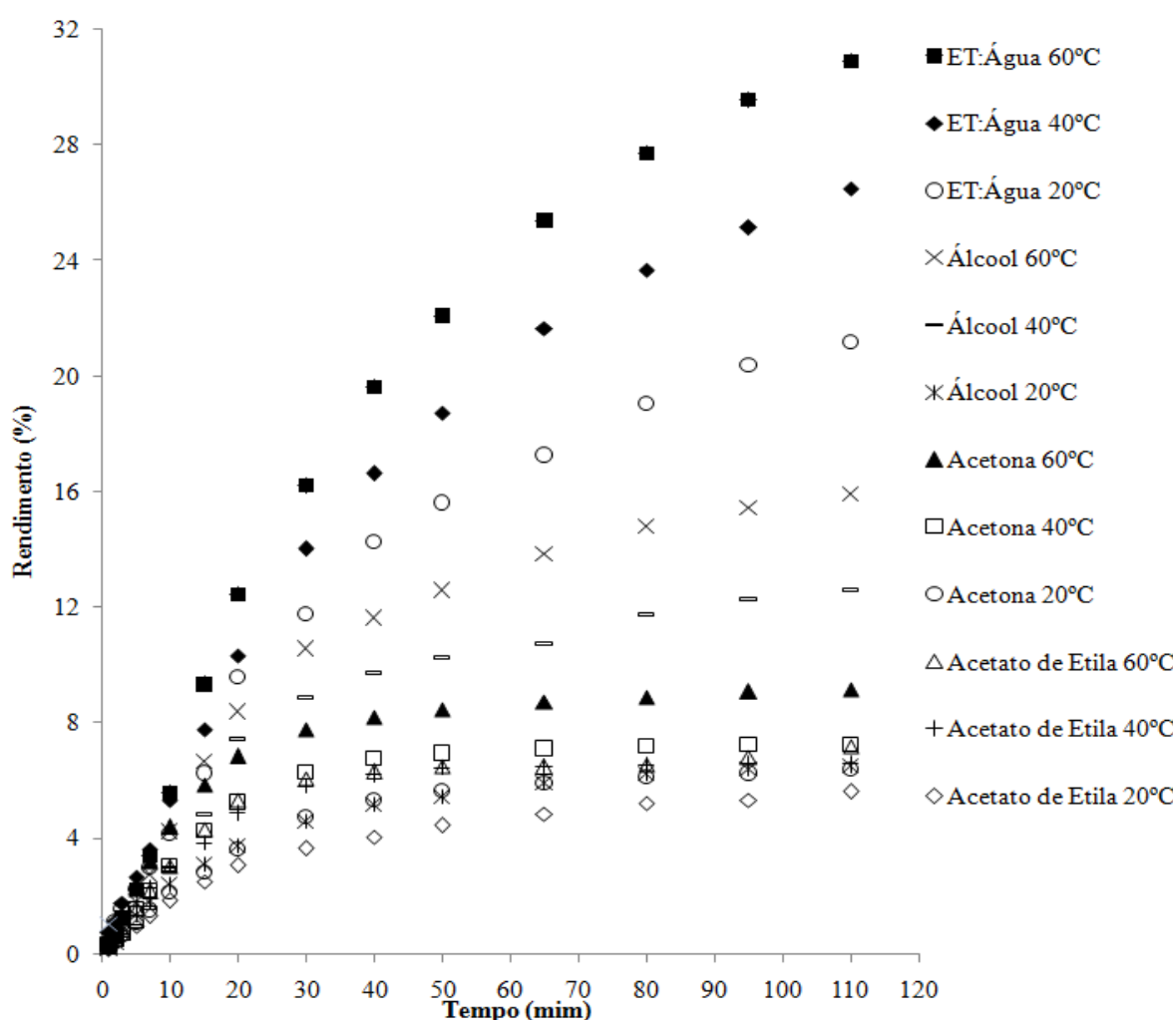
P (MPa)	T (°C)	y^{Sat}	x_m	K	Rmsd(100)	R ²
8,0	20	(0,2212 ± 0,01925)E ⁻²	0,8	56,67 ± 23,57	0,67E ⁻²	0,9924
8,0	40	*	*	*	*	*
8,0	60	*	*	*	*	*
16,5	20	(0,2898 ± 0,0317) E ⁻²	0,8	90,82 ± 19,30	0,68E ⁻²	0,9949
16,5	40	(0,2586 ± 0,0493) E ⁻²	0,8	89,74 ± 34,65	1,18E ⁻²	0,9831
16,5	60	(0,1885 ± 0,0243) E ⁻²	0,8	66,86 ± 19,61	0,77E ⁻²	0,9926
25,0	20	(0,1560 ± 0,0382) E ⁻²	0,8	24,09 ± 13,24	1,13 E ⁻²	0,9831
25,0	40	(0,2707 ± 0,0872) E ⁻²	0,8	14,01 ± 4,19	2,07E ⁻²	0,9774
25,0	60	(0,2104 ± 0,0227) E ⁻²	0,8	4,21 ± 1,08	1,25 E ⁻²	0,9964

m0 = 0,008 para todos. * Não calculado.

4.2.4 Extração com PLE e extração convencional

A Figura 4.8 apresenta o rendimento de extração da folha de oliveira com líquido pressurizado em função do tempo utilizando diferentes solventes (acetato de etila, acetona, etanol e etanol:água (80:20,v:v)), com fluxo contínuo de $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, pressão constante de 10MPa, tamanho da partícula de 1 a 3mm e em diferentes temperaturas (20, 40 e 60°C).

Figura 4.8- Rendimento da extração com PLE de extratos de folha de oliveira com diferentes solventes e temperaturas.



Nas extrações com solvente etanol:água (80:20,v:v) observam-se os maiores rendimentos (21,16 a 30,91%), seguido das extrações com etanol, acetona e acetato de etila (Tabela 4.7 e Figura 4.8), evidenciando que o rendimento foi influenciado pela solubilidade dos compostos presentes na matriz sólida em relação ao solvente, ou seja o aumento da difusividade

do solvente sobre a matriz aumenta a velocidade de extração e o rendimento final que, ainda por vezes pode ser maximizado pela utilização de misturas de solventes que atuam de uma forma sinérgica (hidro alcoólico) e aliados a PLE propiciaram maiores rendimentos e/ou extração de compostos de interesse. Fato também reportado na literatura onde os rendimentos de extração de plantas são dependentes da natureza e polaridade do solvente, a qual deve ser semelhante a do analito (SUMERE et al., 2018; SETYANINGSIH et al., 2015.b; MORET; CONTE, 2014; MUSTAFA; TURNER, 2011; KIRITSAKIS et al., 2010).

Tabela 4.7- Rendimento, IC₅₀, teores de flavonoides, FT e oleuropeína dos extratos da folha de oliveira obtidos por PLE.

Tratamento	Rendimento (%) Média e desvio padrão	[] de extrato IC ₅₀	Flavonóides Eqmg de Catequina.g ⁻¹ de extrato	Fenólicos Eqmg de Ác. Gálico.g ⁻¹ de extrato	Oleuropeína mg.g ⁻¹ de extrato
Acetato Etila 20°C	5,60 ^d ±0,07	1,96 ^d ±0,12	28,28 ^b ±0,71	27,76 ^{g,h} ±1,43	23,24
Acetato Etila 40°C	6,60 ^e ±1,98	2,25 ^e ±0,09	17,44 ^f ±0,11	17,12 ^h ±1,79	19,88
Acetato Etila 60°C	7,17 ^e ±1,51	2,02 ^d ±0,06	21,47 ^d ±0,50	49,69 ^g ±3,60	29,05
Acetona 20°C	6,37 ^e ±0,68	1,26 ^c ±0,04	8,86 ⁱ ±0,34	79,74 ^f ±4,37	34,35
Acetona 40°C	7,2 ^e ±0,29	1,13 ^c ±0,06	10,71 ^h ±0,61	91,67 ^f ±2,98	33,86
Acetona 60°C	9,16 ^{d,e} ±0,15	0,81 ^b ±0,05	15,99 ^{f,g} ±0,40	140,79 ^e ±1,43	38,26
Etanol 20°C	6,48 ^e ±0,39	0,83 ^b ±0,05	23,98 ^c ±0,30	259,55 ^c ±6,24	50,88
Etanol 40°C	12,62 ^{c,d} ±0,46	0,80 ^b ±0,01	24,12 ^c ±1,05	251,44 ^c ±8,26	55,08
Etanol 60°C	16,94 ^{b,c} ±2,44	0,47 ^a ±0,01	33,43 ^a ±0,20	386,42 ^a ±0,83	73,65
Etanol:H ₂ O 20°C	21,16 ^b ±2,15	0,82 ^b ±0,02	14,80 ^g ±0,86	195,15 ^d ±8,71	34,61
Etanol:H ₂ O 40°C	26,56 ^a ±2,78	0,82 ^b ±0,01	19,36 ^e ±0,40	256,69 ^c ±7,97	37,17
Etanol:H ₂ O 60°C	30,91 ^a ±1,97	0,53 ^a ±0,01	22,07 ^d ±0,70	300,57 ^b ±6,07	43,92
♦ Convencional	17,80±0,19	1,36±0,02	30,53±1,81	6,04±0,04	*

♦ Letras iguais na mesma coluna indica não haver diferença significativa (p<0,05); Condições fixas de extração: 10,3MPa, pressurização estática prévia de 15 min, granulometria da folha de 1-3mm e fluxo do solvente de 2mL.min⁻¹. *Não analisado e/ou calculado; ♦ Sistema convencional de extração: pressão≈0,098MPa, 60°C, 220ml de etanol 99%, 110 min, 0,022Kg de folha de oliveira

Este comportamento reflete a natureza hidrofílica da maioria dos compostos presentes na folha de oliveira. Dados similares foram descritos por Chinnarasu et al. (2015) obtendo um rendimento de 36,51% numa extração hidro alcoólica (50:50 v:v) com PLE de folhas de oliveira, por Xynos et al. (2014) onde a extração com PLE e solvente hidro alcoólico facilitou o isolamento dos compostos polares de interesse e proporcionaram rendimentos entre 14,60 a 53,90% em folhas de oliveira e Xynos et al. (2012) com obtenção de rendimento de 26,7% nas extração utilizando mistura hidro alcoólica 40:60(v:v) em folhas de oliveira. A presença de água

na mistura de solventes pode intumescer a matriz da planta e justifica o aumento nas extrações ao permitir que o solvente penetre mais facilmente na matriz sólida (GALANAKIS et al., 2011).

Em todos os tratamentos estudados, independente do solvente em uso, os maiores rendimentos estão associados às temperaturas mais elevadas, a qual diminui a viscosidade e a tensão superficial do solvente e consequentemente aumenta o coeficiente de difusão e as taxas de transferência de massa, auxiliando na penetração no interior da matriz e facilitam o contato do mesmo com os compostos, e consequentemente, melhorando o processo de extração. Comportamento evidenciado por Setyaningsih et al. (2015.b); Osório-Tobón; Meireles (2013); Mustafa; Tuner (2011); Nieto et al. (2010), Ju; Howar (2003) e Camel (2001), os quais ressaltam que a energia térmica envolvida pode interromper as fortes interações entre as moléculas do soluto e os sítios ativos da matriz, auxiliando na liberação de moléculas alvo e aumentando as taxas de extrações.

Rendimento global das extrações, teor de flavonoides e FT relacionado ao aumento de temperatura utilizando a PLE foram observados em partes aéreas de *Dracocephalum kotschy* (KAMALI et al., 2016), em extração em raiz de *Scutellaria pinnatifida* (GOLMAKANI et al., 2014), em extração de cafeína e catequina de chá verde (BERMEJO et al., 2015), em extrações de compostos fenólicos de grãos de arroz (SETYANINGSIH et al., 2015.a), em extratos de casca de jabuticaba (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012) entre outros.

Ao utilizar os solventes acetona e acetato de etila (Tabela 4.7), os extratos apresentaram baixo rendimento, teores de FT, oleuropeína e elevado IC₅₀, quando comparados com o obtido a 60°C com etanol, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais extratos. Estes resultados de extração com solventes orgânicos em folhas de oliveira podem ser considerados relevantes quando comparado com outros estudos empregando diferentes condições e/ou métodos de extração. Xie et al. (2015) obtiveram teores de FT de 245,2mg AG.g⁻¹ e oleuropeína 6,53mg.g⁻¹ de extrato empregando extração com ultrassom e pressão reduzida a 50°C e 75% de etanol, Abaza et al. (2011) obtiveram teores de FT de 16,52 a 24,93mgAG.g⁻¹ e flavonoides 6,23 a 21,47mgCE.g⁻¹ de extrato utilizando extração por maceração a temperatura ambiente, pressão atmosférica e diferentes solventes. Ferreira et al. (2007) obtiveram IC₅₀= 0,91 a 2,32mg.mL⁻¹ utilizando a técnica de extração Soxhlet com metanol como solvente e Hayes et al. (2011) obtiveram IC₅₀=34,58mg.mL⁻¹ utilizando técnica convencional de extração.

Como mencionado anteriormente, a extração com PLE se destaca pelo menor consumo de solvente e maior capacidade de extração, pois os teores de oleuropeína foram considerados elevados (19,88 a 73,65mg OLE.g⁻¹ de extrato, Tabela 4.7) quando comparado ao estudo de

Lee et al. (2009) empregando a técnica de extração com refluxo, seguido do fracionamento com etanol (80%), butanol e acetato de etila, obtendo concentrações de oleuropeína de 1,02, 1,527 e 1,733mg Ole.g⁻¹extrato, respectivamente.

A atividade apresentada pelos extratos alcoólicos e hidro alcoólicos no presente estudo, está associada aos compostos presentes na folha de oliveira como alguns fenóis, ácidos benzoicos e cinâmicos, secoiridóides, flavonoides e mais especificamente e maior proporção a oleuropeína e os seus derivados (LIU et al., 2018; TSIMIDOU; PAPOTI, 2010; KHALIL et al., 2013), com propriedade redox dos seus grupos hidroxilo-fenólicos e as relações estruturais entre as diferentes partes do composto químico (FERREIRA et al., 2007).

A literatura reporta que em geral, quanto maior a temperatura e mais polar for o solvente, menor é a seletividade da extração em função da variedade de compostos extraídos, além de citar a baixa solubilidade dos polifenóis em água, justificando a maior atividade do extrato alcoólico em relação ao hidro alcoólico (RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015; MORET et al., 2014). Dados similares foram obtidos em um estudo realizado por Tripodo et al. (2018), onde o solvente que extraiu mais compostos fenólicos do Goji berry (*Lycium barbarum L.*) foi o etanol puro, seguido da mistura hidro alcoolica (50:50, v:v) e o menor teor de fenólicos foi com água pura.

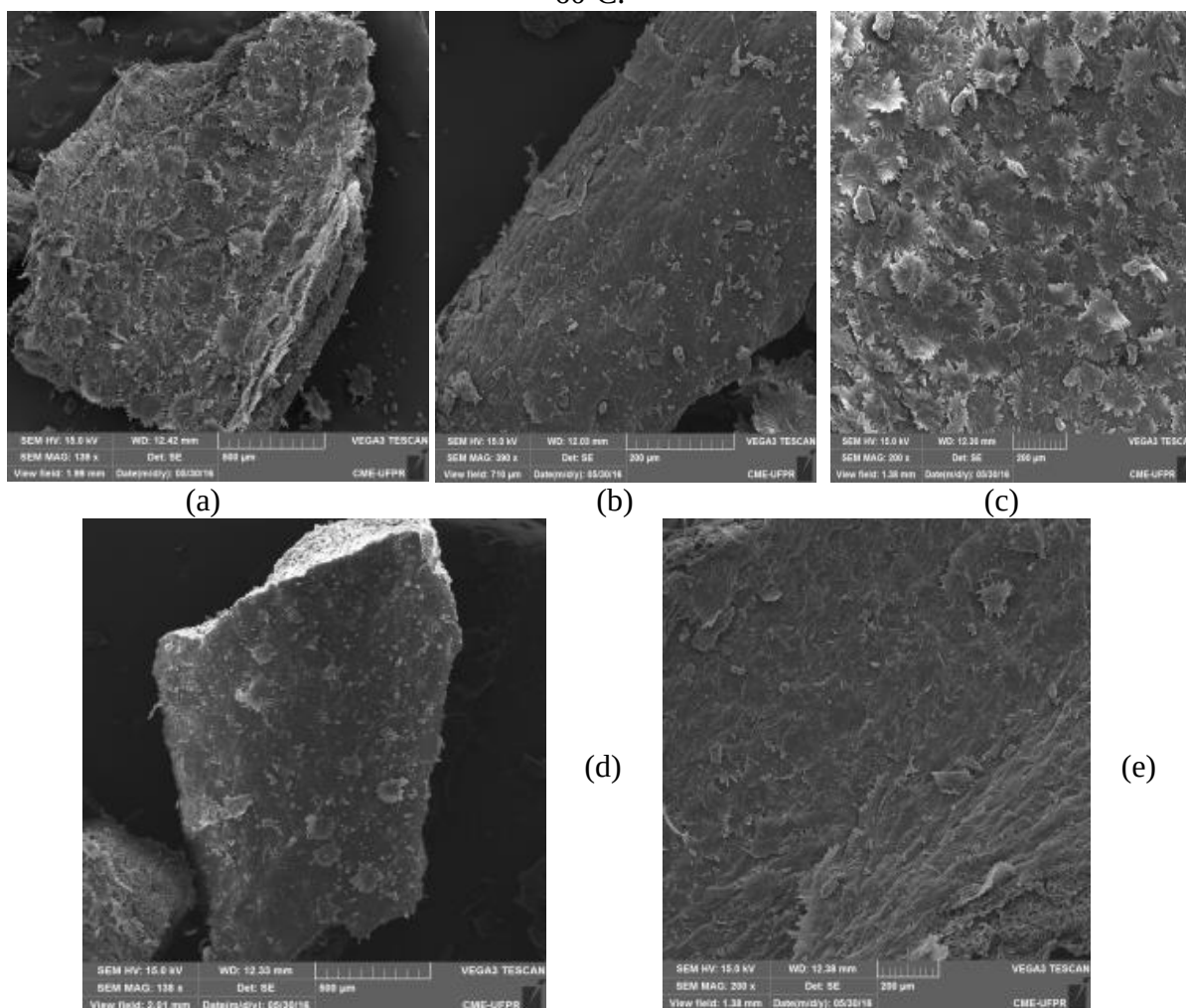
Embora o rendimento do sistema convencional de extração (17,8 %) tenha sido superior a PLE sob condições similares (16,94%, 60°C, etanol como solvente), os teores de FT (6,04mgAG.g⁻¹), flavonoides (30,53 mgCAT.g⁻¹) e IC₅₀ (1,36) foram inferiores, quando comparados ao extrato obtido por PLE (Tabela 4.7), demonstrando que a PLE apresenta vantagens em relação ao processo convencional como a facilidade de operação, alta reprodutibilidade dos parâmetros de extração, obtenção de compostos termicamente degradáveis, diminuição da tensão superficial do solvente e aumentando a solubilidade e seletividade do analito (MORET et al., 2014; MUSTAFA; TUNER, 2013).

4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com PLE

A Figura 4.9.a mostra a superfície abaxial da folha de oliveira em MEV antes da extração e após a extração com os diferentes solventes (Figura 12.b, c, d, e), onde é possível observar que grande parte dos tricomas foram solubilizados pelos solventes acetato de etila e etanol e como consequência proporcionou aumento dos teores de flavonoides, quando comparado com os demais solvente. Segundo Koudounas et al. (2015) e Liakopoulos;

Stavrianakou; Karabourniotis, (2006) os tricomas estão localizadas em maior quantidade na região abaxial da folha, que consistem de uma pequena haste incorporado de células múltiplas epidérmicas todas no mesmo plano formando um escudo, basicamente constituída de quercetina (LIAKOPOULOS; STAVRIANAKOU; KARABOURNIOTIS, 2006), um importante flavonoide que apresenta baixa solubilidade em água ($<0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$) (Fernández-Ponce et al., 2015; Smith et al., 2001), por vezes pode ter a solubilidade aumentada com solventes orgânicos (ALTHANS; SCHRADER; ENDERS, 2014; CHEBIL et al., 2010).

Figura 4.9- MEV de fragmentos foliares de oliveira antes da extração (a) e após a extração com acetato de etila (b), acetona (c), etanol (d) e Etanol:água(80:20, v:v) (e) a 10,3MPa e 60°C.



Estudos de micrografias realizados por outros autores (RODRIGUES et al., 2014; ALCÁZAR-ALAY et al., 2015), em diferentes matrizes demonstram alterações na estrutura vegetal após o processo de extração com líquido pressurizado.

Os estudos de Mkaouar et al. (2015), observaram alterações semelhantes nas estruturas de folhas oliveira utilizando um processo de extração termo-mecânico induzido pela submissão da matéria-prima por um curto período de tempo ao vapor saturado, seguido por uma queda brusca de pressão em direção ao vácuo.

4.2.6 Modelagem matemática com PLE

A cinética de extração da folha de oliveira (*Olea europaea*) com PLE foi investigada por modelagem das curvas de extração utilizando dois modelos, Pardo-Castaño e Sovová e os valores experimentais e calculados a partir dos modelos cinético ajustados são apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9 e agrupados por tipo solvente.

