

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

KARLA VIRGINIA LEITE LIMA

**EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS:
Uma Alternativa para Extração de Fitoquímicos**

SÃO LUÍS - MA
2015

KARLA VIRGINIA LEITE LIMA

**EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS:
Uma Alternativa para Extração de Fitoquímicos**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Química como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Química na Universidade Federal do Maranhão - UFMA.

Orientador Prof. Dr.: Roberto Sigfrido Gallegos Olea.

SÃO LUÍS – MA
2015

Lima, Karla Virginia Leite

Extração por micro-ondas: uma alternativa para extração de fitoquímicos / Karla Virginia Leite Lima. — São Luís, 2015.

39 f.

Orientador: Roberto Sigfrido Gallegos Olea

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Maranhão, Curso de Química, 2015.

1. Extração assistida por micro-ondas. 2. Fitoquímicos - Extração. 3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Título.

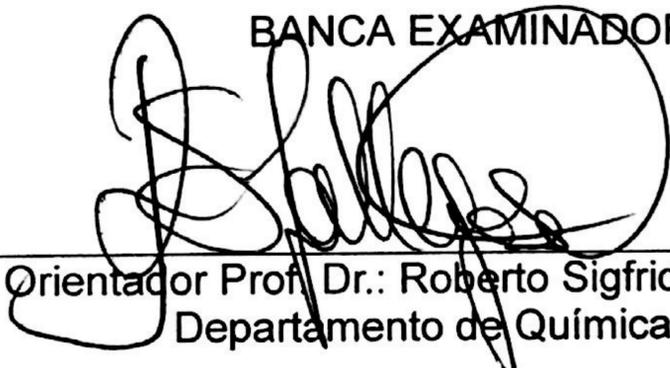
CDU 54.056:54-732

**EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS:
Uma Alternativa para Extração de Fitoquímicos**

KARLA VIRGINIA LEITE LIMA

Aprovada em: 09/07/2015.

BANCA EXAMINADORA:



Orientador Prof. Dr.: Roberto Sigfrido Gallegos Olea.
Departamento de Química - UFMA



1º Examinador Profa. M^a: Francisca Socorro Nascimento Taveira
Departamento de Química - UFMA



2º Examinador Prof. Dr.: Gilvan de Oliveira Costa Dias
Departamento de Química - UFMA

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por ter me dado sabedoria para superar dificuldades.

Aos meus pais, José Carlos Ferreira Lima e Maria Lucia Leite Lima pela dedicação, amor e carinho dedicados por toda a vida.

Ao meu noivo e amigo Igor Luís Coelho Sousa por todo amor, carinho e apoio.

Aos meus irmãos Carlos Eduardo Leite Lima e Gleysa Mylene Leite Lima por todos os bons momentos ao lado deles.

Ao programa Ciências sem Fronteiras pela oportunidade de realizar esse trabalho durante o intercâmbio e adquirir conhecimentos que me foram proporcionados.

Aos professores da Universidade de Orléans pela ajuda nas pesquisas, trabalho e principalmente às professoras de estágio do Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) pelo apoio no laboratório.

À Profa. Francisca Taveira, pela sua amizade, apoio, incentivo durante todo o curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Sigfrido Gallegos Olea, pelo apoio, por seus ensinamentos, conselhos e incentivos durante todo esse tempo.

Aos professores de química da Universidade Federal do Maranhão, pelas horas intermináveis de estudo, trabalho e pelo incentivo.

A todos os alunos e funcionários do LPN que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Marcos Bispo pela amizade e por nunca negar qualquer tipo de ajuda.

A todos os meus amigos, em especial a Dayara e Vânia pela amizade, e apoio.

A todos os meus professores da Universidade de Orléans pela ajuda nas pesquisas, trabalho e pelo apoio durante as aulas.

A todas as pessoas que não estão nesta lista, mas que de alguma forma me ajudaram para a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

“O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se”.

(Voltaire)

RESUMO

O presente trabalho procura apresentar uma metodologia alternativa para a extração de compostos químicos das plantas, comumente chamados de fitoquímicos. As extrações clássicas de fitoquímicos segundo a maioria dos trabalhos mostra, que os métodos utilizados ainda são muito demorados e às vezes de baixo rendimento e qualidade, o que justifica a necessidade de procurar uma técnica que possa minimizar esses problemas. Para tal objetivo optou-se por mostrar neste trabalho a extração assistida por micro-ondas, tendo em vista que é uma técnica ainda não muito utilizada e que atualmente, segundo levantamento, vem se mostrando bastante eficiente. Para apresentar a técnica mostramos os resultados obtidos através de um trabalho realizado, para a extração de polifenóis utilizando o micro-ondas em galhos da Rosa híbrida cultivar, e sua posterior caracterização química monitorada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), acoplada aos detectores DAD e DEDL.