Tabela 4.8- Parâmetros ajustados para o modelo cinético Pardo-Castaño nas extrações com PLE

P (MPa)	T (°C)	y^{Sat}	x_m	K	$Rmsd(100)$	R^2
Acetato de Etila						
10,3	20	$0,1746 \pm 0,0086$	0,85	5272 ± 2198	0,07	0,9918
10,3	40	$0,2519 \pm 0,0157$	0,81	18233 ± 8992	0,12	0,9830
10,3	60	$0,2644 \pm 0,0296$	0,81	8587 ± 3951	0,25	0,9931
Etanol						
10,3	20	$0,2701 \pm 0,0133$	0,85	1814 ± 318	0,08	0,9989
10,3	40	$0,1586 \pm 0,0217$	0,65	834 ± 455	0,65	0,9886
10,3	60	$0,1996 \pm 0,0182$	0,65	101 ± 37	0,35	0,9970
Acetona						
10,3	20	$0,1989 \pm 0,0088$	0,82	9085 ± 4548	0,09	0,9989
10,3	40	$0,3418 \pm 0,0526$	0,82	2192 ± 601	0,32	0,9881
10,3	60	$0,3022 \pm 0,0173$	0,75	5033 ± 1470	0,18	0,9983
Etanol:Água (80:20 v:v)						
10,3	20	$0,1727 \pm 0,0153$	0,60	22 ± 6	0,39	0,9974
10,3	40	$0,1729 \pm 0,0067$	0,60	$6.5 \pm 0,7$	0,17	0,9997
10,3	60	$0,1610 \pm 0,0189$	0,60	$2.3 \pm 0,8$	0,56	0,981

*Para o modelo de Pardo-Castaño a massa de extrato disponível e passível de ser extraído para cada solvente (m_0 , expresso em % em relação à massa de matriz) foi fixada em $m_0 = 0,33$.

As curvas apresentadas nas Figuras 4.10 4.11 e os elevados valores de R^2 apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9 mostram que ambos os modelos (Pardo-Castaño e Sovová) se ajustaram bem aos dados experimentais.

Na Tabela 4.8 observa-se que o parâmetro K diminui e o parâmetro y^{Sat} aumentou na medida em que a temperatura de extração aumentou quando o solvente etanol e hidro alcoólicos

foram usados. Isso ocorre porque o K está diretamente relacionado com a constante de equilíbrio de adsorção do soluto na primeira camada e nas camadas subsequentes e y^{Sat} está relacionado a solubilidade do soluto e suas relação soluto-sólido (PARDO-CASTAÑO et al., 2015), nesta situação a utilização de temperaturas mais elevadas nos processo de extração provocam um aumento do movimento molecular e auxiliam nas perturbações das interações matriz-analito causada pelas ligações de *Van de Waals*, ligações de hidrogênio e atrações dipolo, além de diminuir a tensão superficial e a viscosidade do solvente, facilitando a permeabilidade na parede da matriz, viabilizando o aumento da difusividade e como consequência o aumento da extração (MUSTAFA; TUNER, 2011).

Os valores do coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_s) foram maiores do que os coeficientes de transferência de massa na fase fluida (K_f) praticamente para todas as curvas avaliadas utilizando o modelo Sovová (Tabela 4.9), este valores indicam que o mecanismos de difusão é mais lento ($K_s > K_f$) do que o mecanismo de convecção na extrações com PLE de folhas de oliveiras porque o soluto localizado internamente nas partículas é mais difícil de ser removido em relação ao soluto localizado na superfície das partículas.

A inclinação das linhas nas Figuras 4.10 e 4.11 representam a taxa de transferência massa em um período de taxas constantes de extrações (t_{CER}) e pode ser considerado o tempo mínimo para o processo de extração. Em geral os valores das taxas constantes de extração (t_{CER}) da Tabela 4.8 diminuíram com o aumento da temperatura, o que indica que o tempo da t_{CER} é menor e o rendimento aumenta com o aumento da temperatura. Já no período de queda da taxa de extração (t_{FER}) (Tabela 4.8) os períodos de extração são mais prolongados e não apresentaram uma tendência de comportamento com a variação da temperatura e do solvente.

Segundo Ameer, Shahbaz; Kwon (2017), compostos presentes na matriz, apresentam-se na forma ligada na matriz amostral e temperaturas elevadas são usadas para diminuir a energia de ativação para superar as forças interativas (coesivas e adesivo) entre as moléculas da matriz e do solvente, provocando a dessorção, justificando o comportamento apresentado nos cálculos da modelagem matemática da tabela 4.8.

Comparando os dois métodos de extração EFS e PLE, os extratos obtidos por PLE, principalmente com os solventes hidro alcoólico e etanol, evidenciaram melhor atividade antioxidante. Estes possivelmente facilitam a extração de compostos fenólicos, flavonoides e outras categorias de compostos com propriedade antioxidantes (XYNOS et al., 2012).

Estudos realizados por Otero-Pareja et al. (2015) comparando extrações com PLE e CO_2 supercrítico em resíduo de polpa de uvas vermelhas obtiveram resultados similares ao nosso

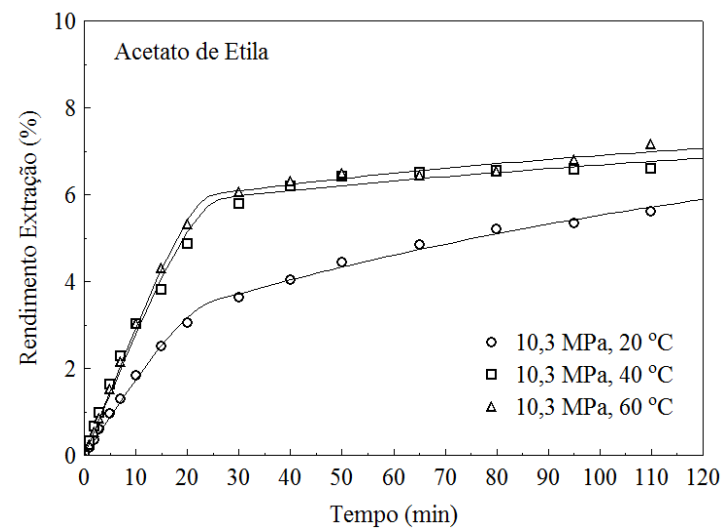
estudo indicando maiores rendimentos nos tratamentos que utilizam temperaturas mais elevadas e melhores resultados na atividade antioxidante nos extratos obtidos com PLE.

Tabela 4.9- Parâmetros ajustados para o modelo Sovová nas extrações com PLE.

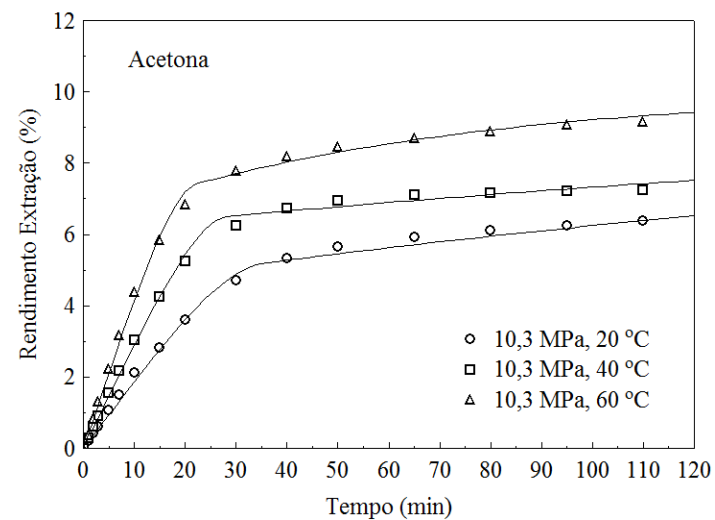
P (MPa)	T (°C)	Z	W	R	Rmsdx (100)	R ²	t _{CER} (min)	t _{FER} (min)	k _f a(min ⁻¹) (x10 ²)	k _s a(min ⁻¹) (x10 ³)
Acetato de etila.										
10,3	20	2,89 ± 0,92	0,100 ± 0,013	0,600 ± 0,035	0,08	0,998	5,98	25,11	5,73	2,4
10,3	40	2,22 ± 0,63	0,072 ± 0,048	0,273 ± 0,056	0,18	0,996	8,38	27,33	4,71	1,8
10,3	60	3,66 ± 1,04	0,092 ± 0,028	0,268 ± 0,032	0,09	0,999	5,29	25,22	8,02	2,31
Acetona										
10,3	20	2,21 ± 0,46	0,052 ± 0,016	0,504 ± 0,032	0,11	0,998	10,69	35,53	5,45	1,1
10,3	40	2,94 ± 0,79	0,050 ± 0,020	0,364 ± 0,029	0,13	0,998	7,05	28,25	7,39	1,1
10,3	60	2,97 ± 0,91	0,198 ± 0,057	0,293 ± 0,055	0,16	0,998	5,38	22,16	7,94	4,4
Etanol										
10,3	20	3,32 ± 1,83	0,332 ± 0,049	0,550 ± 0,077	0,11	0,998	3,84	19,13	7,82	7,19
10,3	40	9,99 ± 4,52	0,087 ± 0,029	0,547 ± 0,119	0,39	0,995	2,46	29,84	26,02	2,1
10,3	60	10,01 ± 4,23	0,212 ± 0,022	0,534 ± 0,055	0,16	0,999	1,99	26,03	27,08	5,1
Etanol:água (80:20 v:v)										
10,3	20	9,98 ± 3,61	0,068 ± 0,014	0,667 ± 0,065	0,42	0,998	2,88	37,73	30,88	1,91
10,3	40	9,48 ± 5,71	0,134 ± 0,016	0,658 ± 0,070	0,33	0,999	2,60	35,74	29,52	3,8
10,3	60	10,01 ± 6,95	0,225 ± 0,065	0,614 ± 0,102	0,69	0,997	2,59	41,01	31,90	6,39

Para o modelo de Sovová só foi possível o ajuste variando a massa de extrato disponível e passível de ser extraído para cada solvente (m0, expresso em % em relação à massa de matriz). Foram considerados os seguintes valores que possibilitaram o melhor ajuste para cada solvente. Acetato de etila m0=0,08 (massa de extrato na matriz sólida); Acetona m0=0,10; Etanol m0=0,07 (T=20°C); Etanol m0=0,18 (T = 40°C e 60°C); Etanol:água m0=0,33.

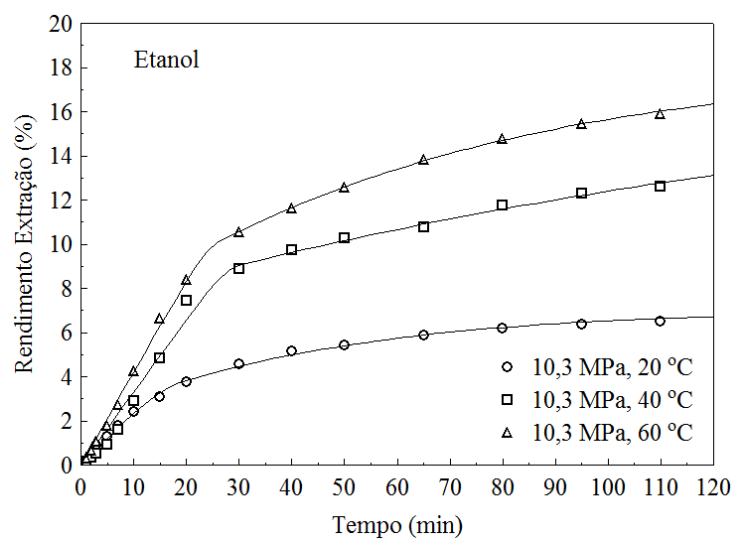
Figura 4.10- Modelagem das curvas de extração com PLE utilizando o modelo Sovová agrupados por solventes (a) acetato de etila, (b) Acetona, (c) Etanol e (d) Etanol:água e em diferentes temperaturas.



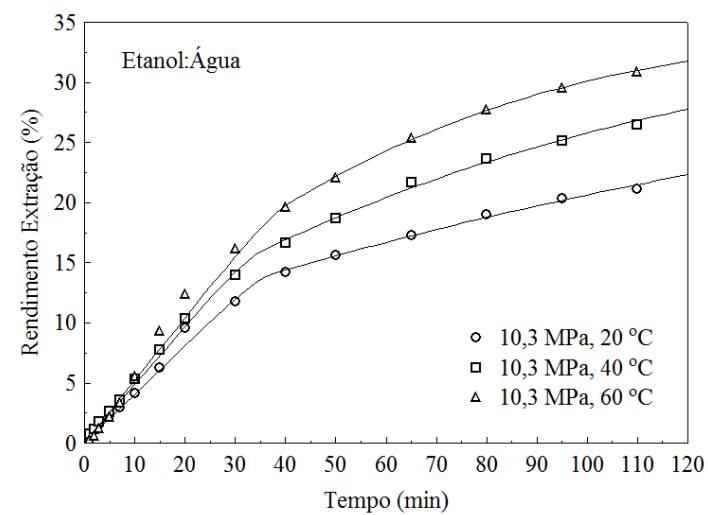
(a)



(b)

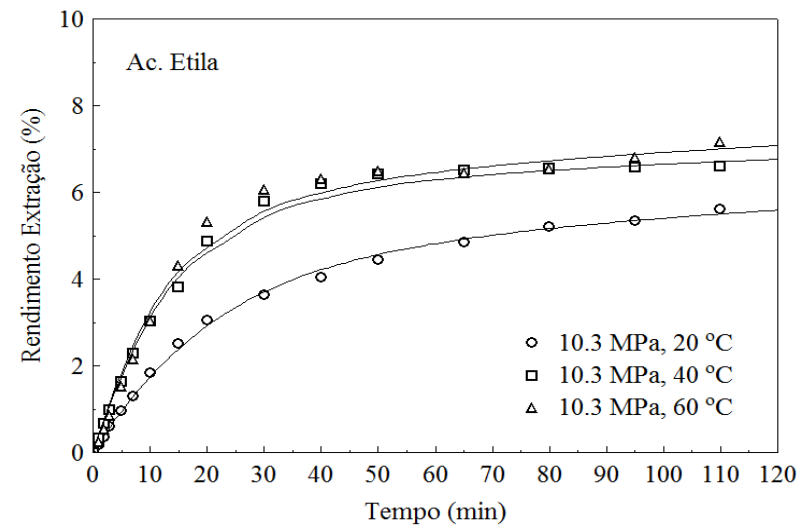


(c)

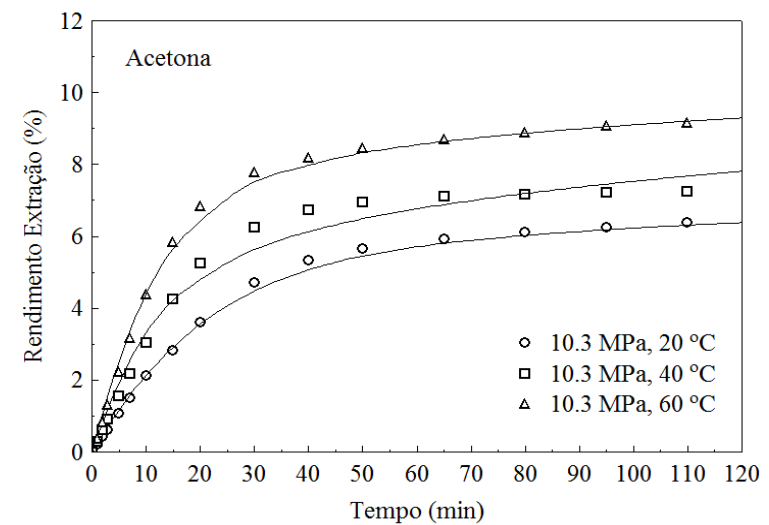


(d)

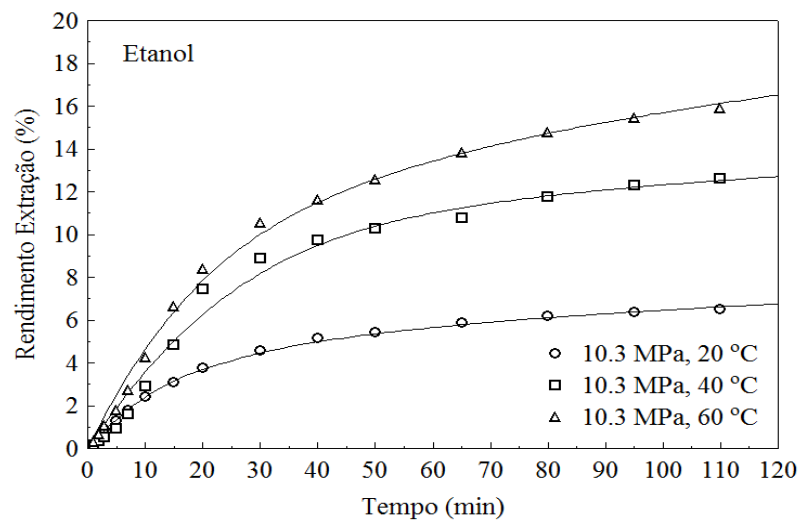
Figura 4.11- Modelagem das curvas de extração com PLE utilizando o modelo Pardo-Castaño agrupados por solventes (a) acetato de etila, (b) acetona, (c) etanol e (d) etanol:água (80:20v:v) e em diferentes temperaturas.



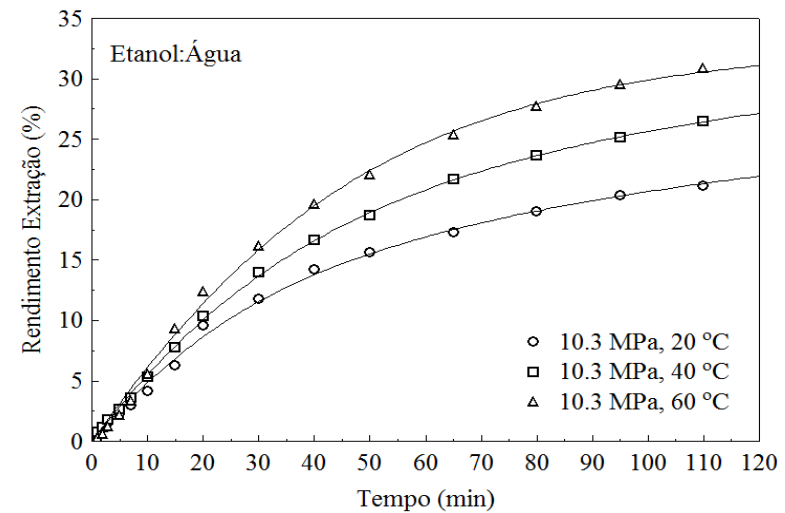
(a)



(b)



(c)



(d)

4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS CAPÍTULO I

O estudo das curvas e rendimentos de extração com fluido sub e supercrítico em função da pressão e temperatura indicam que estes parâmetros influem na densidade e pressão de vapor do fluido e como consequência na taxa de transferência de massa e solubilidade do soluto, no rendimento e na atividade dos extratos obtidos.

O menor rendimento global acumulado em extrato após 210 min foi de 0,24% obtido a 20°C e 8,0MPa e o maior rendimento foi de 0,68% empregando o fluido supercrítico a temperatura de 60°C e 25MPa.

Nas condições de temperatura e pressão (20°C e 16,5MPa) as concentrações de compostos FT (11,49mgAG.g⁻¹de extrato), flavonoides totais (20,48mgCAT.g⁻¹ extrato) e Aa (20,91%) foram maiores em relação aos demais extratos.

O maior rendimento global acumulado em extrato de folha oliveira utilizando PLE foi de 30,91% empregando solvente etanol:água (80:20v:v), 10,3MPa, 60°C e 110min. Nas mesmas condições operacionais, no entanto utilizando etanol, obteve-se os melhores teores de FT (386,42mgAG.g⁻¹ de extrato), flavonoides (33,43mgCAT.g⁻¹ de extrato), oleuropeína (73,65mg.g⁻¹ de extrato) e atividade antioxidante (IC₅₀ de 0,47mg.mL⁻¹).

A técnica PLE com a utilização de solventes polares possibilita a remoção de compostos polares da matriz da folha de oliveira, com potencial antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides mais elevados quando comparados a EFS.

Ambos os modelos cinéticos estudados, Sovová e Pardo-Castaño foram capazes de correlacionar bem a extração de folhas de oliveira com CO₂ sub e supercrítico e com líquido pressurizado em todas as condições estudadas.

Entre os dois métodos de extração (EFS e PLE), a extração com líquido pressurizado apresentou rendimentos superiores (6,37 a 30,91%) de extratos comparados com os obtidos por EFS (0,24 a 0,67%), em menor tempo (110min) de extração.



**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI ERECHIM**

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**5 CAPÍTULO II - ENCAPSULAMENTO
ENCAPSULAMENTO DE EXTRATOS DA FOLHA DE OLIVEIRA (*OLEA
EUROPAEA*) PELA TÉCNICA SEDS**

Neste capítulo é apresentada a metodologia e as discussões a cerca da produção de micro e/ou nano partículas que utilizam fluidos supercríticos para precipitação e encapsulamento de compostos naturais.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS CAPÍTULO II

Os materiais e as metodologias que serão empregadas neste capítulo serão descritos a seguir e envolvem desde o preparo da solução contendo o extrato a ser precipitado até a caracterização morfológica e textural, bem como atividade das partículas geradas pela técnica SEDS.

5.1.1 Reagentes, caracterização do PHBV e definição do extrato a ser encapsulado

Os reagentes utilizados empregados nesta etapa do trabalho estão descritos na seção 4.1.1 do Capítulo I.

O Poli (hidróxibutirato-co-valerato) – PHBV utilizado nos tratamentos de encapsulamento foi caracterizado por diferentes análises físico-químicas no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá - Pr. As análises realizadas foram Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN), Análise Termogravimetria (TGA), Cromatografia de Permeação em GEL (GPC) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

A análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN-1H) e de carbono (RMN-13C), a qual determina a constituição polimérica através da razão entre os monômeros, foi obtida utilizando um espectrofotômetro da marca Varian (modelo Mercury Plus 300- 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para o carbono) e o percentual de Hidroxivalerato (HV) foi calculado utilizando a Equação 5.1:

$$\%HV = \frac{\text{Área do sinal } CH_3 \text{ do HV}}{(\text{Área do sinal } CH_3 \text{ do HV} + \text{Área do sinal } CH_3 \text{ do HB})} \times 100 \quad \text{Eq. (5.1)}$$

A análise termogravimétrica (TGA) define a pureza e estabilidade térmica do polímero e foi realizada utilizando um equipamento de termogravimetria da TA Instruments (modelo TGA Q-50) em cadinho de platina, com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ sob fluxo de nitrogênio de 100mL.min⁻¹.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC), que visa demonstrar o comportamento térmico do polímero foi realizada utilizando um equipamento da TA Instruments (modelo DSC

Q-20 – V24.11) em cadinho de alumínio sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50mL.min⁻¹ e aquecidas uma sob taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ até a temperatura de 250°C.