Palavras-chave: Fitoquímicos, Polifenóis, Micro-ondas, HPLC.

ABSTRACT

This work presents a methodology alternative for extracting chemicals from plants, commonly called phytochemicals. The classic extraction of phytochemicals according to most studies show that the methods used are still very time-consuming and sometimes low yield and quality, which justifies the need to search a technique that can minimize these problems. For this purpose it was decided to show this work the extraction assisted by microwave - MAE, considering that is a technique not yet widely used and which now, according to a survey, has proved to be very effective. To show the technical we present the results obtained from a study conducted for the polyphenols extraction using microwave in cultivar hybrid rose, and its subsequent chemical characterization monitored by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to the detectors DAD and DEDL.

Keywords: Phytochemicals, Polyphenols, Microwave, HPLC.

LISTA DE SIGLAS

GAE	Equivalente de Ácido Gálico.
FRAP	Método de Redução do Ferro
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DEDL	Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
MAE	Extração Assistida por Micro-ondas
PLE	Extração de Líquidos Pressurizados
EAU	Extração Assistida por Ultrassom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota biossintética dos metabólitos secundários.....	16
Figura 2: Estrutura básica dos polifenóis.	17
Figura 3: Estrutura básica dos flavonóides.....	18
Figura 4: Estrutura dos flavonóides.....	18
Figura 5: Estrutura química básica dos ácidos fenólicos.....	19
Figura 6: Estrutura química dos ácidos fenólicos.	20
Figura 7: Gradiente de temperatura para o aquecimento por micro-ondas (esquerda) e em óleo (direita) após um minuto de aquecimento.....	21
Figura 8: Preparação dos galhos para a extração.....	22
Figura 9: Evaporador de nitrogênio.	23
Figura 10: Micro-ondas (esquerda) e reatores (centro) utilizado para extração e HPLC utilizado para determinação de polifenóis.	23
Figura 11: Solução padrão analisada na coluna Hydro com: (1) gradiente 0, gradiente de início e (2) método 3, gradiente otimizado.....	30
Figura 12: Solução padrão analisada na coluna Kinetex com: (1) gradiente 0, gradiente de início e (2), gradiente otimizado.....	31
Figura 13: Solução padrão analisada na coluna Luna com: (1) gradiente 0, gradiente de início e (2) método 7, gradiente otimizado.....	32
Figura 14: Comparação da interação dos polifenóis com a acetonitrila (1) e com o metanol (2), na coluna Luna.....	33
Figura 15: Solução padrão analisada na coluna Luna com gradiente otimizado (Tabela 6), utilizando acetonitrila na fase móvel.	34
Figura 16: Comparação de cromatogramas da matriz complexa (preto) e da solução com padrões de polifenóis (verde), coluna Luna utilizando metanol na fase móvel. .	35
Figura 17: Comparação de cromatogramas da matriz complexa (1) e da solução com padrões de polifenóis (2), coluna Luna utilizando acetonitrila na fase móvel.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Polifenóis presentes na solução padrão	25
Tabela 2: Gradiente de início (Variação da concentração de MeOH e água)	26
Tabela 3: Rendimentos de extratos de plantas obtidos sem o uso de Micro-ondas .	27
Tabela 4: Extração-assistida por micro-ondas (MAE) em diferentes matrizes.....	27
Tabela 5: Ordem de eluição dos compostos nos cromatogramas	28
Tabela 6: Gradiente otimizado para a coluna Hydro	30
Tabela 7: Gradiente otimizado para a coluna Kinetex	31
Tabela 8: Gradiente otimizado para a coluna Luna	32
Tabela 9: Gradiente otimizado para análise com acetonitrila.....	34
Tabela 10: Polifenóis presentes no extrato da rosa	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Polifenóis.....	15
3.1.1 Flavonóides	17
3.1.2 Ácidos Fenólicos	19
3.2 Extração Assistida por Micro-ondas	20
4. MÉTODOS EXPERIMENTAIS	22
4.1 Preparação dos galhos	22
4.1.1 Extrações por Micro-ondas.....	23
4.2 Determinações dos Polifenóis por HPLC.....	24
5. RESULTADOS	26
5.1 Extração de polifenóis.....	26
5.2 Identificações dos polifenóis por HPLC.....	28
5.2.1 Coluna Hydro.....	29
5.2.2 Coluna Kinetex	30
5.2.3 Coluna Luna	32
5.3 Caracterização química da fração polifenólica do extrato.....	34
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

As plantas contêm diversos tipos de compostos químicos comumente chamados de fitoquímicos. Os polifenóis são uma classe de fitoquímicos, com pelo menos 8.000 membros conhecidos¹.

Os polifenóis têm recebido muita atenção da comunidade científica por seus inúmeros efeitos biológicos como por exemplo, a captura de espécies radicalares do oxigênio (atividade antioxidante), a modulação da atividade de enzimas específicas, a inibição da proliferação celular e o seu potencial como um antibiótico, antialérgico e anti-inflamatório².

Eles são moléculas orgânicas do reino vegetal, encontrados naturalmente em plantas e frutos, sendo que nas plantas eles estão presentes em todos os órgãos. Entende-se que nas plantas, dentre outras atividades, eles exercem foto proteção, defesa contra micro-organismos e insetos, são responsáveis pela pigmentação e características organolépticas dos alimentos².

Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância³. Os principais grupos de polifenóis são os ácidos fenólicos, tendo como exemplos: o ácido clorogênico, presente no café; os estilbenos, como o resveratrol presente nas uvas e vinho; as ligninas, como as lignanas da linhaça; e os flavonóides. Este último grupo é o maior e mais estudado, possuindo mais de 5.000 compostos identificados, e tem como fontes principais alimentos tais como frutas e hortaliças, cacau, soja, e também alguns chás dentre outros⁴.

Estruturalmente os polifenóis naturais podem abranger desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados, como as ligninas. Eles ocorrem primariamente sob forma conjugada, com uma ou mais unidades de carboidratos ligados a grupos hidroxila, embora ligações diretas da unidade do carboidrato com um átomo de carbono aromático também existam¹.

Até bem pouco tempo atrás, a maior parte do interesse nutricional nos compostos polifenólicos era sobre os efeitos deletérios causados pela capacidade de certos polifenóis em se ligar e precipitar macromoléculas, como as proteínas dietéticas, carboidratos e enzimas digestivas; reduzindo, assim, sua digestibilidade¹.

Recentemente as ações fisiológicas exercidas pelos polifenóis foram relacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, entre outras, principalmente em função da elevada capacidade antioxidante (reagindo com radicais livres e quelando metais)².

Os flavonoides são os polifenóis mais abundantes de nossa dieta e o consumo de polifenol -como os flavonoides- tem sido alvo de interesse de consumidores e indústrias alimentícias por várias razões. Estudos epidemiológicos têm sugerido associações entre o consumo de bebidas ou alimentos ricos em polifenóis e a prevenção de algumas doenças⁵.

Alguns polifenóis como os taninos são relacionados à proteção de redes de pesca e velas de embarcações contra o envelhecimento, pois torna suas fibras mais resistentes ao apodrecimento, que é muito acelerado em regiões costeiras. O tanino retirado da casca dos troncos é utilizado para corar as redes de pesca e as velas dos barcos, assim como na indústria do curtume⁶.

Além da indústria coureira os taninos encontram também aplicações como corante corporal, na indústria farmacêutica, na fabricação de plásticos, fungicidas, bebidas e nas panelas de barro artesanais, às quais dão a coloração preta e são também responsáveis pela sua impermeabilidade⁷.

Dada a importância dessa classe de fitoquímicos, há um constante interesse tanto na extração deles a partir das plantas, como também sua posterior identificação estrutural.

Extrações de polifenóis das plantas podem ser realizadas de diferentes maneiras, a mais utilizada é a extração com solventes, na qual a amostra é deixada em contato com o solvente -de polaridade adequada- por um determinado tempo (geralmente várias horas ou dias), com ou sem agitação.

Diversos trabalhos descrevem procedimentos com diversos solventes, tempos e temperaturas. Porém, são técnicas geralmente demoradas e susceptíveis de causar degradação ou mudanças químicas indesejadas se não monitoradas cuidadosamente. Por isso, a busca por uma técnica de extração que aumente o rendimento, economize solvente, que seja simples e rápida vem aumentando.

Uma das alternativas que tem mostrado as vantagens acima nomeadas é a técnica de extração assistida por micro-ondas. Esta técnica, ao contrário das convencionais de aquecimento por condução ou convecção, diminui o tempo de

trabalho, aumenta o rendimento e a qualidade do extrato obtido. As durações dos processos de extração assistidas por micro-ondas são da ordem de alguns minutos. Os rendimentos, na maioria dos casos, são maiores aos obtidos pelos processos tradicionais de extração. E quando eles são mais baixos, o que normalmente é uma manifestação da seletividade do processo, costumam ter um maior grau de pureza⁸.