A determinação da massa molar e do índice de polidispersão do polímero do PHBV foi determinada por cromatografia de permeação em gel usando um cromatógrafo (Viscotek GPCMax VE2001 - Triple Detector - Malvern Instruments).

O extrato de oliveira utilizado no preparo das soluções para coprecipitação foi definido baseado no seu pontecial antioxidante, teor de fenólicos totais e flavonoides, análises estas realizadase descritas no capítulo anterior. Assim o extrato etanólico obtido na temperatura de 60°C e pressão de 10,3MPa foi selecionado para a etapa de coprecipitação pela técnica SEDS empregando CO₂ como antisolvente e PHBV como agente encapsulante. Ahmad-Qasem et al. (2016) relatam a estabilidade dos extratos em meio líquido e das folhas secas por um período curto de estocagem, por esse motivo, uma nova coleta de folhas foi realizada na ultima semana de dezembro de 2016 para obtenção de novos extratos para posterior uso no encapsulamento.

5.1.2 Preparo das soluções e variáveis de coprecipitação

As variáveis de processo empregadas na coprecipitação são apresentadas no planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹ (Tabela 5.1), onde se manteve fixa a concentração de extrato na solução de 1mg.mL⁻¹, a pressão da câmara de precipitação de 10MPa e volume de CO₂ para secagem que corresponde 2 vezes o volume do reator (≅1200mL) (FRANCESCHI et al., 2008.b). As variáveis dependentes (respostas) foram a eficiência de encapsulamento (EE), FT, flavonoides, Aa, calorimetria exploratória diferencial e tamanho médio de partícula.

Tabela 5.1-Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2⁴⁻¹ para o processo de coprecipitação de extratos de folha de oliveira.

Variáveis independentes*	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	40	50	60
Vazão de CO₂ (mL.min⁻¹)	20	35	50
Vazão da solução (mL.min⁻¹)	0,5	0,75	1
Concentração polímero (mg.mL⁻¹ de solvente)	10	20	30

*Variáveis independentes fixas: concentração de extrato: 1mg.mL⁻¹, pressão da câmara de precipitação de 10MPa e volume de CO₂ ≅1200mL.

Variável dependente: EE, FT, flavonoides e Aa.

Para o processo de coprecipitação do extrato da folha de oliveira através da técnica SEDS é necessário o preparo de uma solução a qual consiste em dissolver o extrato seco e o

polímero PHBV em um solvente orgânico (POUTON; AKHTARB, 1996). Para tal, 20mg de extrato previamente seco foi adicionado à quantidade de polímero pré-definida no planejamento fatorial 2^{4-1} (Tabela 5.1), ambos foram dissolvidos em 20mL de clorofórmio, uma vez que este solvente tem a capacidade solubilizar tanto o polímero quanto o extrato. Posteriormente essa solução foi injetada na câmara de precipitação (Figura 5.1) para realizar o encapsulamento variando a temperatura, a vazão do CO₂ e a vazão da solução conforme o planejamento fatorial 2^{4-1} (Tabela 5.1).

As variáveis independentes e os níveis adotados nos procedimentos experimentais bem como o aparato utilizado para a coprecipitação do extrato de folha de oliveira estão diagramado no esquema apresentado na Figura 5.1, sendo baseado em estudos anteriores realizados por Franceschi et al. (2008.a), Franceschi et al. (2009), Priamo et al. (2011), Machado et al. (2014) e Boschetto et al. (2014).

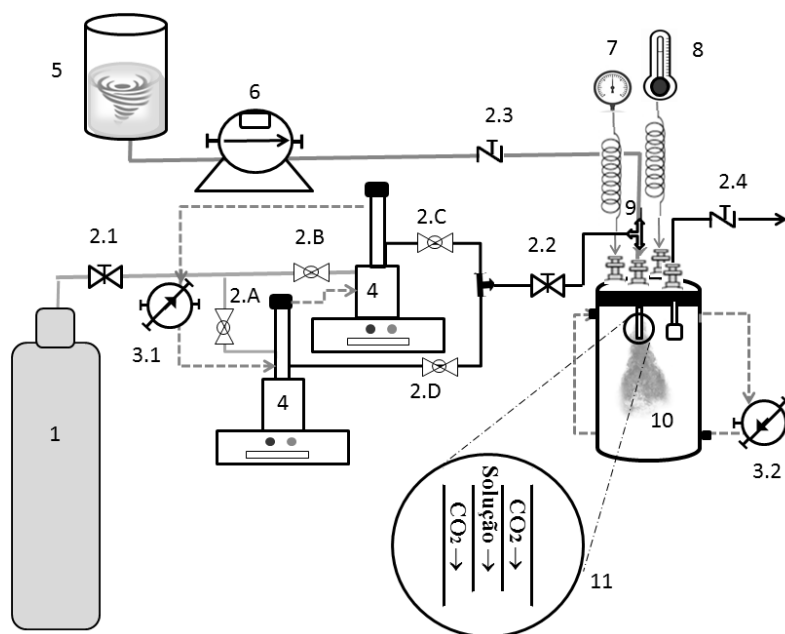
5.1.3 Aparato experimental para coprecipitação

A seguir será descrito detalhadamente a composição do aparato experimental (Figura 5.1) utilizado para a precipitação e encapsulamento do extrato de folha de oliveira.

A válvula tipo agulha [2.1] de uma via (*Check-Valve* Marca HIP, Modelo 15- 41AF1-T) permite a vazão em um único sentido do fluido anti solvente proveniente do cilindro de CO₂ [1] e é utilizada entre o cilindro e as válvulas de esfera (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4) [2.A e 2.B]. As válvulas 2.A e 2.B isolam as bombas do cilindro em caso de algum vazamento na linha durante o enchimento das bombas e possibilitam a alimentação do gás a partir do cilindro para as bombas de seringa a alta pressão (ISCO 1000D) [4] que possui cilindro encamisado com capacidade de 1000mL, pressão de trabalho até 12MPa e é responsável por deslocar o dióxido de carbono para a unidade de precipitação. A temperatura da bomba se mantém constante a 7°C com água circulando na camisa da bomba por banho ultratermostatizado [3.1]. A vazão do fluido de precipitação (CO₂) é controlado por Válvulas de Esfera (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4) [2.C e 2.D] que isolam as linhas das bombas até a câmara de precipitação possibilitando o uso alternado das linhas e/ou bombas de anti solvente sem perda de pressão. A válvula tipo agulha [2.2] de uma via (*Check-Valve* Marca HIP, Modelo 15- 41AF1-T) permite a vazão em um único sentido do fluido antisolvente proveniente da bomba de alta pressão [4] até a câmara de precipitação [10]. A válvula Whitey Swagelok 1/4 "de aço inoxidável modelo ss-4rs4 [2.3] isola ou permite a vazão da solução a ser

precipitada entre da câmara de precipitação [10] e o frasco de armazenamento [5] da solução composta do solvente orgânico, polímero e extrato.

Figura 5.1- Diagrama esquemático do aparato experimental de precipitação e encapsulamento utilizando extratos de folha de oliveira e técnica SEDS.



Cilindro de CO₂ [1]; Válvula tipo agulha [2.1 e 2.2]; Válvula Agulha [2.3 e 2.4]; Válvulas de esfera [2.A, 2.B, 2.C e 2.D]; Banho Ultratermostato com circulação [3]; Bomba de seringa a alta pressão [4]; Frasco com solução [5]; Bomba de deslocamento positivo [6]; Manômetro [7]; Sensor de temperatura [8]; Conexão entra de CO₂ e solução [9]; Câmara de precipitação [10]; Tubo capilar de injeção amostra para câmara de precipitação [11]; Conexão de saída[12].

Esta solução é bombeada até a câmara de precipitação por uma bomba de deslocamento positivo Digital Serie III (Marca Lab Alliance) [6] até a câmara de precipitação [10] que é um cilindro constituído de aço inox 316 e volume útil de $\approx 635\text{mL}$. Esta possui sistema de circulação de água conectada a banho ultratermostático [3.2] que mantém a câmara de precipitação com a temperatura ajustada de acordo com a proposta de trabalho e mais cinco conexões na tampa. A conexão central é uma conexão de entrada que acopla uma conexão do tipo “T” [9] que serve para junção e adição simultânea da solução orgânica proveniente do frasco de solução [5] e do antissolvente (CO₂) proveniente da bomba [4] para a câmara de precipitação [10]. Duas conexões de entrada periféricas são para a inserção do sensor de temperatura termopar tipo k que é ligado a um indicador universal NOVUS, modelo N 1100 [8] dentro da câmara de precipitação e do transdutor de pressão A5 [7] com capacidade pressão 0,206 a 24,821MPa que mede a pressão

dentro da câmara de precipitação. A terceira conexão [12] permite a saída do antisolvente e solvente orgânico para fora da câmara de precipitação. A saída do antisolvente, solvente orgânico e a pressão interna na câmara de precipitação é controlada por válvula Whitey Swagelok 1/4 "de aço inoxidável modelo ss-4rs4 [2.4]. A quarta conexão periférica fica vedada para uma possível modificação do sistema de precipitação. A conexão do tipo "T" [9], a linha de antisolvente e solução são independentes, constituídas de tubulação de aço inox com diâmetro externo de 2mm. Esta conexão [9] está ligada a um tubo capilar [11] que desloca tanto o antisolvente quanto a solução para o interior da câmara de precipitação [10]. O tubo capilar de injeção de amostra para câmara de precipitação [11] é unificado com a conexão Tipo "T" [9] por um tubo de polietereftercetona (*PEEK Tubing*) marca Upchurch Scientific 1/16x020x5FT e acopla internamente uma das extremidades de um tubo capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 0.1mm. A outra extremidade do tubo capilar de sílica é inserida dentro do tubo capilar de aço inox de diâmetro externo de 0,150mm ligada a conexão tipo "T" [9], viabilizando o escoamento e a dispersão da solução para dentro da câmara de precipitação, coaxialmente a este tubo, o antisolvente escoa por fora do capilar de sílica e dentro do capilar de inóx até a câmara de precipitação.

5.1.4 Análise de rendimento, carga teórica, percentual e eficiência de encapsulamento

O rendimento, a carga teórica, o percentual e a eficiência de encapsulação do extrato foram realizados segundo o método descrito por Zheng et al. (2011), Boscheto et al. (2013), Li et al. (2014), Franceschi et al. (2010), Kalogiannis et al. (2006) com algumas adaptações.

Para realizar a quantificação dos compostos fenólicos totais presentes na superfície (FTS) do encapsulado, pesou-se diferentes massas do encapsulado (20 a 40mg) e, adicionou-se 10mL de água destilada (AD). A suspensão de água e encapsulado foi agitada vigorosamente por 20 segundo e posteriormente filtrado em papel filtro whatman. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais presentes dentro e fora do encapsulado (FTT), diferentes massas de encapsulados foram pesados (20 a 40mg) e diluído em 10mL de etanol 95%. A suspensão de etanol e encapsulado foi agitada vigorosamente por 20 segundos, a cada 5 minutos e deixada em repouso por 30 minutos para posterior filtração em papel filtro whatman. Ambas as frações recolhidas foram analisadas quanto ao seu teor total de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu (Capítulo I; Seção 4.1.7.3).

Os resultados de fenólicos totais foram calculados com base na curva padrão de absorbância de fenólicos totais *versus* concentração de extrato no solvente (0,25 a 2mg.mL⁻¹), possibilitando o cálculo do rendimento (ZHENG et al.,2011), percentagem (PE) e a eficiência de encapsulação (EE- (KALOGIANNIS et al., 2006; FRANCESCHI et al., 2010; BOSCHETO et al., 2013) para cada tratamento, através das seguintes equações:

$$\text{Rendimento (mg de extrato)} = \text{FTT(mg)} - \text{FTS(mg)} \quad \text{Eq. (5.2)}$$

Onde FTS são fenólicos totais presentes na superfície do encapsulado e FTT fenólicos totais presentes dentro e fora do encapsulado

$$\text{Carga Teórica(\%)} = \frac{\text{Massa ext. (mg)}}{\text{Massa ext. + PHBV (mg)}} \times 100 \quad \text{Eq. (5.3)}$$

Onde “Massa ext.” é a massa teórica (mg) do extrato utilizada no preparo da solução orgânica antes da precipitação e a “Massa ext. + PHBV” é a soma das massas teóricas (mg) do extrato e do polímero PHBV utilizada no preparo da solução orgânica antes da precipitação

$$\text{PE(\%)} = \frac{\text{Rendimento(mg)}}{\text{Rendimento + massa total do PHBV precipitado (mg)}} \times 100 \quad \text{Eq. (5.4)}$$

$$\text{EE(\%)} = \frac{\text{PE (\%)}}{\text{Carga Teórica (\%)}} \times 100 \quad \text{Eq. (5.5)}$$

5.1.5 Análise de Aa, fenólicos totais e flavonóides.

Estas análises forão realizadas conforme metodologias descritas no capítulo I, seção 4.1.7 sub itens 2, 3 e 4, com as adequações necessárias para a nova condição amostral conforme descrito anteriormente no item 5.1.4 deste capítulo.

5.1.6 Caracterização das partículas geradas

5.1.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e determinação do tamanho de partícula

As imagens das partículas foram geradas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC e obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em um microscópio eletrônico JEOL JSM-6390LV (*Scanning Electron Microscope* - MEV), Estados Unidos. As amostras precipitadas foram manualmente dispersas sobre fitas adesivas de carbono dupla face e dispostas em suporte metálico, recobertas com uma fina camada de ouro sob vácuo e, então analisadas. As micrografias foram obtidas com magnificações de 1000 a 13000 vezes, com uma tensão de 10kV. A partir das micrografias, foi realizada a determinação do tamanho das partículas coprecipitadas utilizando o software Size Meter versão 1.1. O método consiste na avaliação das medidas do comprimento das partículas para cada condição experimental avaliada e submetidas à análise estatística. Foi realizada a medida de aproximadamente 435 a 685 partículas em cada condição experimental estudada, com exceção do tratamento 1, o qual foi realizado 263 medidas, sendo determinados o tamanho mínimo ($X_{\min}$), máximo ($X_{\max}$), médio ($\bar{x}$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) das partículas de coprecipitadas de PHBV dos extratos por SEDS.

5.1.6.2 Calorimetria exploratória diferencial - DSC

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é aplicada para monitorar as mudanças de transições de fase das amostras através da avaliação direta do consumo de energia térmica (energia absorvida ou emitida por uma amostra em função da temperatura), que ocorre em uma amostra dentro de um aumento ou diminuição regulada da temperatura (KOSHY; SUBRAMANIAN; THOMAS, 2017; GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010). Foi realizada, na Universidade Tiradentes de Aracajú, utilizando um equipamento da TA *Instruments* (modelo DSC Q-20) nas partículas coprecipitadas, extrato seco de folha de oliveira e PHBV puro e foram conduzidos para verificar possíveis modificações na temperatura de fusão causada pelo processamento do material. Para realizar as medidas, foram pesadas amostras que variaram de 2,1 a 5,8mg e adicionadas em um cadinho de alumínio não hermético e submetidos a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50\text{mL}.\text{min}^{-1}$) em uma faixa de temperatura de -25 a 250°C . As medidas de análise térmica determinam a temperatura de desnaturação das amostras, mostram a transição dos materiais em função do tempo e temperatura controlada e a variação da entalpia que dão origem aos picos que demonstram transições de primeira ordem como, por exemplo, a temperatura de fusão.

5.1.6.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das diferentes amostras objetivou verificar modificações na estrutura do polímero adicionado do extrato, causadas pelo processo de coprecipitação empregando alta pressão e foram adquiridos na gama de números de onda entre 500 e 4000cm⁻¹ com uma resolução de 8cm⁻¹, num espectrómetro Perkin Elmer – *Spectrum BX*, associado a um acessório Golden Gate (sistema de ATR (“*Attenuated total reflection*”, reflexão total atenuada)), com a acumulação de 32 scans.

5.1.7 Estabilidade dos extratos encapsulados

Para realização dos testes de estabilidade do extrato encapsulado a luz e temperatura ambiente, as micropartículas foram acondicionadas em frascos de vidro transparente e posteriormente os frascos foram envoltos por papel alumínio a fim de proteger os mesmo da luz ambiente. Os frascos foram acondicionados em um balcão, sob oscilação da temperatura ambiente no período de análise (18 a 29°C). A estabilidade foi acompanhada via determinação de FT, flavonoides e atividade antioxidante, realizadas em dias alternados durante 210 dias após a coprecipitação das partículas.

5.1.8 Análise estatística

Os resultados foram tratados pela metodologia de planejamento fatorial utilizando o Software *Statistica* versão 5,0 (*Stat Soft Inc* ®, USA) com nível de confiança de 95 %.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO CAPÍTULO II

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados obtidos do encapsulamento de extratos de folha de oliveira utilizando PHBV como polímero aplicado à técnica SEDS na produção de micropartículas.

5.2.1 Caracterização do PHBV e do extrato utilizado para o encapsulamento

O poli (hidróxibutirato-co-valerato) – PHBV utilizado nesta pesquisa foi caracterizado por diferentes análises, sendo que a RMN indica a presença de 92,1% de hidroxibutirato (HB) e 7,9% de hidroxivarelato (HV). A alteração na composição do polímero pode ser modificada, alterando o suprimento das bactérias produtoras do PHBV (BRAUNEGG, 1998), em geral o conteúdo de HV é de 0 a 25%, sendo que o aumento da na quantidade do monomero de HV pode melhorar a resistência ao impacto e a flexibilidade do material (HU; JOU; YANG, 2004).

A análise de cromatografia de permeação em gel foi realizada com o intuito de identificar as massas molares do PHBV em termos M_n (numérico), M_w (mássico) em Daltons, apresentando M_n 162.900Da, M_w 260.813Da. Partindo da razão entre as massas molares mássica e numérica, ($M_w.M_n^{-1}$) é possível determinar o índice de polidispersividade, sendo igual 1,6. Este índice polidispersão (PDI) maior que 1, sugere que o PHBV é um polímero polidisperso, com cadeias poliméricas de tamanhos diferentes (GAUMET et al., 2008).

Através das análises de DSC foi possível verificar que o PHBV apresentou diferentes comportamentos térmicos com duas temperaturas de fusão 139,68 e 169,91°C. O PHBV possui boa estabilidade térmica em temperaturas abaixo de 160°C, sendo que a estabilidade diminui drasticamente em temperaturas acima de 180°C por diminuição da massa molar em função da cisão de cadeia. Além disso, a temperatura de fusão diminui com o aumento da quantidade de monômeros de HV no polímero. A exemplificar um polímero com 24% de HV tem temperatura de fusão de 138°C e um polímero sem a presença de HV apresenta temperatura de fusão de 177°C (KUNIOKA; DOI, 1990).

O PHBV apresentou TGA inicial em torno de 248,96°C e TGA final de aproximadamente 310°C, ocorrendo perda de massa em um único estágio e em uma faixa estreita de temperatura, considerando a presença de 7,9% de hidroxivarelato (HV) no nosso polímero puro como citado anteriormente na análise de RMN. Brunel et al (2014) obtiveram curva de TGA para o PHBV puro com 3.5% de HV, com variação de temperatura de degradação iniciando a 263°C e final de 315°C. Essa diferença de temperatura está relacionada à

porcentagem de monômeros de HV em cada polímero, quanto maior a quantidade de HV menor a temperatura de degradação do polímero.

O extrato de oliveira utilizado no preparo das soluções para coprecipitação foi oriundo de uma nova coleta de folhas de oliveira realizada em dezembro de 2016 e obtido a partir de uma extração com álcool a 99%, na temperatura de 60°C e pressão de 10,3MPa. A caracterização do extrato apontou teores de FT de 395,41mgAG.g⁻¹ de extrato, flavonoides de 34,51mgCAT.g⁻¹ de extrato e atividade antioxidante (IC₅₀) de 0,44mg.mL⁻¹. Ao comparar estes resultados aos resultados obtidos para o extrato caracterizado no capítulo I (teores de FT de 386,42mgAG.g⁻¹ de extrato, flavonoides de 33,43mgCAT.g⁻¹ de extrato, oleuropeína com 73,65mg.g⁻¹ de extrato e atividade antioxidante (IC₅₀) de 0,47mg.mL⁻¹), observa-se um leve aumento nos teores. Segundo Taamalli et al. (2018), Sahin; Bilgin (2017) e Bilgin; Sahin (2013), alguns efeitos agrônômicos, tecnológicos, manejo e temporais podem influenciar na composição do extrato de folhas de oliveira.

5.2.2 Análise de rendimento, carga teórica, percentual e eficiência de encapsulamento

A Tabela 5.2 apresenta os resultados do planejamento fatorial 2⁴⁻¹ e os respectivos níveis com valores reais e codificados para rendimento, carga teórica (CT), percentual de encapsulamento (PE), a eficiência de encapsulamento (EE), atividade antioxidante, FT, flavonoides, DSC e tamanho partícula dos extratos encapsulados de folha de oliveira utilizando a técnica SEDS, pressão fixa de 10 MPa e concentração de extrato de 10mg.mL⁻¹.

Conforme Tabela 5.2 percebe-se que o maior valor obtido para a eficiência de encapsulamento foi de 86% (tratamento 8) utilizando 60°C, vazão da solução de 1mL.min⁻¹, concentração de polímero de 30mg.mL⁻¹ de solvente e vazão de CO₂ de 50mL.min⁻¹.

A eficiência de encapsulamento dos extratos de folhas de oliveira (Tabela 5.2) variou de 48,38 a 86% e encontram-se dentro da faixa de eficiência de encapsulamento estudada por outros autores que utilizaram a técnica SEDS, PHBV como polímero e diferentes compostos. Francsechi et al. (2010) e Priamo et al. (2011) obtiveram taxas de EE de 16,7 a 34,7 e 7,75 a 55,54%, respectivamente no encapsulamento de β-caroteno. Boscheto et al. (2014) obtiveram EE de 17,79 a 66,01%, no encapsulamento de extratos de semente de uva, Machado et al. (2014) encapsularam astaxantina com EE de 20,93 a 48,95% e Boscheto et al. (2014) encapsularam Bixina obtendo 6,36 a 92,02% de EE. Loss et al. (2016) encapsularam acetato de eugenila e conseguiram EE de 16,3 a 46,5%.

Submetendo os dados obtidos a análise estatística, verificou-se que a concentração de polímero, vazão de CO₂, vazão da solução e temperatura não influenciaram significativamente ($p>0,05$) na eficiência de encapsulamento, FT, flavonoides e Aa (Figura A.3 do Apêndice I).

Os coeficientes de variação do tratamento de coprecipitação variaram entre 17 e 42% em torno do tamanho médio de partícula, indicando um conjunto de dados razoavelmente homogêneo, considerando que os apenas os tratamentos 1, 3, 5 e 7 apresentam valores de CV superiores a 25%. O CV máximo no presente estudo foi inferior aos CVs reportados na literatura por Machado et al. (2014) no encapsulamento de astaxantina (62,44%), Loss et al. (2016), no encapsulamento de acetato de eugenila (53,1%) e Boscheto et al. (2014) no encapsulamento de bixina (62,1%), considerando que ambos autores utilizaram a técnica SEDS e o polímero PHBV para a coprecipitação.

Tabela 5.2- Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} (valores reais e codificados) e respostas em rendimento (R), carga teórica (CT), porcentagem de encapsulamento (PE), eficiência de encapsulamento (EE), fenólicos totais (FT), atividade antioxidante (Aa), flavanoides (F), temperatura de fusão, entalpia, tamanho mínimo ($X_{\min}$), tamanho máximo ($X_{\max}$), tamanho médio ($\bar{\chi}$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) das partículas coprecipitadas de PHBV dos extratos de folha de oliveira por SEDS.

Trat.	Variáveis Independentes*				Respostas												
	T (°C)	Vazão CO ₂	Vazão Solução	Polímero	R (mg)	CT (%)	PE (%)	EE (%)	FT (Eq.mg ⁻¹)	Aa (%)	F (Eq.mg ⁻¹)	T (°C)	Entalpia (J.g ⁻¹)	X _{max} (μm)	X _{min} (μm)	$\bar{\chi} \pm \sigma$ (μm)	(CV)
1	-1(40)	-1(20)	-1(0,5)	-1(10)	7	50,00	41,19	82,38	0,74	46,71	0,65	162,31	35,70	0,96	0,11	0,33±0,14	42,42
2	1(60)	-1(20)	-1(0,5)	1(30)	6,4	25,00	17,61	70,46	0,76	39,81	0,64	165,09	36,00	0,92	0,22	0,64±0,11	17,19
3	-1(40)	1(50)	-1(0,5)	1(30)	6,3	25,00	17,33	69,33	0,66	32,25	0,57	164,45	36,51	1,31	0,29	0,69±0,19	27,54
4	1(60)	1(50)	-1(0,5)	-1(10)	3,5	50,00	31,63	63,26	0,50	21,25	0,50	162,32	37,71	0,52	0,14	0,30±0,07	23,33
5	-1(40)	-1(20)	1(1)	1(30)	7,3	25,00	19,62	78,46	0,77	37,76	0,63	163,70	35,62	1,39	0,23	0,67±0,21	31,34
6	1(60)	-1(20)	1(1)	-1(10)	5,4	50,00	40,81	81,62	0,94	48,33	0,83	163,70	32,25	1,38	0,29	0,63±0,16	25,40
7	-1(40)	1(50)	1(1)	-1(10)	5,6	50,00	35,76	71,52	0,60	46,60	0,46	162,26	39,63	0,92	0,18	0,46±0,15	32,61
8	1(60)	1(50)	1(1)	1(30)	8,2	25,00	21,50	86,00	0,98	65,80	0,76	164,50	23,33	1,22	0,33	0,71±0,17	23,94
9	0(50)	0(35)	0(0,75)	0(20)	3,9	34,00	19,74	59,21	0,53	36,89	0,50	163,21	31,55	1,17	0,32	0,67±0,17	25,37
10	0(50)	0(35)	0(0,75)	0(20)	5,4	34,00	21,23	62,43	0,55	39,05	0,53	162,94	25,66	1,17	0,32	0,67±0,16	23,88
11	0(50)	0(35)	0(0,75)	0(20)	5,4	34,00	21,27	62,56	0,54	39,48	0,55	162,73	34,66	1,07	0,23	0,59±0,15	25,42

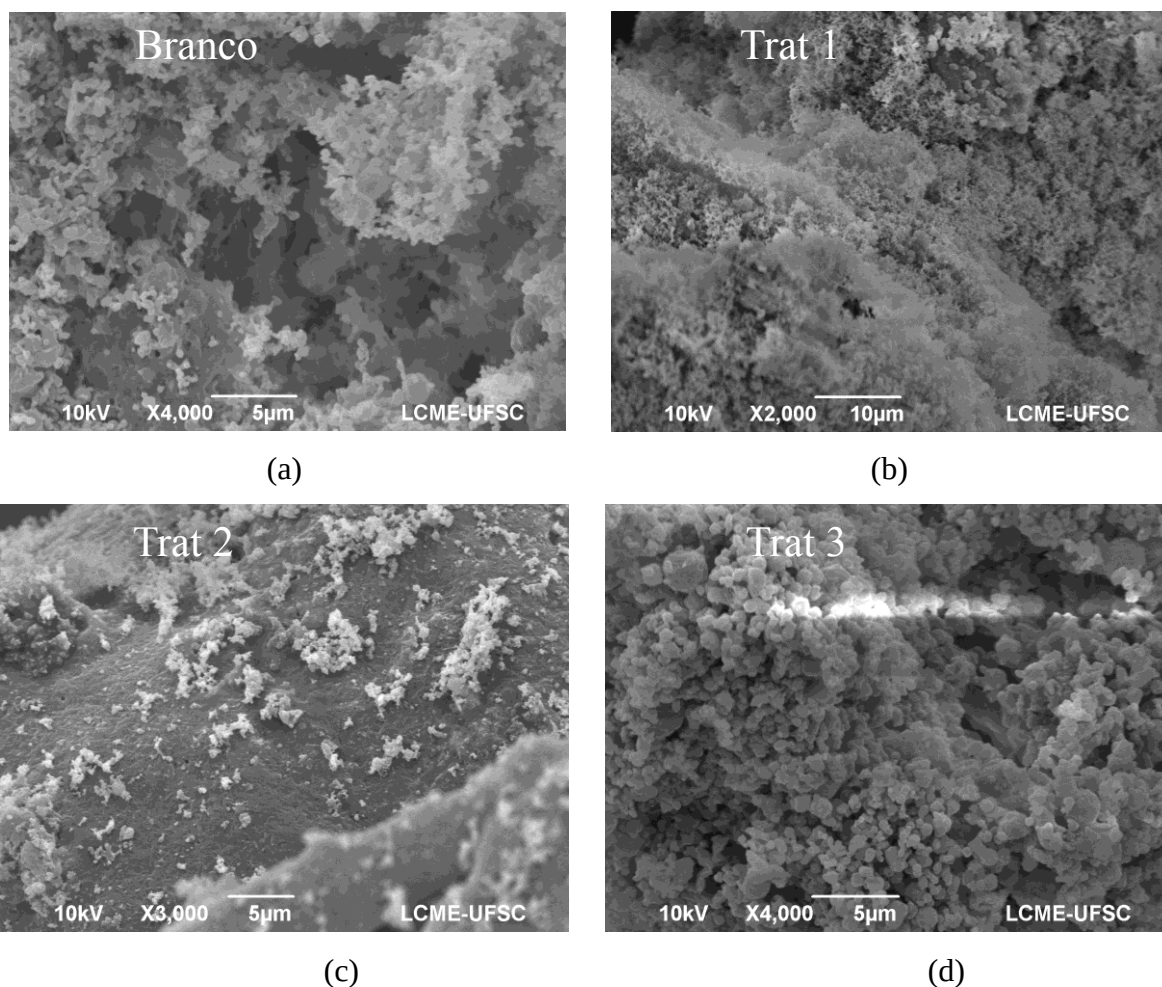
* Vazão CO₂ (mL.min⁻¹); Vazão solução (mL.min⁻¹); Polímero (mg.mL⁻¹ solvente); Variáveis independentes fixas: pressão (10MPa) e concentração de extrato (10mg.mL⁻¹).

5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e tamanho das partículas

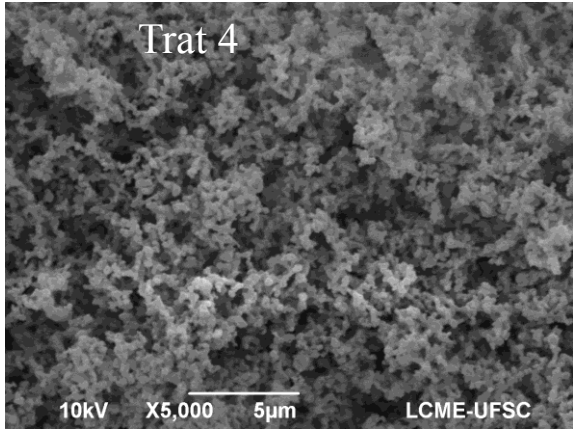
A análise morfológica das partículas geradas e do PHBV puro são apresentadas na Figura 5.2. É possível perceber que nas condições experimentais estudadas resultaram em partículas com morfologia predominantemente esférica, algumas com aspectos aglomerados e bem irregulares.

Os tratamentos que apresentam aspecto aglomerado são os tratamentos 1, 4, 7, 8 e 9 e, segundo Franceschi et al. (2009) este fato pode ser atribuído à alta velocidade de entrada do anti-solvente na câmara de precipitação que causa colisões intensas entre as partículas e, assim, a formação de aglomerados.

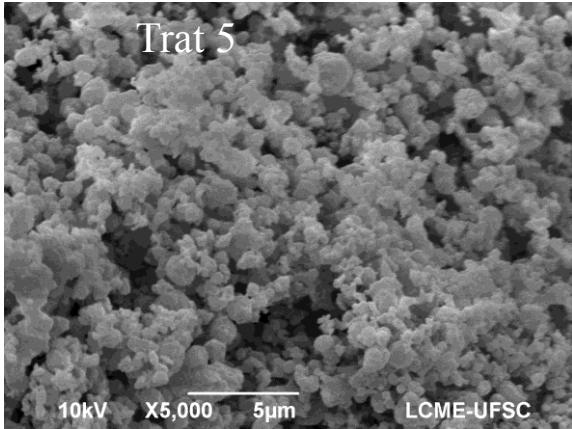
Figura 5.2- Morfologia das partículas obtidas do PHBV precipitado puro (Branco) (a) e ensaios de coprecipitação dos tratamentos 1 a 11(b a l) respectivamente, com condições experimentais de pressão fixa de 10MPa e concentração de extrato de 10mg.mL⁻¹.



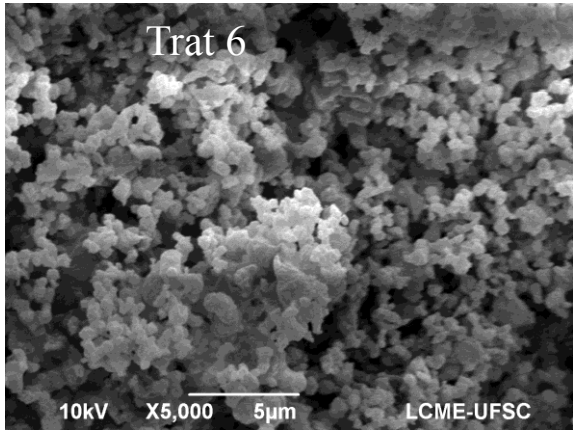
Continuação Figura 5.2



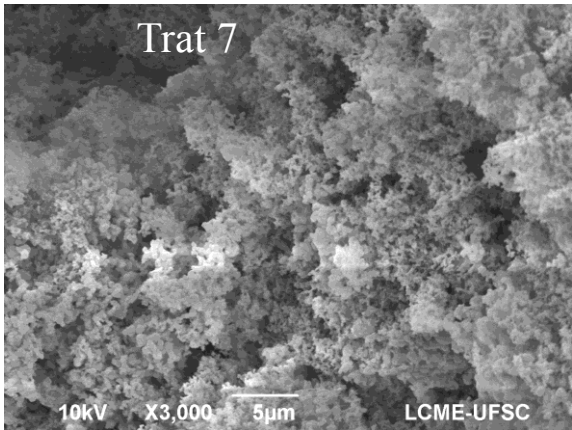
(e)



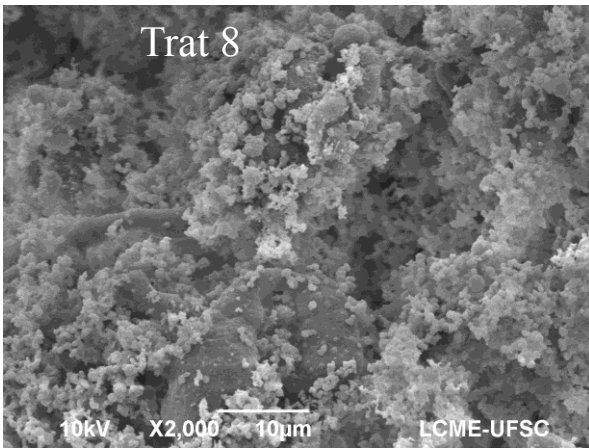
(f)



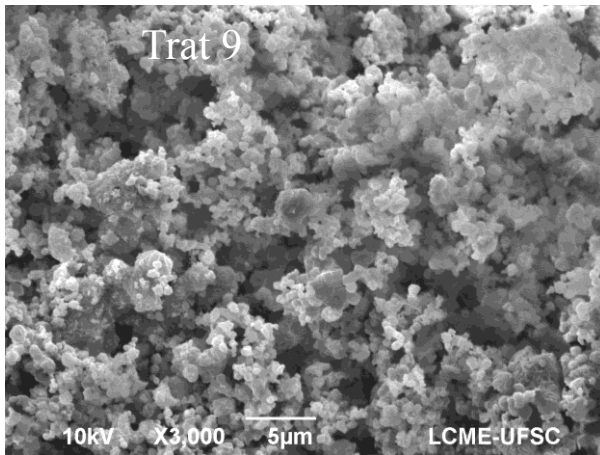
(g)



(h)

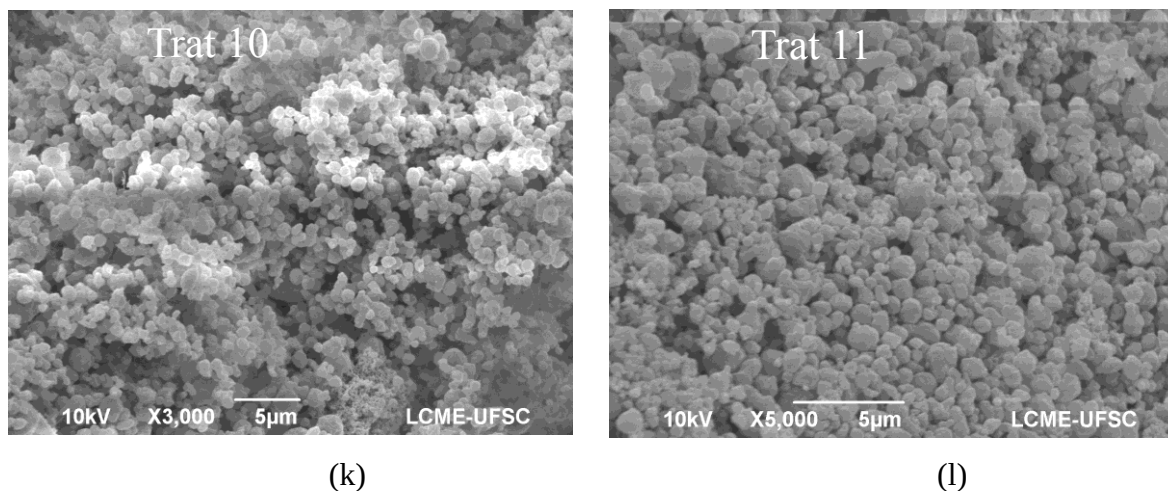


(i)



(j)

Continuação Figura 5.2

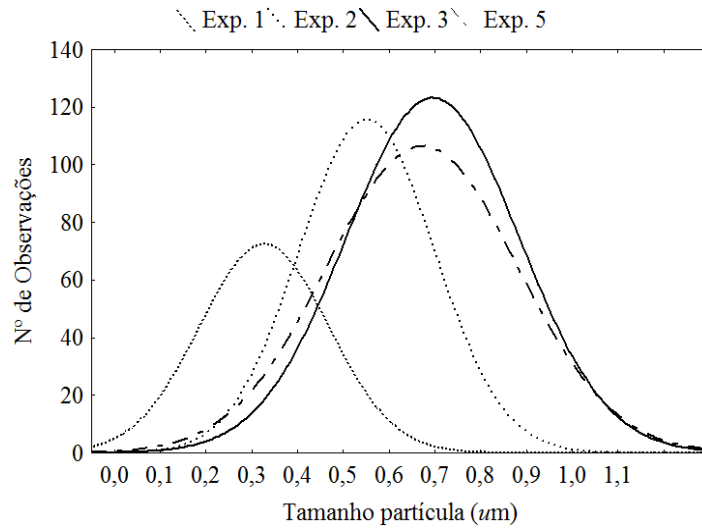


Partículas precipitadas com PHBV como polímero e utilizando a técnica SEDS de precipitação com características semelhantes foram apresentadas em trabalhos publicados por Boschetto et al. (2013) na precipitação de extratos de uva, Loss et al. (2016) na precipitação de acetato de eugenila, Machado et al. (2016) na precipitação de astaxantinae Dal Magro et al. (2017) na precipitação de *trans*-resveratrol.

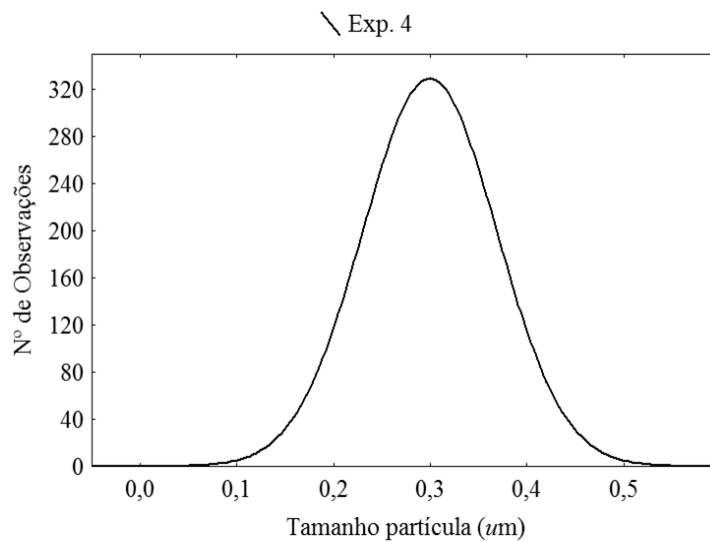
Conforme dados da Tabela 5.2 é possível observar que as partículas apresentam tamanho médio de 0,30 a 0,71µm, sendo consideradas micrométricas (YADAV; KUMAR, 2014). O menor tamanho de partícula foi de 0,30µm (Tratamento 04) nas condições de 60°C, 0,5mL.min⁻¹ vazão da solução, 10mg.mL⁻¹ concentração de polímero e 50mL.min⁻¹ de vazão de CO₂. Por outro lado, o maior tamanho de partícula foi de 0,71µm (Tratamento 8), a qual obteve a maior eficiência de encapsulamento de 86 %, sendo coprecipitado a 60°C, vazão da solução de 1mL.min⁻¹, concentração de polímero de 30mg.mL⁻¹ de solvente e vazão de CO₂ de 50mL.min⁻¹.

As distribuições de tamanho de partícula relacionadas aos tratamentos realizados na faixa de concentração de polímero de 10 a 30mg.mL⁻¹ são apresentadas na Figura 5.3 e é possível observar que aumentando a concentração de polímero, aumentou o tamanho médio e a distribuição do tamanho de partícula.

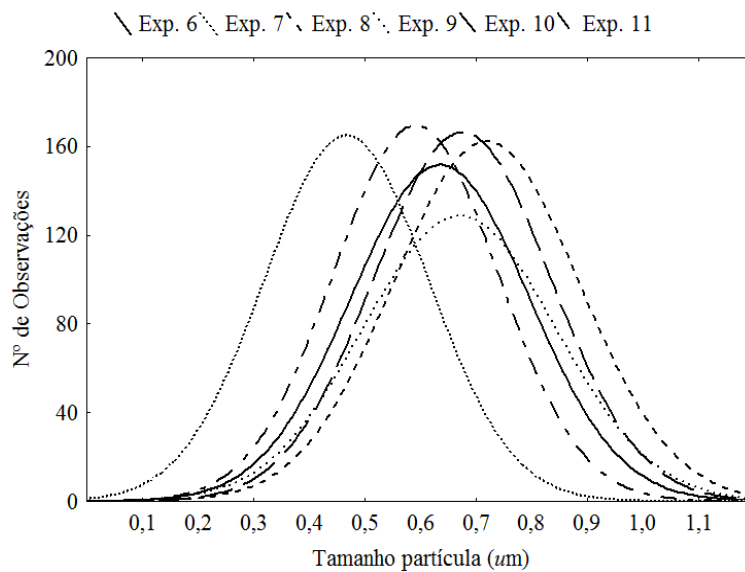
Figura 5.3- Distribuições de tamanho de partículas dos ensaios de coprecipitação dos tratamentos 1, 2, 3 e 5(a), tratamento 4 (b) e tratamentos 6, 7, 8, 9, 10 e 11(c) e com condições experimentais de pressão fixa de 10MPa e concentração de extrato de 10mg.mL⁻¹.