Milutinovic e colaboradores avaliaram o teor de polifenóis (expresso em equivalentes de ácido gálico-GAE) e a atividade antioxidante (FRAP e DPPH) em extratos de resíduo de cavalinha (*Equisetum arvense*), empregando a extração assistida por micro-ondas comparada com um método convencional (extração sólido-líquido com agitação). O melhor extrato obtido foi pela extração por micro-ondas, utilizando 40 mL de etanol (solução 54%) em 1 grama do resíduo de cavalinha, por apenas 80 segundos de extração. O resultado foi bastante interessante, já que superou o teor de polifenóis extraído em 12 h pelo método convencional, sendo de 161,57 mg GAE/g no método do micro-ondas e 120,27 mg GAE/g no método tradicional. O maior rendimento no método do micro-ondas também favoreceu o aumento da atividade antioxidante em FRAP e DDPH⁸, tendo em vista que o teor de polifenóis extraído foi mais elevado nesse método.

O sistema de extração por micro-ondas é considerado uma técnica promissora para extração vegetal por causa do uso de diferentes fenômenos químicos e físicos, em comparação com aqueles em extrações convencionais⁹.

Este trabalho consiste em procurar demonstrar uma metodologia de trabalho para a extração de polifenóis assistida por micro-ondas, e a sua posterior caracterização através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a dois detectores, DAD e DELS. A metodologia foi aplicada na rosa híbrida cultivar 'Jardin de Granville ', uma delicada flor rosa claro, desenvolvida em laboratório para ser utilizada na fabricação de perfumes, colhida na região central de França, em fevereiro de 2014, durante o inverno.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Apresentar uma metodologia para extração de polifenóis em plantas, assistida por micro-ondas, e sua posterior caracterização química.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a extração de polifenóis pela técnica assistida por micro-ondas
- Caracterizar os polifenóis por HPLC, comparando a eficiência da resolução nas várias colunas utilizadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Polifenóis

O termo polifenóis é aplicado a um amplo e numeroso grupo de moléculas encontradas em hortaliças, frutas, cereais, chás, café, cacau, vinho, suco de frutas e soja. Nas plantas, eles exercem função de foto proteção, defesa contra micro-organismos e insetos, além de serem responsáveis pela pigmentação e por algumas características organolépticas dos alimentos².

Os polifenóis são compostos fenólicos que possuem dois, ou mais grupos hidroxilas ligadas a um anel benzênico e, embora contenha um grupo característico de álcoois, esta classe de compostos possui propriedades especiais, são compostos mais ácidos que os álcoois sendo oxidados com maior facilidade¹⁰.

Compostos fenólicos são biossintetizados a partir de hidratos de carbono pela via do ácido chiquímico, ou a partir do aminoácido aromático fenilalanina pela rota biossintética dos fenilpropanóides (Figura 1). Junto aos terpenoides e alcaloides,

representam os três principais grupos de metabólitos secundários de plantas, cujas funções não estão diretamente relacionadas à fotossíntese, respiração, crescimento ou desenvolvimento do organismo (metabólitos primários), mas sim ao seu sistema de defesa¹¹.