(a)



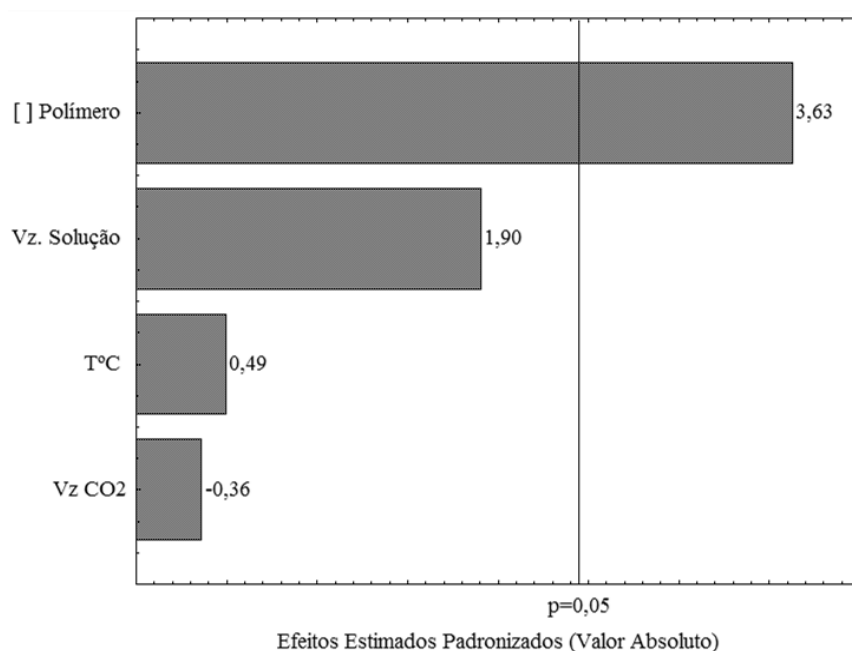
(b)



(c)

Submetendo os dados obtidos a análise estatística, verificou-se que a concentração de polímero, influenciou significativamente ($p < 0,05$) no tamanho médio de partícula exercendo um efeito positivo significativo (Figura 5.4) indicando que quanto maior a concentração de polímero, maior é o tamanho da partícula. Segundo Scheithauer et al. (2015), o maior teor de soluto e viscosidade da solução de polímero pode levar ao aumento do tamanho das microesferas de polímero.

Figura 5.4- Diagrama de Pareto com os efeitos estimados sobre o tamanho médio das partículas coprecipitadas de PHBV com extratos de folha de oliveira.



Outros trabalhos citados na literatura, também, avaliaram o encapsulamento de extratos de folha de oliveira e determinaram características dos materiais encapsulados em diferentes suportes poliméricos.

Pacheco et al. (2018) encapsularam extratos de folhas de oliveira em inulina por spray-drye e obtiveram partículas com tamanho médio de $10\mu\text{m}$ e a eficiência de encapsulação foi de $78,7 \pm 0,42\%$. Urzúa et al. (2017) também encapsularam extratos de folhas de oliveira em inulina em spray-drye e obtiveram eficiência de encapsulação de 80 a 87%. Estes trabalhos apresentam a EE similar ao nosso estudo, porém obtivemos tamanho de partícula menor, indicando que a técnica SEDS facilita a obtenção de partículas com tamanho reduzido.

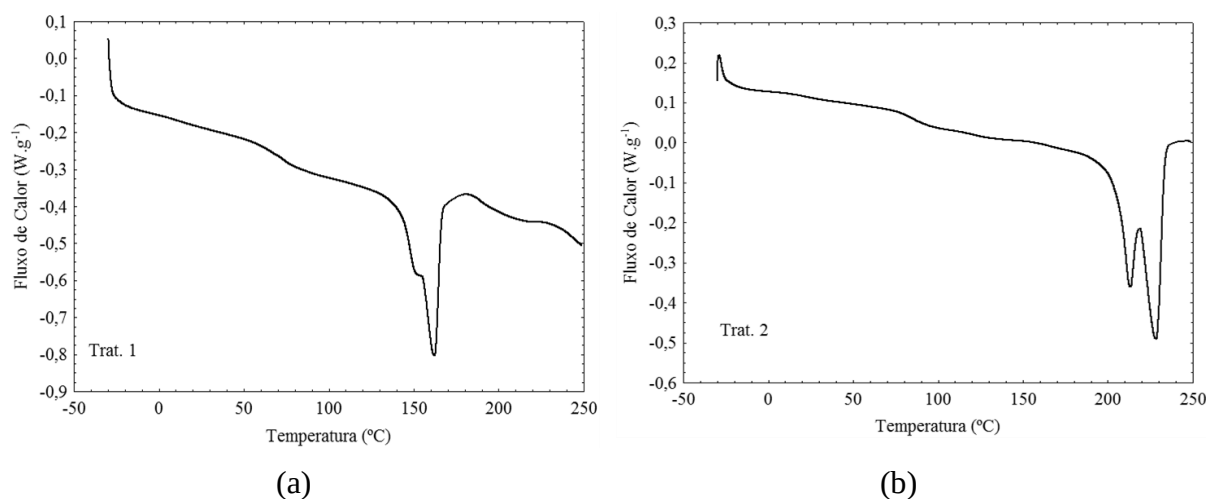
Baldino et al. (2018) e Chinnarasu et al. (2015) realizaram a precipitação de extratos de folha de oliveira por extração anti-solvente supercrítica e obtiveram partículas com diâmetro médio de $0,36$ a $1,6\mu\text{m}$ e $0,30$ a $1,06\mu\text{m}$, respectivamente. Estes autores não utilizaram o

polímero para a coprecipitação do extrato de folha de oliveira e obtiverem partículas maiores em comparação ao nosso estudo, sugerindo que o polímero associado à técnica de precipitação pode ser uma variável de processo que pode contribuir para diminuir o tamanho da partícula, além de contribuir para a proteção dos compostos de folhas de oliveira a ser encapsulado (MOURTZINOS et al., 2007).

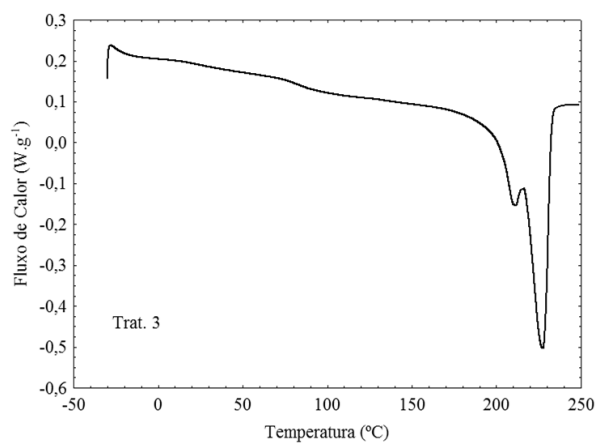
5.2.4 Calorimetria exploratória diferencial das partículas (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada para todos os tratamentos encapsulados, para polímero PHBV puro e também para o extrato utilizado no preparo dos encapsulados e são apresentadas na Figura 5.5. Esta análise foi realizada para detectar eventos ou reações endotérmicas e/ou exotérmicas.

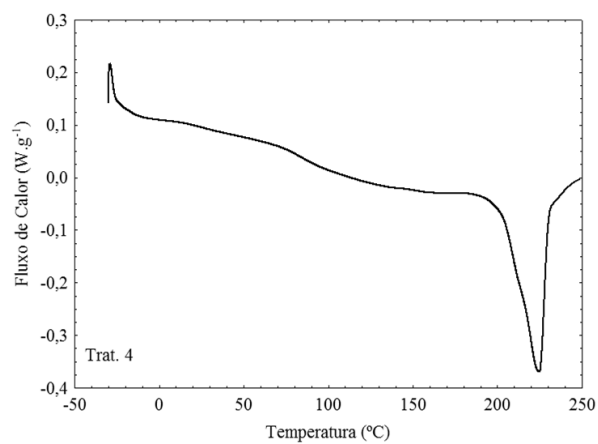
Figura 5.5- Curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) obtidas para determinação das temperaturas de fusão e entalpia dos ensaios de coprecipitação dos tratamentos 1 a 11(a a k) respectivamente, PHBV Puro (l) e extrato puro (m) com condições experimentais de pressão fixa de 10MPa e concentração de extrato de 10mg.mL⁻¹.



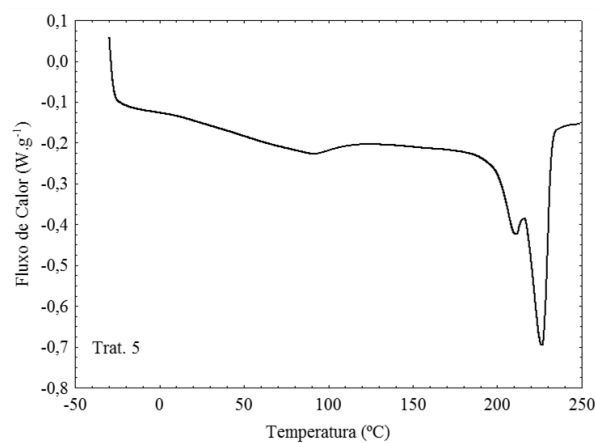
Continuação Figura 5.5



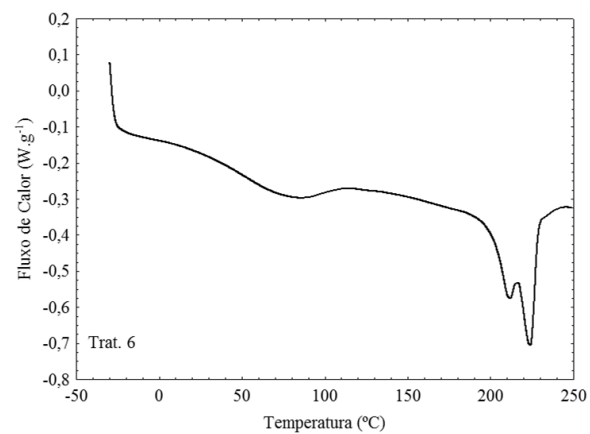
(c)



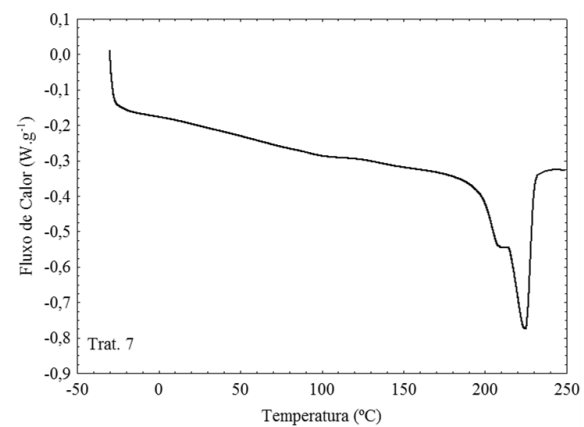
(d)



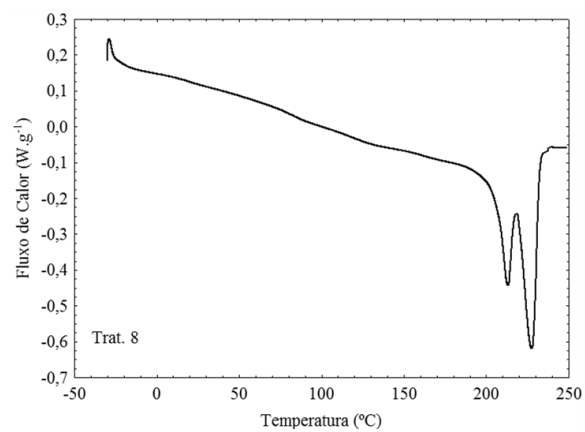
(e)



(f)

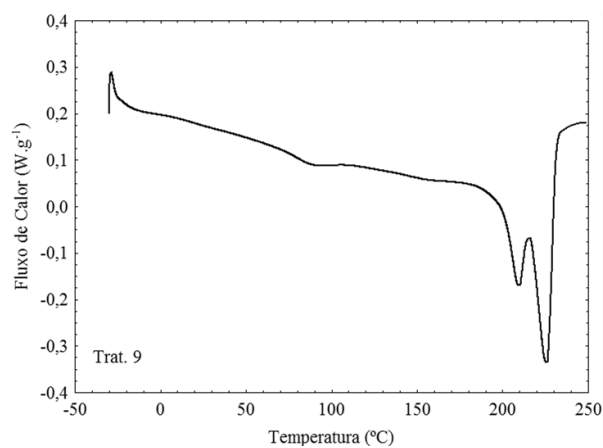


(g)

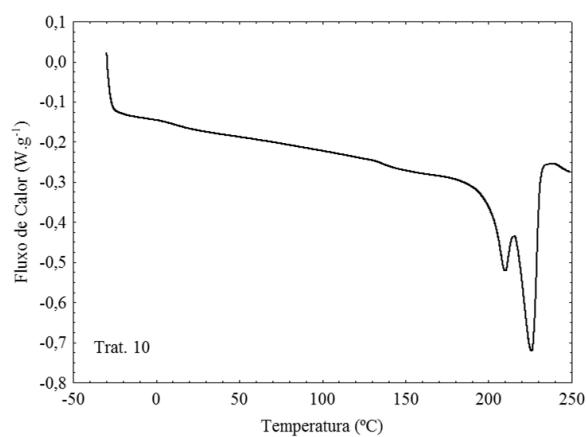


(h)

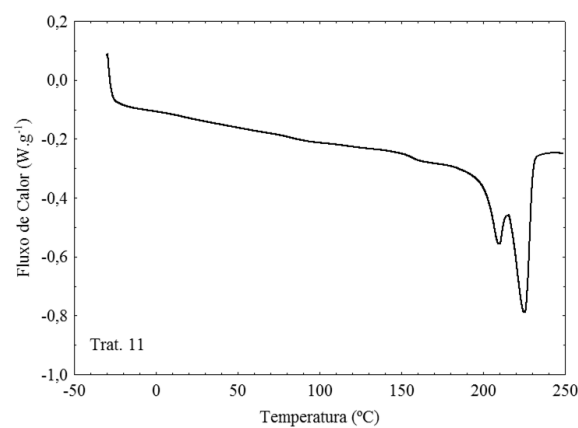
Continuação Figura 5.5



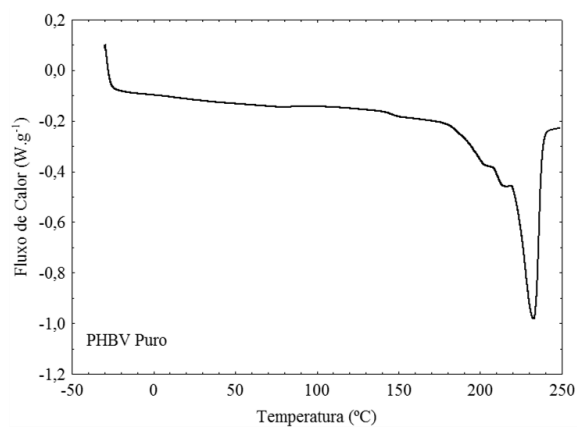
(i)



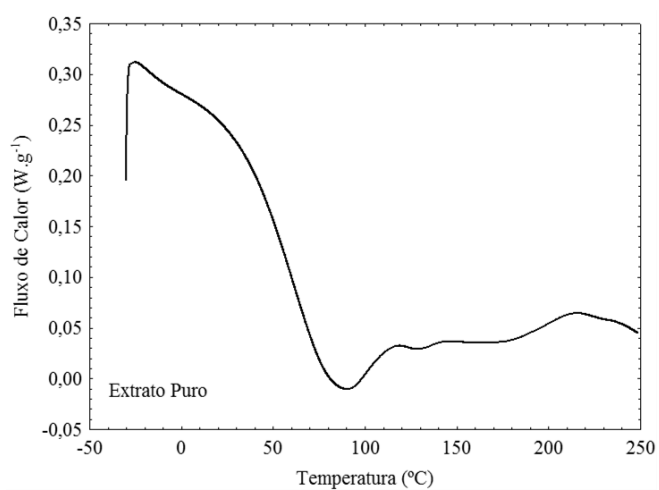
(j)



(k)



(l)



(m)

Avaliando as curvas de DSC para o extrato de folha de oliveira (Figura 5.5.m) e utilizando a tabela de eventos químicos e físicos de Saul Gordon (1963), observa-se um pico com características de um evento endotérmico entre as temperaturas de 50 e 60°C, este evento

pode estar relacionado à perda de constituintes voláteis de baixo peso molecular presente no extrato e está de acordo com o trabalho realizado por Baldino et al. (2018).

Outro pico com característica exotérmica é evidenciado na temperatura de 194,15°C ($\Delta H=3,21\text{Jg}^{-1}$) presente na curva de DSC do extrato de folha de oliveira e ausentes nas curvas de DSC dos coprecipitados, podem estar associadas a reações redox ou de decomposição de compostos presentes no extrato, como exemplo os compostos fenólicos que se degradam a essa temperatura (MOURE et al., 2001).

Estudos realizados por Mourtzinos et al. (2007), observaram via análise de DSC, um pico exotérmico no extrato de folha de oliveira na temperatura de 210°C e segundo os autores este está associado à hidrólise ou oxidação da oleuropeína. Como o pico exotérmico não foi identificado no complexo extrato de folha de oliveira/ β -ciclodextrina, significa que o extrato da folha de oliveira ficou protegido dentro cavidade de β -ciclodextrina e assim protegendo da oxidação, dados estes que corroboram com nosso estudo.

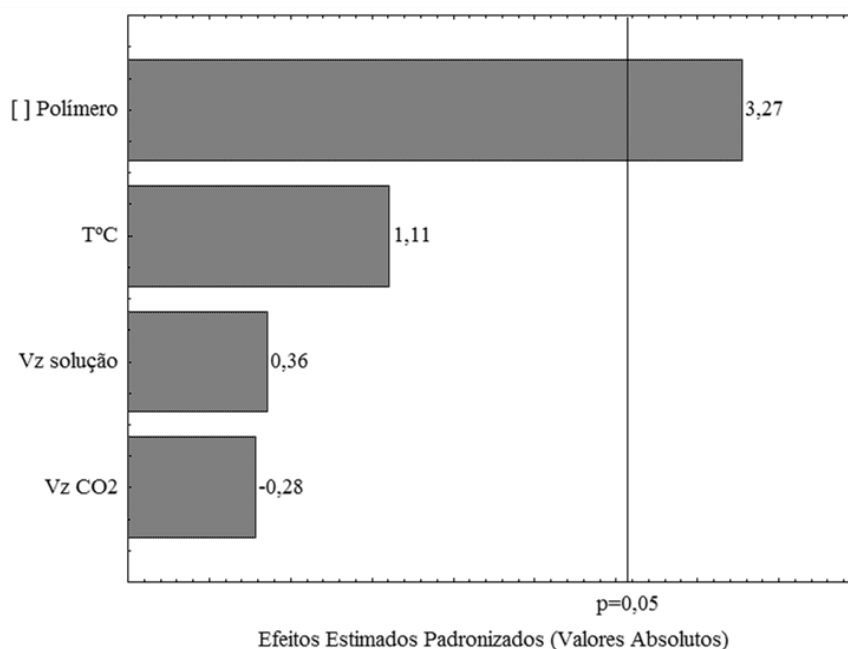
O polímero PHBV puro (Figura 5.5.I) indica a temperatura de fusão de 167,93°C ($\Delta H=64,88\text{Jg}^{-1}$) e está de acordo com a temperatura reportada na literatura que varia de 160 à 180°C, temperatura esta dependente do peso molecular e história térmica da amostra (POUTON; AKHTARB, 1996). Tao et al. (2009) analisaram o PHBV puro utilizado em seu estudo e a temperatura de fusão foi de cerca de 163°C e Javadi et al. (2011) relatam que a relação molar HV crescente de 0% a 34% no PHBV decresceu a temperatura de fusão de 175°C para 97°C.

Os dados reportados na Tabela 5.2 e Figura 5.5 indicam a inclusão do extrato ao polímero encapsulante, uma vez que, em todos os tratamentos encapsulados e analisados por DSC (Tratamento 1 a 11 ou a a k respectivamente), há um deslocamento do pico endotérmico para uma temperatura de fusão mais baixa e diminuição da entalpia quando comparado ao polímero puro, além disso, essa diminuição de temperatura está relacionada à diminuição da concentração do polímero em relação à concentração de extrato utilizada no preparo do encapsulado. A exemplificar, no tratamento 02 foi usado uma concentração de 3:1(m:m) polímero:extrato a qual apresenta maior temperatura de fusão de 165,09°C enquanto que no tratamento 06 foi usado uma concentração de 1:1(m:m) polímero:extrato a qual apresenta menor temperatura de fusão de 161,7°C. Aplicando a análise estatística, verificou-se que a concentração de polímero, influenciou significativamente ($p<0,05$) na análises de DSC exercendo um efeito positivo significativo (Figura 5.6), indicando que quanto maior a concentração de polímero, mais alta é a temperatura de fusão das partículas coprecipitadas.

Segundo Botana et al. (2010) e Choi et al. (2003) isso pode estar relacionado a uma redução no grau de cristalinidade, como resultado da mobilidade restrita da cadeia do polímero na presença de camadas nanodispersas do composto adicionado, no nosso caso extrato da folha de oliveira, diminuindo a temperatura de fusão. Evento semelhante também foi observado por Thiré et al. (2011) no preparo de nanocomposito de PHBV/atapulгите.

Reis et al. (2008) descreve que o ponto de fusão das misturas depende de muitos fatores, como morfologia, cinética de cristalização e composição da mistura.

Figura 5.6- Diagrama de Pareto com os efeitos estimados sobre as análises de DSC das partículas coprecipitadas de PHBV com extratos de folha de oliveira.



Vroman; Tighzert (2009) relatam que a temperatura de transição vítrea do PHBV é na gama de -5 a 20°C, porém não foi evidenciado aqui este evento nas curvas de DSC no polímero.

Os tratamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9 evidenciam um declive discreto nas curvas do DSC na faixa de temperatura de 50 e 60°C indicando a presença de extratos nestes tratamentos. Nos demais tratamentos, talvez não seja possível a identificação visual deste evento, considerando que a faixa de fluxo de calor gerada nos gráficos de DSC é muito pequena.

Nos termogramas das curvas de DSC dos tratamentos 1 a 11 (Figuras 5.5(a) a 5.5(k)) não se observa o evento exotérmico presente no extrato (Figura 5.5(m)), a ausência deste pico indica possível sobreposição do pico endotérmico da matriz polimérica e do extrato encapsulado. Outra justificativa seria a dispersão do extrato na matriz polimérica que diante da

análise de DSC mantém as características do polímero nos encapsulados (DHANARAJU et al., 2003).

Com a exceção dos tratamentos 1, 4 e 7, todos os demais tratamentos apresentaram picos duplos de fusão. Segundo Gunaratne; Sahnks (2005), esse comportamento está relacionado à fusão, recristalização e refusão durante o aquecimento e é característico de polímeros semi-cristalinos, onde ocorrem mudanças na formação do cristal (polimorfismo) e envelhecimento físico ou relaxamento da fração amorfa rígida. A presença de compostos diferentes e o peso molecular do polímero também podem influenciar nos picos.

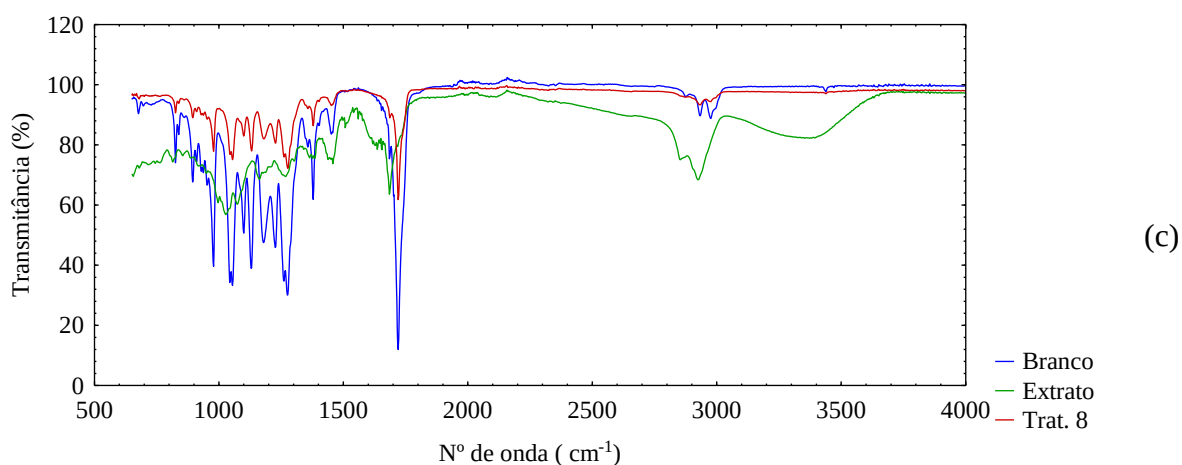
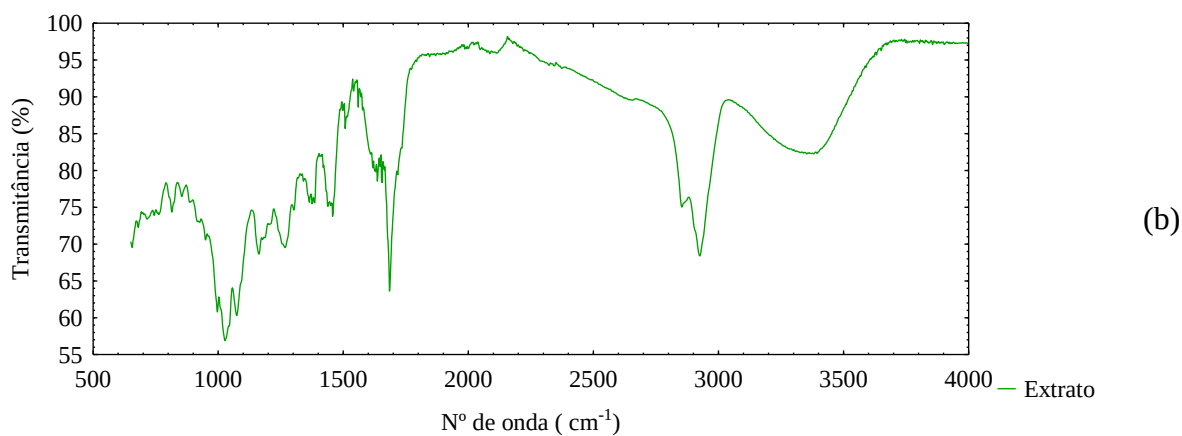
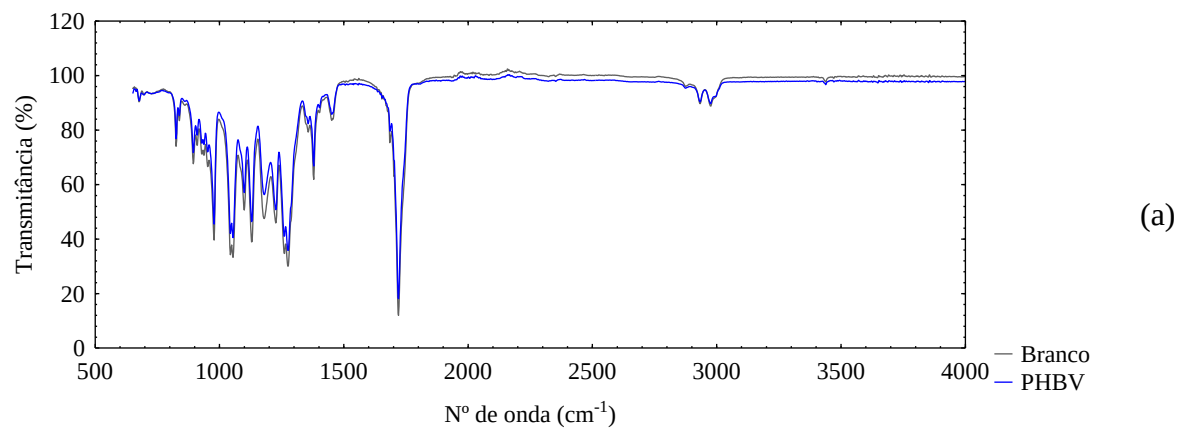
5.2.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)

A Figura 5.7 (a, b e c) mostra os espectros de FTIR do PHBV puro antes da precipitação, após a precipitação sem extrato (branco), o extrato de folha de oliveira puro e o tratamento 8 precipitado com o polímero PHBV e com o extrato de folha de oliveira.

O PHBV puro, Figura 5.7 (a), apresenta uma forte banda responsável pelo alongamento C=O, de ésteres saturados a 1720cm^{-1} . As bandas características de 800 a 975cm^{-1} corresponderam a vibrações de estiramento C-O-C- simétrico ou C-H, vibração de flexão fora do plano. Além disso, o alongamento antissimétrico em C-O-C conduz a bandas entre 1060 e 1150cm^{-1} . Entre 1200 e 1420cm^{-1} , houve bandas de deformação axial devido ao acoplamento da deformação angular no plano de ligação O-H e a deformação axial de C-O (C-O: de ácidos carboxílicos). Observando a Figura 5.7(a) é possível perceber que o PHBV não sofre efeito na estrutura química quando submetido ao processo de precipitação, por apresentar espectro similar antes e após a precipitação. O espectro de FTIR para o PHBV puro está de acordo com o espectro apresentado por Xiang et al. (2013).

O espectro do extrato puro, Figura 5.7(b), apresenta picos na faixa de 1000 a 1300cm^{-1} , característico de alcoóis, fenóis, éteres alifáticos e ésteres. Apresenta pico na faixa de 1550 a 1750cm^{-1} correspondentes a ligações C=O de ésteres ou ácidos carboxílicos e seus derivados, que pode ter suas bandas alteradas por efeitos de conjugação ou efeito indutivo dos grupos substituintes e ligações associadas às vibrações de núcleos aromáticos, possivelmente provenientes do composto majoritário presente no extrato, a oleuropeína. A banda espectral mais acentuada em 2920cm^{-1} é característica de ligação C-H alifática e a banda entre 3200 a 3500cm^{-1} é indicativa da presença de alcoóis, fenóis e ácidos carboxílicos que por vez, pode ocorrer o alargamento da banda quando a amostra é concentrada.

Figura 5.7- Espectros de FTIR do PHBV puro antes do encapsulamento, após o encapsulamento sem extrato (branco) (a), extrato de folha de oliveira puro (b) e tratamento 8, extrato puro e PHBV (c).



As mudanças espectrais observadas na Figura 5.7(c), para o tratamento 8 foram associadas com o aumento ou diminuição da intensidade das bandas, bem como o possível

deslocamento, aparecimento ou desaparecimento destas e, está associada a incorporação do extrato ao polímero.

Comparando as bandas espectrais do tratamento 8 em relação aos espectros do extrato puro e do polímero é possível observar diminuição da intensidade da banda espectral de 600 a 1720cm^{-1} no tratamento 8 em relação ao PHBV puro e o branco. Estes resultados indicam a incorporação do extrato ao polímero PHBV e podem ser confirmadas com as análises de DSC (Tabela 5.2 e Figura 5.5 a – m).

5.2.6 Estabilidade do extrato encapsulado

A estabilidade a temperatura ambiente e acondicionamento em frasco transparente do encapsulado de folhas de oliveiras foram testados quanto ao teor de FT, flavonoide e atividade antioxidante por um período de 210 dias.

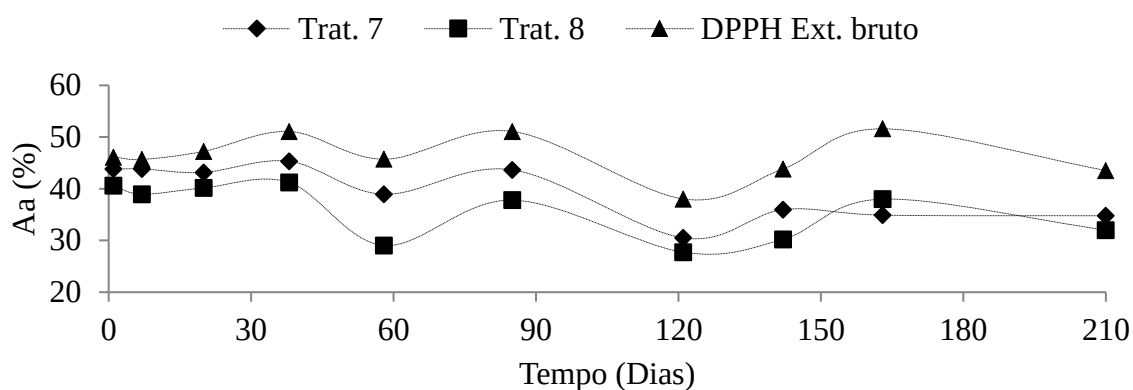
A Figura 5.8 (a e b) apresenta a evolução da Aa, teor de FT e flavonoides no decorrer dos dias de estocagem dos encapsulados de folha de oliveira. Importante ressaltar que a quantidade de massa de extrato bruto, usada na análise é a mesma massa de encapsulado, assim a representação gráfica é inferior para os encapsulados porque a eficiência de encapsulamento (EE) do tratamento 8 foi de 86% e a EE do tratamento 7 foi de 71,52%.

A atividade antioxidante do extrato bruto e do encapsulado (Figura 5.8.a) e os teores de FT e flavonoides (Figura 5.8.b) mantiveram-se praticamente estáveis ao longo dos dias, com leves oscilações. O esperado seria que todas as análises apresentassem comportamento similar, ou seja, ocorresse uma diminuição ao longo do tempo de estocagem nos teores de FT e flavonoides e como consequência também na Aa.

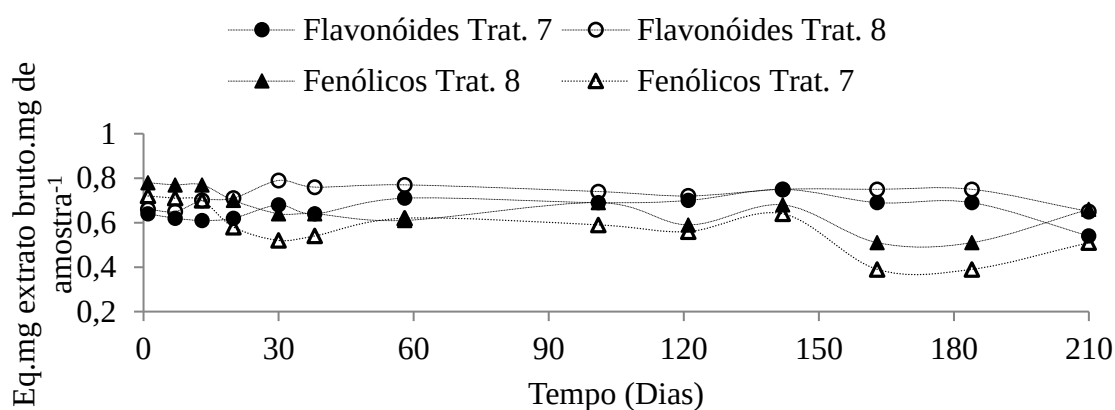
No entanto estas oscilações podem ter ocorrido por fatores amostrais, analíticos ou a outras variáveis que não foram avaliadas neste estudo, tal como a interação do extrato com o polímero no interior da cápsula, forma de liberação ao longo do tempo, degradação de compostos de maior peso molecular como a oleuropeína em compostos de menor peso molecular e maior Aa como hidroxitirosol e tirosol.

Ahmad-Qasem et al. (2016) avaliaram a influência da secagem e armazenamento de extratos de folhas de oliveira no potencial bioativo e na estabilidade do polifenol e obtiveram resultados semelhantes ao nosso estudo, com oscilações nos teores de fenólicos totais e Aa no período de 28 dias. Embora as análises foram realizadas por um período curto, foram consideradas estáveis pelos autores.

Figura 5.8- Acompanhamento da estabilidade dos extratos de folha de oliveira encapsulados Tratamento 7, 8 e extrato bruto via análise de Aa (a), FT e flavonoides (b).



(a)



(b)

Embora a estabilidade de compostos naturais seja o maior fator limitante para seu uso (ATHANASIADIS et al., 2018), a disponibilidade de dados literários ainda é muito restrita e uma análise mais conclusiva sobre a estabilidade só é possível com a realização de análises cromatográficas para a identificação dos componentes majoritários ao longo do período de estocagem.

5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS CAPÍTULO II

A eficiência de encapsulamento (EE) variou de 48,38 a 86%, sendo que a maior EE foi de 86%, obtida utilizando temperatura (60°C), vazão da solução (1mL.min⁻¹), concentração de polímero (30mg.mL⁻¹ solvente) e vazão de CO₂ (50mL.min⁻¹).

Através do processo de coprecipitação, foram obtidas partículas micrométricas apresentando tamanho médio de 0,30 a 0,71µm, sendo que o menor tamanho de partícula (0,30µm) foi obtido nas condições de 60°C, vazão da solução de 0,5mL.min⁻¹, concentração de polímero de 10mg.mL⁻¹ e vazão de CO₂ de 50mL.min⁻¹. A concentração de polímero influenciou significativamente (p>0,05), aumentando a distribuição e o tamanho médio de partícula.

Comparando as bandas espectrais e as curvas de DSC dos tratamentos coprecipitados em relação ao extrato puro e polímero é possível observar a possibilidade de incorporação do extrato ao polímero. A adição do extrato ao polímero diminui a temperatura de fusão do coprecipitado.

As análises de estabilidade do extrato mostraram que houve uma leve diminuição da atividade antioxidante (Aa), fenólicos totais e flavonoides, mas mantiveram-se praticamente estáveis ao longo do período de análise.

6 CONCLUSÕES

Entre os dois métodos de extração (EFS e PLE), a extração com líquido pressurizado apresentou rendimentos superiores (6,37 a 30,91%) de extratos comparados com os obtidos por EFS (0,24 a 0,67%), em menor tempo (110min) de extração.

Empregando o fluído supercrítico, o maior rendimento foi de 0,68% o a temperatura de 60°C e 25MPa e nas condições de temperatura e pressão (20°C e 16,5MPa) as concentrações de compostos FT (11,49mgAG.g⁻¹de extrato), flavonoides totais (20,48mgCAT.g⁻¹ extrato) e Aa (20,91%) foram maiores em relação aos demais extratos.

O maior rendimento global acumulado em extrato de folha oliveira utilizando PLE foi de 30,91% empregando solvente etanol:água (80:20 v:v), 10,3MPa, 60°C e 110min, no entanto os maiores teores de FT (386,42mgAG.g⁻¹ de extrato), flavonoides (33,43mgCAT.g⁻¹ de extrato), oleuropeína (73,65mg.g⁻¹ de extrato) e atividade antioxidante (IC₅₀ de 0,47mg.mL⁻¹) foi com o solvente etanol a 60°C, sendo este extrato selecionado para a etapa de encapsulamento.

Ambos os modelos cinéticos estudados, Sovová e Pardo-Castaño foram capazes de correlacionar bem a extração de folhas de oliveira com CO₂ sub e supercrítico e com líquido pressurizado em todas as condições estudadas.

A eficiência de encapsulamento (EE) variou de 48,38 a 86%, sendo que a maior EE foi de 86%, obtida utilizando temperatura (60°C), vazão da solução (1 mL.min⁻¹), concentração de polímero (30 mg.mL⁻¹ solvente) e vazão de CO₂ (50 mL.min⁻¹).

O tamanho médio das partículas foi de 0,30 a 0,71 µm, sendo que o menor tamanho de partícula (0,30µm) foi obtido nas condições de 60°C, vazão da solução de 0,5 mL.min⁻¹, concentração de polímero de 10 mg.mL⁻¹ e vazão de CO₂ de 50 mL.min⁻¹, sendo que a distribuição e o tamanho médio de partícula foram influenciados pela concentração de polímero.

Comparando as bandas espectrais, as curvas de DSC e de estabilidade dos tratamentos coprecipitados em relação ao extrato puro e polímero é possível observar a possibilidade de incorporação do extrato ao polímero e a estabilidade do mesmo ao longo do período de análise.

7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Na sequencia são apresentadas algumas sugestões de trabalhos futuros:

Em relação aos extratos obtidos é possível utilizar técnicas de purificação que viabiliza o isolamento de compostos alvos, como exemplo destas técnicas podemos citar a cromatografia flash à baixa pressão;

Avaliação da bioatividade dos extratos obtidos;

A oleuropeína sofre degradação em altas temperaturas e é convertida em compostos de menor peso molecular como hidroxitorosol e tirosol, com elevada atividade antioxidante e melhor estabilidade térmica norteando trabalhos com possíveis aplicações.

Em relação à etapa de precipitação utilizar outras técnicas de encapsulamento com a Extração Fluida Supercrítica de Emulsões ou Supercritical Fluid Extraction of Emulsions (SFEE);

Realizar testes *in vitro* de meios simuladores (sistema digestivo) identificando o comportamento das partículas neste sistema;

Realizar estudos *in vitro* de aplicação dos encapsulados e verificar o comportamento relacionado à estabilidade e melhoria na qualidade dos produtos alimentícios;

Realizar testes para verificar a influência da luz e do oxigênio nas substâncias puras e nas partículas obtidas;

Agregar em um único sistema em alta pressão a extração e encapsulamento de extratos de folha oliveira;

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, F.C. **Determinação de multi resíduo de pesticida em cenouras utilizando extração com líquido pressurizado e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado, Instituto de Química. Porto Alegre, 2006.

ABAZA, L. et al. Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. **Grasas y aceites**, v. 62, p. 96-104, 2011.

ABAZA, L. et al. Olive Tree (*Olea europae* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. **Antioxidants**, v. 4. p. 682–698, 2015.

AGUIAR, G. P. et al. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: Dissolution, solubility and *in vitro* antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 112. p. 1-5, 2018.

AHMAD-QASEM, B. et al. Drying and storage of olive leaf extracts. Influence on polyphenols stability. **Industrial Crops and Products**, v. 79. p. 232-239, 2016.

AKOWUAH, G. A., MARIAM, A., e CHIN, J. H. The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. **Pharmacognosy Magazine**, v.5. n. 17. p. 81–85, 2009.

ALCÁZAR-ALAY, C. et al. Extraction Process as the Pretreatment Step for Sugar Production from Acid Hydrolysis. **Food and Public Health**, v.5. p. 47-55, 2015.

ALI, S. S. et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41. n. 1. p. 1-15, 2008.

ALMEIDA, P. P., MEZZOMO, N., e FERREIRA, S. R. S. Extraction of *Menthaspicata* L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition. **Food and Bioprocess Technology**, v.5. n. 2. p. 548–559, 2012.

AL-RIMAWI, F. Development and validation of a simple reversed-phase HPLC-UV method for determination of oleuropein in olive leaves. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22 n.3. p. 285-289, 2013.

ALTHANS, D.; SCHRADER, P.; ENDERS, S. Solubilisation of quercetin: Comparison of hyperbranched polymer and hydrogel. **Journal of Molecular Liquids**, v. 196. p. 86–93, 2014.

AMEER, K.; SHAHBAZ, H. M.; KWON, J-H. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 16. p. 295-315, 2017.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients. Springer Briefs in Food, **Health and Nutrition**, 96 p. 2014.

ANBINDER, P. S., et al. Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 1. p. 80–87, 2001.

ANTUNES, S. I.M. Micronizacão Supercrítica do β -Caroteno, 2007.

ARAÚJO, M. E. et al. Supercritical extraction of pupunha (*Guililema speciosa*) oil in a fixed bed using carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, n.3, p. 297-306, 2000.

ARMENTEROS, M. et al. The application of natural antioxidants via brine injection protects Iberian cooked hams against lipid and protein oxidation. **Meat Science**, v. 116. p. 253–9, 2016.

ARNALDI, S.; TYSHENKO, M. G. Nanotech traveling abroad: The international dimension of nanotechnology as a changing concept - A guest editorial. **Technology in Society**, v. 37. n 1. p. 1–3, 2014.

ATHANASIADIS, V. et al. Stability effects of methyl β -cyclodextrin on *Olea europaea* leaf extracts in a natural deep eutectic solvent. **European Food Research and Technology**, p. 1-10, 2018.

AYAS, N.; YILMAZ, O. A shrinking core model and empirical kinetic approaches in supercritical CO₂ extraction of safflower seed oil. **Journal Supercritical Fluids**, v. 94. p. 81–90, 2014.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v.117. n. 4. p. 126-436, 2013.

BAJEROVÁ, P. et al. Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the isolation of nitro compounds from soils. **Journal of Separation Science**, v. 31. n. 8. p. 1408–1414, 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99. n. 1. p. 191–203, 2006.

BALDINO, L. et al. Concentrated oleuropein powder from olive leaves using alcoholic extraction and supercritical CO₂ assisted extraction. **Journal Supercritical Fluids**, v. 133. p. 65–69, 2018.

BASEGMEZ, H.I.O. et al. Biorefining of blackcurrant pomace into high value functional ingredients using supercritical CO₂, pressurized liquid and enzyme assisted extractions. **Journal Supercritical Fluids**, v. 124. p. 10–19, 2017.

BATISTA, C. et al. Supercritical CO₂ extraction of açai (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp. **Journal Supercritical Fluids**, v. 107. p. 364–369, 2016.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. et al. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. **Food Research International**, v. 44. p. 1094–1101, 2011.

BERMEJO, D. V. et al. Pressurized liquid extraction of caffeine and catechins from green tea leaves using ethyl lactate, water and ethyl lactate + water mixtures. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96. p. 106–112, 2015.

BILGIN, M.; SAHIN, S. Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44. n. 1. p. 8-12, 2013.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L. **Molecules**, v.18. n. 6. p. 6852–6865, 2013.

BOLAÑOS, J. et al. Extraction of interesting organic compounds from olive Oil waste. **Grasas y Aceites**, v. 57. p. 95–106, 2006.

BOSCHETTO, D. L. et al. Encapsulation of bixin in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 60. p. 22–29, 2014.

BOSCHETTO, D. L. et al. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v.50. p. 352–360, 2013.

BOTANA, A. et al. Effect of modified montmorillonite on biodegradable PHB nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 47. p. 263–270, 2010.

BOUAZIZ, M.; SAYADI, S. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107. p. 497–504, 2005.

BRAHMI, F. et al. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. **Industrial Crops and Products**, v. 38. n. 1. p. 146–152, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28. n. 1, 25–30, 1995.

BRAUNEGG, G. **Polyhydroxyalkanoates: Environmentally Degradable Plastics from Renewable Resources**. In: Environmentally degradable polymers, Trieste, Italy. Proceedings... Trieste, p.26-33, 1998

BRIANTE, R. et al. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. **Plant Science**, v. 162. n. 5. p. 791–798, 2012.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais E Processos**, v.6. n. 2. p. 127–139, 2011.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60. p. 309–319, 1938.

BRUNEL, D. G. et al. Natural additives for poly (hydroxybutyrate - co - hydroxyvalerate) - PHBV: effect on mechanical properties and biodegradation. **Materials Research**, v. 17. n. 5. p. 1145–1156, 2014.

BRUNNER, G. Gas Extractions – **An Introduction to fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, n. 1, p. 1-387. 1994.

BRUNNER, G., Supercritical process technology related to energy and future directions - An introduction. **Journal Supercritical Fluids**, v. 96. p. 11–20, 2015.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **The Analyst**, v. 126. n. 7. p. 1182–1193, 2001.

CAMPARDELLI, R.; BALDINO, L.; REVERCHON, E. Supercritical fluids applications in nanomedicine. **Journal Supercritical Fluids**, v. 101. p. 193-214, 2015.

CAMPONE, L. et al. Application of pressurized liquid extraction in the analysis of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nuts. **Journal of Separation Science**, v. 32. n. 21. p. 3837-3844, 2009.

CASTRO, M. D. L.; GARCÍA, J.L. L. Chapter 7 – **Analytical supercritical fluid extraction, In Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, v. 24. p. 281-345, 2002.

CASTRO-PUYANA et al. Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. **Food Research International**, v. 99. p. 1048-1055, 2017.

CHABARIBERI, R. A. O. et al. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de Maytenus (*Celastraceae*) e de Passiflora (*Passifloraceae*) e comparação com método CLAE-UV. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol.19, n.4. p. 860-864, 2009.

CHEBIL, L. et al. Solubilities inferred from the combination of experiment and simulation. Case study of quercetin in a variety of solvents. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114. n. 38. p. 12308–12313, 2010.

CHINNARASU, C. et al. Precipitation of antioxidant fine particles from *Olea europaea* leaves using supercritical antisolvent process. **Journal Supercritical Fluids**, v. 97. p. 125–132, 2015.

CHOI, W.M. et al. Preparation and characterization of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-organoclay nanocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90. p. 525–529, 2003.

CICCO, N. et al. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, v. 91. n. 1. p. 107–110, 2009.

COCERO, M. J.; CALVO, L. Supercritical Fluid Extraction of Sun flower Seed Oil with CO₂ – Etanol Mixtures. **Journal of the Amer. Oil Chemists' Society**, v.73. p. 1573-1578, 1996.

CORREA, Madeline de Souza. **Extração de inflorescência da bananeira (*Musa paradisíaca* L.) utilizando CO₂ supercrítico e propano comprimido**. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, Universidade Federal Paraná, Curitiba, 2016. Disponível em: <<http://www.posalim.ufpr.br/Pesquisa/dissertacoes.htm#2015-2016>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

COSTA, M. S. et al. Supercritical antisolvent precipitation of PHBV microparticles. **International Journal Pharmaceutics**, v.328. p. 72–77, 2007.

CZAIKOSKI, K. Kinetics, composition and biological activity of Eupatorium intermedium flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane. **Journal Supercritical Fluids**, v. 97. p. 145–153, 2015.

DA ROSA, C. G. et al. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 58. p. 527–533, 2014.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15. n. 10. p. 7313–7352, 2010.

DAL MAGRO, C. et al. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. **Journal Supercritical Fluids**, v. 127. p. 182–190, 2017.

DAUKŠAS, E. et al. Effect of fast CO₂ pressure changes on the yield of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) and celery (*Apium graveolens* L.) extracts. **Journal Supercritical Fluids**, v. 22. n. 3. p. 201–210, 2002.

DE LUCAS, A. et al. Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. **Journal Supercritical Fluids**, v. 22. n. 3. p. 221–228, 2002.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **Journal Supercritical Fluids**, v. 92. p. 115–176, 2014.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **Journal Supercritical Fluids**, v.92. p. 115–176, 2014.

DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v.71. p. 126–134, 2008.

DELLA PORTA, G.; CAMPARDELLI, R.; REVERCHON, E. Monodisperse biopolymer nanoparticles by Continuous Supercritical Emulsion Extraction. **Journal Supercritical Fluids**, v.76. p. 67–73, 2013.

DHANARAJU, M. D. et al. Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones. **International of Pharmaceutics**, v. 268. p. 23–29, 2003.

DI MAIO, I. et al. Characterization of 3, 4-DHPEA-EDA oxidation products in virgin olive oil by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.138. n. 2-3. p. 1381–1391, 2013.

DONSÌ, F. et al. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion- based delivery systems. **Procedia Food Science**, v.1. p. 1666–1671, 2011.

DUBA, K. S.; FIORI, L. Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction. **Journal Supercritical Fluids**, v. 38. p. 33-43, 2015.

DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. Nanotecnologia, **Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Ed. Artliber, São Paulo, 2006.

ESFANJANI, A. F. et al. Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 165. p. 149–155, 2015.

ESPADA-BELLIDO et al. Alternative Extraction Method of Bioactive Compounds from Mulberry (*Morus nigra* L.) Pulp Using Pressurized-Liquid Extraction. **Food Analytical Methods**, p. 1-12, 2018.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21. p. 510-523, 2010.

FATHI, M. et al. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39. p. 18-39, 2014.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. **Food Chemistry**, v. 103. n. 1. p. 188–195, 2007.

FIORI, L. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. **Journal Supercritical Fluids**, v. 94. p. 71–80, 2014.

FRANCESCHI, E. et al. Co-precipitation of beta-carotene and bio-polymer using supercritical carbon dioxide as antisolvent. **Open Chemical Engineering Journal**, v.4. p. 11–20, 2010.

FRANCESCHI, E. et al. Phase behavior and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as antisolvent. **Journal Supercritical Fluids**, v.44. p. 8–20, 2008.b.

FRANCESCHI, E. et al. Precipitation of β -carotene and PHBV, and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal Supercritical Fluids**, v. 47. p. 259–269, 2008.a.

FRANCESCHI, E. et al. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 95. p. 656-663, 2009.

FRANQUIN-TRINQUIER, S. et al. Optimization of the extraction of apple monomeric phenolics based on response surface methodology: Comparison of pressurized liquid-solid extraction and manual-liquid extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34. n. 1. p. 56–67, 2014.

GALANAKIS, C. M. et al. A Knowledge Base for the Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. **International Journal of Food Properties**, v. 16. n. 2. p. 382-396, 2013.

GANJE, M. et al. Modeling quality changes in tomato paste containing microencapsulated olive leaf extract by accelerated shelf life testing. **Food and Bioprocess Processing**, v. 97. p. 12–19, 2016.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v.15. n. 12. p. 8813-8826, 2010.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 69. n. 1. p. 1-9, 2008.

GENENA, A.K. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Food Science and Technology**, v. 28. p. 463–469, 2008.

GILL, P., MOGHADAM, T.T., RANJBAR, B., Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. **Journal Biomolecular Techniques**, v. 21. p. 167–93, 2010.

GOLMAKANI, E. et al. Phenolic and flavonoid content, and antioxidants capacity of pressurized liquid extraction and percolation method from roots of *Scutellaria pinnatifida* A. Hamilt. sub sp *alpina* (Bornm) Rech. f. **Journal Supercritical Fluids**, v. 95. p. 318–324, 2014.

GOMES, M. T. M. S.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Trends in Particle Formation of Bioactive Compounds Using Supercritical Fluids and Nanoemulsions. **Food and Public Health**, v. 2. p. 142-152, 2012.

GORDON, S. Differential thermal analysis. **Journal Chemical Education** , v. 40. n. 2. p A87, 1963.

GRIGORAS, C-G. et al. Bioactive compounds extraction from pomace of four apple varieties. **Journal of Engineering Studies and Research**, v. 18. n. 1. p. 96-103, 2012.

GUAMÁN-BALCÁZAR, M. C. et al. Precipitation of mango leaves antioxidants by supercritical antisolvent process. **Journal Supercritical Fluids**, v. 128. p. 218–226, 2017.

GUINDA, Á. et al. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64. n. 1. p. 431–438, 2015.

GUNARATNE, L. M. W. K.; SHANKS, R. A. Melting and thermal history of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC. **Thermochimica Acta**, v. 430. n. 1–2. p. 183–190, 2005.

GUO, J.; GIUSTI, M. M.; KALETUNÇ. G. Encapsulation of purple corn and blueberry extracts in alginate-pectin hydrogel particles: Impact of processing and storage parameters on encapsulation efficiency. **Food Research International**, v. 107, p. 414-422, 2018.

HAYES, J. E. et al. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**, v. 126. n. 3. p. 948–955, 2011.

HAYES, J. E. et al. The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. **Meat Science**, v. 83. n. 2. p. 201–208, 2009.

HE, L. et al. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC e ABTS assay. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90. p 215- 223, 2012.

HEDRICK, J. L.; MULCAHEY, L. J.; TAYLOR, L. T. Fundamental Review Supercritical Fluid Extraction. **Microchimica Acta**. v. 108. n. 3-6. p. 115-132, 1992.

HERRERO, M. et al. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v.43. p. 67-83, 2013.

HERZI, N. et al. Supercritical CO₂ extraction of *Tetradlea articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling. **Journal Supercritical Fluids**, v. 82. p. 72–82, 2013.

HICHRI, I. et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 62. n. 8. p. 2465–2483, 2011.

HU, J. et al. Pressurized liquid extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) with bioethanol: An efficient and sustainable approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1218. n. 34. p. 5765–5773, 2011.

HU, S.G., JOU, C.H., YANG, M.C. Biocompatibility and antibacterial activity of chitosan and collagen immobilized poly (3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid). **Carbohydrate Polymers**, v. 58. p. 173–179, 2004.

HUANG, Z. et al. Theoretical models for supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 2–26, 2012.

JACQUES, R. A. Pressurized liquid extraction of mate tea leaves. **Analytica Chimica Acta**, v. 625. n. 1. p. 70–76, 2008.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Liquid-liquid extraction for the enrichment of edible oils with phenols from olive leaf extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56. n. 7, p. 2505–2511, 2008.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1136. n. 2, p. 185–191, 2006.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1108. n. 1. p. 76–82, 2006.

JAVADI, A. et al. **Biobased and Biodegradable PHBV-Based Polymer Blends and Biocomposites: Properties and Applications**. In Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications, Srikanth Pilla, p. 372–396, 2011.

JILANI, H. et al. Improved bioaccessibility and antioxidant capacity of olive leaf (*Olea europaea* L.) polyphenols through biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrial Crops and Products**, v. 84. p. 131–138, 2016.

JIN, H. Y.; XIA, F.; ZHAO, Y. P. Preparation of hydroxypropyl methyl cellulose phthalate nanoparticles with mixed solvent using supercritical antisolvent process and its application in co-precipitation of insulin. **Advanced Powder Technology**, v. 23. n. 2. p. 157–163, 2012.

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

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51. n. 18. p.5207–5213, 2013.

JUN, D. et al. Crystallization and mechanical properties of reinforced PHBV composites using melt compounding: Effect of CNCs and CNFs. **Carbohydrate Polymer**, v.168. p. 255–262, 2017.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **Journal Supercritical Fluids**, v. 20. p. 179-219, 2001.

KAGA, K. et al. Nanoparticle formation of PVP/astaxanthin inclusion complex by solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS): Effect of PVP and astaxanthin Z-isomer content. **Journal Supercritical Fluids**, v. 136. p. 44-51, 2018.

KAILIS, S. E.; HARRIS, D. **Producing Table Olives**. Landlinks. Australia, 2007.

KALOGIANNIS, C. G.; MICHAIOLOF, C. M.; PANAYIOTOU, C. G. Microencapsulation of amoxicillin in poly (*L*-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45. p. 8738–8743, 2006.

KAMALI, H. et al. Optimization of phenolic and flavonoid content and antioxidants capacity of pressurized liquid extraction from *Dracocephalum kotschy* via circumscribed central composite. **Journal Supercritical Fluids**, v.107. p. 307–314, 2016.

KAPLAN, D. L. Biopolymers from Renewable Resources. **Biopolymers from Renewable Resources**, p. 1-29, 2013.

KHALIL, M. M. H. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v.7. n. 6. p. 1131-1139, 2013.

KIRAN, E. Supercritical fluids and polymers – The year in review – 2014. **Journal Supercritical Fluids**, v. 110. p. 126-153, 2016.

KIRITSAKIS, K. et al. Valorization of Olive Leaves: Spray Drying of Olive Leaf Extract. **Waste and Biomass Valorization**, v.9. n. 4. p. 619-633, 2017.

KIRITSAKIS, K. et al. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87. n. 4. p. 369–376, 2010.

KITADA K. et al. Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 84. p. 657–661, 2009.

KOSHY, O; SUBRAMANIAN, L; THOMAS, S. Chapter 5– Differential Scanning Calorimetry in Nanoscience and Nanotechnology. **Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization** in: Micro and Nano Technologies. p. 109-122, 2017.

KOUDOUNAS, K. et al. Transcriptional profiling unravels potential metabolic activities of the olive leaf non-glandular trichome. **Frontiers in Plant Science**, v.6. p. 1–10, 2015.

KRISHNAIAH, D. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of an isolated *Morinda citrifolia* L. methanolic extract from Poly-ethersulphone (PES) membrane separator. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, v. 27. n. 1. p. 63–67, 2013.

KUNIOKA, M., DOI, Y. Thermal Degradation of Microbial Copolyesters: Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). **Macromolecules**, v. 23. p. 1933–1936, 1990.

LAFKA, T.-I. et al. Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential as Edible Oils Antioxidants. **Foods**, v.2. n. 1. p. 18–31, 2013.

LAGUERRE, M. et al. Characterization of olive-leaf phenolics by esi-ms and evaluation of their antioxidant capacities by the cat assay. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86. p. 1215–1225, 2009.

LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review. **Talanta**, v. 53. n. 4. p. 771–782, 2001.

LAPUERTA, M. et al. Comparison between the kinetics of devolatilisation of forestry and agricultural wastes from the middle-south regions of Spain. **Biomass and Bioenergy**, v. 31. n. 1. p. 13–19, 2007.

BORDES, P; POLLET, E.; AVÉROUS, L. **Potential Use of Polyhydroxyalkanoate (PHA) for Biocomposite Development in: Nano-and Biocomposites**. 1 st edn. CRC press, Taylor and Francis group, USA, p. 193-226, 2010.

LE FLOCH, F. et al. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. **Talanta**, v. 46. n. 5. p. 1123–1130, 1998.

LEE, M. H.; LIN, C. C. Comparison of techniques for extraction of isoflavones from the root of *Radix Puerariae*: Ultrasonic and pressurized solvent extractions. **Food Chemistry**, v.105. n. 1. p. 223–228, 2007.

LEE, O. H. et al. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. **Bioresource Technology**, v. 100. n. 23. p. 6107–6113, 2009.

LEE, W. J. et al. Microencapsulation of red palm oil as an oil-in-water emulsion with supercritical carbon dioxide solution-enhanced dispersion. **Journal of Food Engineering**, v. 222. p. 100-109, 2018.

LEYVA-JIMÉNEZ et al. Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction for recovering bioactive compounds from *Lippia citriodora* leaves. **Food Research International**, v. 109. p. 213-222, 2018.

LI, W. et al. Preparation and characterization of PHBV microsphere/45S5 bioactive glass composite scaffolds with vancomycin releasing function. **Materials Science and Engineering: C**, v. 41. p. 320–328, 2014.

LIAKOPOULOS, G.; STAVRIANAKOU, S.; ARABOURNIOTIS, G. Trichome layers versus dehaired lamina of *Olea europaea* leaves: Differences in flavonoid distribution, UV-absorbing capacity, and wax yield. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55. n. 3. p. 294–304, 2006

LINDY, J. **Supercritical Fluid extraction technology, applications and limitations**. Nova Science Publishers, Nova York, 131 p. 2015.

LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. The NIST Chemistry WebBook: A chemical data resource on the Internet. **NIST Chemistry WebBook**, 46. 5. 1059-1063, 2001.

LIU, L. et al. W/O Nano-Emulsions with Olive Leaf Phenolics Improved Oxidative Stability of Sacha Inchi Oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120. p. 1-8. 2018.

LOSS, R.A. et al. Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. **Journal Food Science and Technology** v. 53. p. 3859–3864, 2016.

LUPO, B. et al. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. **Food Hydrocolloids**, v. 49. p. 25–34, 2015.

LUTHER, S. K.; BRAEUER, A. High-pressure microfluidics for the investigation into multi-phase systems using the supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE). **Journal Supercritical Fluids**, v.65. p. 78–86, 2012.

LUTHRIA, D. L. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. **Food Chemistry**, v.107. n. 2. p. 745–752, 2008.

LUTHRIA, D. L. Optimization of extraction of phenolic acids from a vegetable waste product using a pressurized liquid extractor **Journal of Functional Foods**, v.4. n. 4. p. 842–850, 2012.

MACHADO, A. P. D. F. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods. **Food Research International**, v.77. p. 675–683, 2015.

MACHADO, B. A. S. et al. Supercritical Fluid Extraction Using CO₂: Main Applications and Future Perspectives, **Separation Science and Technology**, v.48. n. 18. p. 2741-2760, 2013.

MACHADO, F. R. S. et al. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54. p. 17–21, 2014.

MARTINS, G. M. *Olea europaea* L. olive. **The Woody Plant Seed Manual**. Oleaceae Olive Family. Pgs 753-756. 2008. Disponível em: <www.rngr.net/publications/wpsm/genera/o/at_download/file>. Acesso em: 06 de jul 2011.

MAUL, A. A. Fluido Supercrítico, Situação atual e futuro da extração supercrítica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.16, p. 42-46, 1999.

MEIRELES, M. A. a. Extracting Bioactive Compounds for Food Products - Theory and Applications. **Contemporary Food Engineering**. 464 p. 2009

MENDIOLA, J.A. et el. **Extração de Produtos Naturais: Princípios e Aplicações In: Chapter 6: Supercritical Fluids Extraction**. In Rostagno, M. A. e Prado, J. M. Madrid, Espanha, Research CIAL, p. 196-230, 2013.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48. n. 3, 577–599, 2000.

MONTES, A. et al. Processing naproxen with supercritical CO₂. **Journal Supercritical Fluids**, v.75. p. 21–29, 2013.

MORET, S. et al. Optimisation of pressurised liquid extraction (PLE) for rapid and efficient extraction of superficial and total mineral oil contamination from dry foods. **Food Chemistry**, v.157. p. 470–475, 2014.

MORET, S. et al. Optimization of pressurized liquid extraction (PLE) for rapid determination of mineral oil saturated (MOSH) and aromatic hydrocarbons (MOAH) in cardboard and paper intended for food contact. **Talanta**, v.115. p. 246–252, 2013.

MORET, S; CONTE, L.S. 3 - **Pressurized liquid extraction (PLE)**. In: Moret, S. Purcaro, G. e Conte, L. S. Il campione per l'analisi chimica Tecniche innovative e applicazioni nei settori agroalimentare e ambientale. Itàlia, Scienzaperta, Novate Milanese (MI), p. 53-80, 2014.

MOURA, P. M. et al. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidiumguajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. **Journal Supercritical Fluids**, v. 62. p. 116–122, 2012.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72. n. 2 p.145-171, 2001.

MOURTZINOS, I. et al. Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 55. n. 22. p. 8088-8094, 2007.

MOZAFARI M.R. et al. Recent trends in the lipid-based nano encapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal Science Food and Agriculture**, v. 86. p. 2038–2045, 2006.

MUNIN, A. E.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphrnlolic Compouds; a Review. **Pharmaceutics**, v.3. p. 793-829, 2011.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703. n.1. p. 8-18,2011.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41. n. 5. p. 1523–1542, 2006.

NEROME, H. et al. Nanoparticle formation of lycopene/ β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent precipitation. **Journal Supercritical Fluids**, v. 83. p. 97–10, 2013.

NIETO, A. et al. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27. n. 9. p. 752-764, 2010.

OMAR, S. H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. **Scientia Pharmaceutica**, v. 78. n. 2. p. 133-154, 2010.

OSÓRIO-TOBÓN, J. F; MEIRELES, M. A. A. Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. **Food and Public Health**, v. 6. n. 3. p. 289-303, 2013.

OTERO, P. Pressurized Liquid Extraction (PLE) as an Innovative Green Technology for the Effective Enrichment of Galician Algae Extracts with High Quality Fatty Acids and Antimicrobial and Antioxidant Properties. **Marine Drugs**, v. 16. n. 5. p. 156, 2018.

OTERO-PAREJA, M. J. et al. Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. **Molecules**, v.20. n. 6. p. 9686-9702, 2015.

PACHECO, C. et al. Retention and pre-colon bioaccessibility of oleuropein in starchy food matrices, and the effect of microencapsulation by using inulin. **Journal Funct. Foods**, v. 41. p. 112–117, 2018.

PARDO-CASTAÑO, C.; VELÁSQUEZ, M.; BOLAÑOS, G. Simple models for supercritical extraction of natural matter. **Journal Supercritical Fluids**, v 97, p. 165–173, 2015.

PARHI, R.; SURESH, P. Supercritical fluid technology: a review. **Journal of advanced pharmaceutical science and technology**, v.1. p. 13-36, 2013.

PENG, D.-Y.; ROBINSON, D. B. A New Two-Constant Equation of State. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals**, v.15. n. 1. p. 59–64, 1976

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v.3. n. 3. p. 340–372, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39. n. 7. p. 791–800, 2006.

PICH, A. et al. Preparation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) particles in O/W emulsion. **Polymer**, v.47. n. 6. p. 1912–1920, 2006.

PILLA, S. **Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications**. Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications. Editora: John Wiley and Sons. 2011.

PIRES, T.C. Parcerias Estratégias/Centro de Estudos Estratégicos. n. 18. Brasília: CGEE, 2004.

POUTON, C. W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18. p. 133-162, 1996.

PRIAMO, W. L. et al. In vitro release profiles of β -carotene encapsulated in PHBV by means of supercritical carbon dioxide micronization technique. **Journal Supercritical Fluids**, v. 56. p. 137–143, 2011.

PRIAMO, W. L. et al. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal Supercritical Fluids**, v. 54. p. 103–109, 2010.

RAHMANIAN, N.; JAFARI, S. M.; WANI, T. A. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42. n. 2. p. 150–172, 2015.

REIS, K.C. et al. Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV)/maize starch blend films. **Journal Food Engineering**. v. 89. n. 4. p. 361-369, 2008.

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

REVERCHON, E.; ADAMI, R. Nanomaterials and supercritical fluids. **Journal Supercritical Fluids**, v. 37. n. 1. p. 1-22, 2006.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal Supercritical Fluids** v.8. n. 2. p. 146-166, 2006.

RIEKES, M. K. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering**: v. 31. n. 5. p. 962–968, 2011.

ROBERTO, M. et al. Supercritical Fluid Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds From Natural Sources – Review (Supercritical Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds). **The Open Chemical Engineering Journal**, v.4. p. 51–60, 2010.

RODRIGUES, L. M. et al. Bixin extraction from defatted annatto seeds. **Comptes Rendus Chimie**, v. 17. n. 3. p. 268–283, 2014.

ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. Natural **Product Extraction: Principles and Applications**. RSC Published, p. 450, 2013.

RUFINO, M. S. M., et al. Metodologia Científica: **Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 127, ISSN 1679-6535).2007.

RYAN, D. et al. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. **Scientia Horticulturae**, v. 92. n. 2. p. 147–176, 2002.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal Saudi Chemical Society**, v. 18. n. 2. p. 85-99, 2014.

SAHIN, S.; BILGIN, M. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98. p. 1271-1279, 2018.

SAHIN, S.; BILGIN, M. Study on oleuropein extraction from olive tree (*Olea europaea*) leaves by means of SFE: Comparison of water and ethanol as co-solvent. **Separation Science and Technology**, v. 47. n. 16. p. 2391-2398, 2012.

ŞAHIN, S.; ŞAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20. n. 1. p. 595–602, 2013.

SALDAÑA, M. D.; COIMBRA, J. S. R.;CARDOZO-FILHO, L. Recovery, encapsulation and stabilization of bioactives from food residues using high pressure techniques. **Current Opinion in Food Scienc**, v. 5. p. 76-85, 2015.

SALDAÑA, M. D. A. MAZZAFERA, P. MOHAMED, R. S. Extração dos alcaloides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com supercrítico. **Food Science and Technology**, v. 17. n. 4. p. 371-376, 1997

SANTOS, D. T. et al. Production of stabilized sub-micrometric particles of carotenoids using supercritical fluid extraction of emulsions. **Journal Supercritical Fluids**, v.61. p. 167–174, 2012.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108. n. 3. p. 444–452, 2012.

SANTOS, K. A. et al. Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythropappus*): Supercritical CO₂ oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling. **Journal Supercritical Fluids**, v. 114. p. 1-8. 2016.

SAPKALE, G. N. et al. Supercritical Fluid Extraction – A Review. **Int. Journal Chem. Sci.**, v. 8. n. 2. p. 729-743, 2010.

SCHEITHAUER, E.C. et al. Preparation and characterization of electrosprayed daidzein-loaded PHBV microspheres. **Mater. Lett**, v. 158. p. 66–69, 2015.

SCHMID, GÜNTHER. **Nanotechnology. Principles and Fundamentals**. Edited by Günter Schmid Copyright WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Vol. 1. 2664 p. 2008.

SETYANINGSIH, W. et al. Determination of Melatonin in Rice (*Oryza sativa*) Grains by Pressurized Liquid Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63. n. 4. p. 1107–1115, 2015.b

SETYANINGSIH, W. et al. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. **Food Chemistry**, v.192. p. 452–459, 2015.a.

SHARIF, K. M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124. p. 105–116, 2014.

SILVA, R. P. F. F., et al. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.76. p. 40–51, 2016.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**. v.57. n.5, p. 589-594, 2010.

SINGLETON, V. L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299. p. 152–178, 1999.

SODEIFIAN, G. et al. Extraction of oil from Pistacia khinjuk using supercritical carbon dioxide: Experimental and modeling. **Journal Supercritical Fluids**, v. 110. p. 265–274, 2016.

SOLANA, M. et al. A comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods for obtaining phenolic compounds from *Asparagus officinalis* L. **Journal Supercritical Fluids**, v. 100. p. 201-208, 2015.

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

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

STAMATOPOULOS, K. et al. Improvement of oleuropein extractability by optimising steam blanching process as pre-treatment of olive leaf extraction via response surface methodology. **Food Chemistry**, v.133. n. 2. p. 344–351, 2012.

STAMATOPOULOS, K.; KATSOYANNOS, E.; CHATZILAZAROU, A. Antioxidant Activity and Thermal Stability of Oleuropein and Related Phenolic Compounds of Olive Leaf Extract after Separation and Concentration by Salting-Out-Assisted Cloud Point Extraction. **Antioxidants**, v. 4. n. 3. p. 229-244, 2014.

SU, Y. L. et al. Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. **Powder Technology**, v. 184. p. 114–121, 2008.

SUMERE, B. R. et al. Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48. p. 151-162, 2018.

TAAMALLI, A. et al. Geographical Characterization of Tunisian Olive Tree Leaves (cv. Chemlali) Using HPLC-ESI-TOF and IT/MS Fingerprinting with Hierarchical Cluster Analysis. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018. p. 1-10, 2018.

TABERA, J. et al. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52. n. 15. p. 4774–4779, 2004.

TALHAOU, N. et al. Phenolic compounds and in vitro immunomodulatory properties of three Andalusian olive leaf extracts. **Journal Functional Foods**, v. 22. p. 270–277, 2016.

TANILGAN, K.; ÖZCAN, M. M.; ÜNVER, A. Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L) varieties and their oils. **Grasas y Aceites**. n. 58. p. 142–147, 2007.

TAO, J. et al. Thermal properties and degradability of poly (propylene carbonate) / poly (β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate) (PPC/PHBV) blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94. p. 575-583, 2009.

TEMELLI, F.; SALDAÑA, M. D. A.; COMIN, L. **Application of Supercritical Fluid Extraction in Food Processing**. In Comprehensive Sampling and Sample Preparation, v.4. p. 415–440, 2012. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00142-3>. 2012

THIRE, R. M. S. M. et al. Morphology and thermal properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/attapulgite nanocomposites. **Materials Research**, v.14. n. 3. p. 340-344, 2011.

TRIPODO, G. et al. Optimization of pressurized liquid extraction by response surface methodology of Goji berry (*Lycium barbarum L.*) phenolic bioactive compounds. **Electrophoresis**, v. 0. p. 1-10, 2018.

TSIMIDOU, M. Z., & PAPOTI, V. T. **Bioactive Ingredients in Olive Leaves. In: Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention**, p. 349–356, 2010.

URZÚA, C. et al. Olive leaves extract encapsulated by spray-drying in vacuum fried starch–gluten doughs. **Food Bioproducts and Process**. v. 106. p. 171–180, 2017.

VINCEKOVIC, M. et al. Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. **Trends in Food Science Technology**, v. 69. p. 1-12, 2017.

VISENTIN, A. et al. Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process. **Journal of Food Engineering**. v. 109. p. 9–15, 2012.

VROMAN, I.; TIGHZERT, L. Biodegradable polymers. **Materials**. v. 2. p. 307-344, 2009.

WIJNGAARD, H. H.; BALLAY, M.; BRUNTON, N. The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids. **Food Chemistry**, v. 133. n. 4. p. 1123–1130, 2012.

WILLIAMS, J. R; CLIFFORD, A.A. Supercritical Fluid Methods and Protocols. **Humana Press**, p. 256, 2000.

XIANG, H. et al. Synthesis and characterization of an environmentally friendly PHBV/PEG copolymer network as a phase change material. **Science China Chemistry**, v.56. p. 716–723, 2013.

XIE, P. et al. Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea L.*) with ultrasound assistance. **Food and Bioproducts Processing**, v.23. p. 29-38, 2015.

XYNOS, N. et al. Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 122. p. 323–330, 2014.

XYNOS, N., et al. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **Journal Supercritical Fluids**, v. 67. p. 89–93, 2012.

YADAV, D., KUMAR, N. Nanonization of curcumin by antisolvent precipitation: Process development, characterization, freeze-drying and stability performance. **International Journal of Pharmaceutics** v. 477. p. 564–577, 2014.

YEO, S.-D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **Journal Supercritical Fluids**, v. 34. p. 287–308, 2005.

YIN, D. et al. Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 187. p. 20–28, 2015.

ZERMANE, A. et al. Optimization of essential oil supercritical extraction from Algerian *Myrtus communis* L. leaves using response surface methodology. **Journal Supercritical Fluids**, v. 85. p. 89–94, 2014.

ZHENG, L. et al. Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. **Journal of Food Engineering**, v.l. n.104. p. 89–95, 2011.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W., The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64. p. 555–559, 1999.

ZHONG, Y.; SHAHIDI, F. **Handbook of Antioxidants for Food Preservation**, in: Handbook of Antioxidants for Food Preservation. p. 287-333, 2015.

ZIZOVIC, I. et al. Supercritical carbon dioxide essential oil extraction of Lamiaceae family species: Mathematical modelling on the micro-scale and process optimization. **Chemical Engineering Science**, v. 60. n. 23. p. 6747–6756, 2005.

APÊNDICE I

Figura A.1- Curvas de calibração com padrão catequina para análises de flavonoides (a) e com padrão ácido gálico para análises de fenólicos (b).

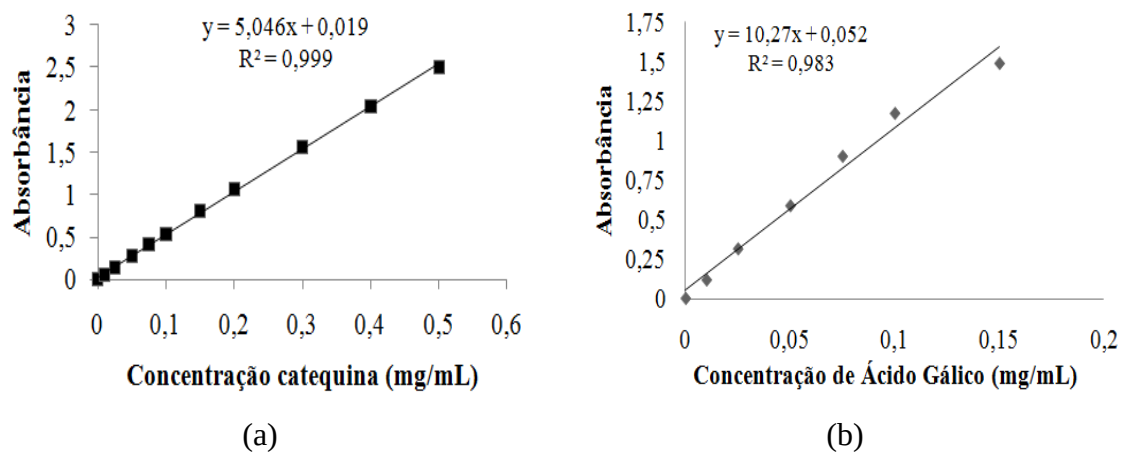


Figura A.2- Curva de calibração com padrão oleuropeína para análises de HPLC.

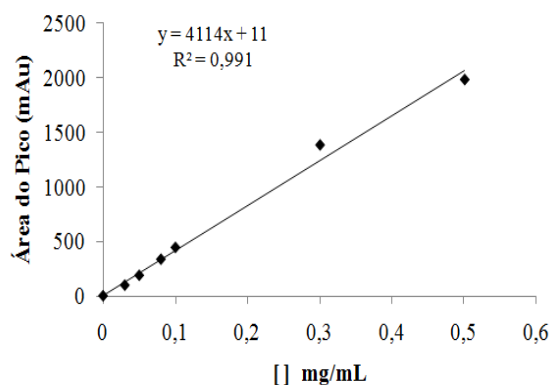
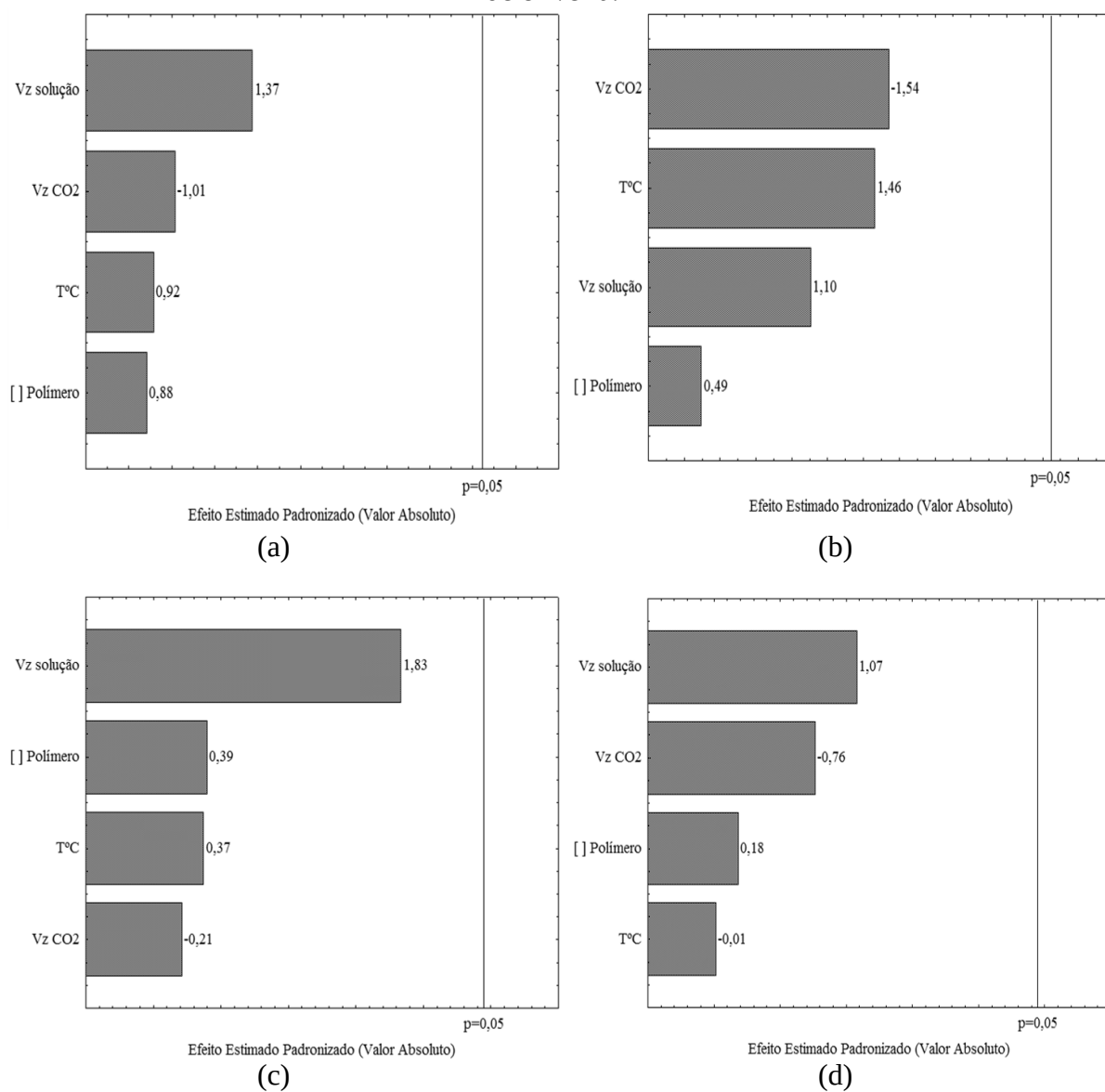


Figura A.3- Diagrama de Pareto com os efeitos estimados sobre à análises de FT (a), Flavonoides (b), Aa (c) e EE (d) das partículas coprecipitadas de PHBV com extratos de folha de oliveira.



PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. ROSA, A. D.; FRANCESCHI, E. ; VALDUGA, E.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L. Bioatividade de extratos de folha de oliveira (*Olea europaea*) extraídos com solvente líquido pressurizado. In: III Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação, 2017, Erechim.
2. ROSA, A. D.; FRANCESCHI, E.; VALDUGA, E.; BACKES, G. T.; CORAZZA, M. L. Modelagem matemática do processo de extração com líquido pressurizado de folha de oliveira (*Olea europeae*). In: III Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação, 2017, Erechim.
3. ROSA, A. D.; FRANCESCHI, E.; VALDUGA, E.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L. Efeitos da temperatura e pressão em extrações de compostos bioativos em folhas de oliveira (*Olea europaea*). In: XXI Seminário de Integração de Pesquisa e Pós-Graduação, 2017, Erechim.
4. ROSA, A. D.; BACKES, G. T.; VALDUGA, E.; FRANCESCHI, E.; MENDONCA, F. M. R. Estabilidade de emulsão com extratos de folha de oliveira (*Olea europaea*) utilizando PHBV como polímero. In: 2th nternational Congress of Management, Technology and Innovation and II congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos, 2016, Erechim. Anais do II CONIGTI, 2016.
5. ROSA, A. D.; BACKES, G. T.; JUNGES, A.; VALDUGA, E.; FRANCESCHI, E. Extração de folhas de oliveira (*Olea europaea*) com solvente líquido pressurizado. In: 2th nternational Congress of Management, Technology and Innovation and III Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos, 2016, Erechim. Anais do II CONIGTI, 2016.
6. ROSA, A. D.; BACKES, G. T.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; FRANCESCHI, E.; FRONZA, N.; MENDES, W. F. C.; SCHNEIDER, A. C. Atividade antioxidante de extratos de folha de oliveira (*Olea europaea*) obtidos por extração com líquido pressurizado. In: I Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação, 2015, Erechim. I CONIGTI, 2015.
7. ROSA, A. D.; MORES, R.; FRONZA, N.; SCHNEIDER, A. C.; MENDES, W. F. C. CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; VALDUGA, E.; FRANCESCHI, E. Atividade antioxidantes de extratos de folha de oliveira (*Olea europaea*) obtidos por extração sub

- e supercrítica. In: IX Simpósio de Alimentos, 2015, Passo Fundo. IX Simpósio de Alimentos, 2015.
8. MENDES, W. F. C. SCHNEIDER, A. C. ROSA, A. D. FRONZA, N. BACKES, G. T. VALDUGA, E. FRANCESCHI, E. Extração com fluído sub e supercrítico de extratos de folha de oliveira. In: V Mostra de Iniciação Científica, 2015, Concórdia. V MIC, 2015
 9. RAUSCHKOLB, J. C.; CROCE, D. M.; ROSA, A. D.; FRONZA, N.; VARGAS JUNIOR, A.; BORTOLINI, F. Estudos do potencial antioxidante e antimicrobiano de extrato natural de folhas de oliveira em vegetais (VPM's). In: VII Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar, 2014, Araquari. VII MICTI, 2014.
 10. RAUSCHKOLB, J. C.; ROSA, A. D.; BORTOLINI, F.; FRONZA, N.; VARGAS JUNIOR, A.; CROCE, D. M.; LOVATO, J. Estudo do potencial antioxidante e antimicrobiano de extrato natural de folhas de. In: IV Mostra de Iniciação Científica, 2014, Concórdia. IV MIC, 2014.