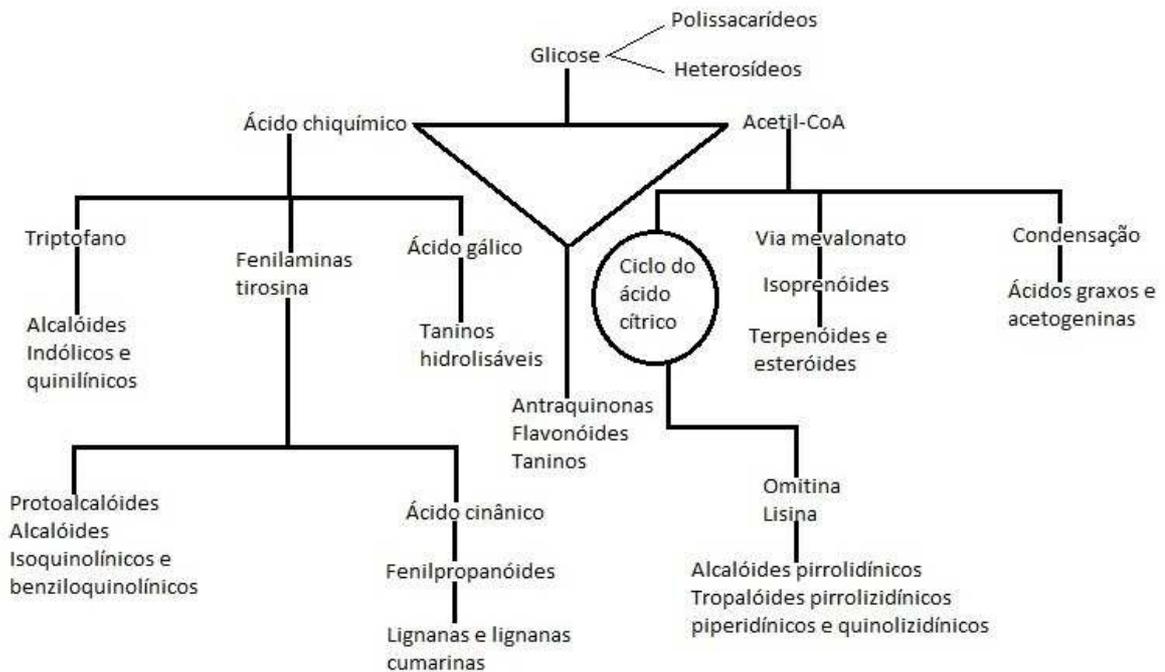


Figura 1: Rota biossintética dos metabólitos secundários.

Como dito anteriormente, esses compostos fenólicos apresentam uma estrutura química comum, derivada do benzeno e ligada a um grupo hidroxila. Com base em sua estrutura e na maneira pela qual os anéis polifenólicos ligam-se uns aos outros, eles são classificados em quatro famílias: flavonoides (flavonas, flavanonas, catequinas e antocianinas), ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (Figura 2).

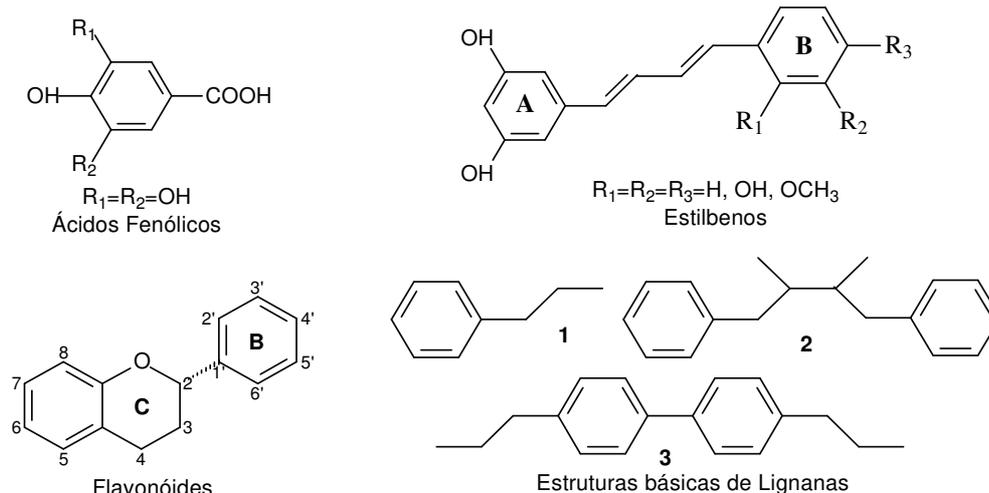


Figura 2: Estrutura básica dos polifenóis.

Os dois grupos principais de polifenóis são os ácidos fenólicos e os flavonóides. Os ácidos fenólicos podem ser classificados em ácidos benzoicos, e derivados, e ácidos cinâmicos, e derivados. Já os flavonóides possuem como subclasses principais os flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e flavanóis¹².

3.1.1 Flavonóides

Os flavonóides, os quais constituem o grupo mais importante dos polifenóis, com mais de 5000 compostos descritos, são compostos bioativos encontrados amplamente nos alimentos e caracterizados por sua estrutura de difenilpropano (C6-C3-C6) composta, portanto de quinze carbonos¹³(Figura 3).

A subclasse flavonóis, na qual se incluem a quercetina, miricetina e o kaempferol, representa os flavonoides mais comumente encontrados nos alimentos, sendo as principais fontes o vinho tinto, chás, brócolis e cebolas. Flavonas são bastante comuns em frutas e vegetais, principalmente em frutas cítricas e cereais como milho e trigo. Naringenina e hesperetina são exemplos de flavononas encontradas em laranjas. Em flavanóis são citados: a catequina e epicatequina, adquiridas pelo consumo de chá verde, vinhos tintos e chocolates. E por fim, as isoflavonas cujas principais moléculas a genisteína, daidzeína e gliceteína, fazem-se presente em leguminosas como a soja e seus derivados¹⁴.

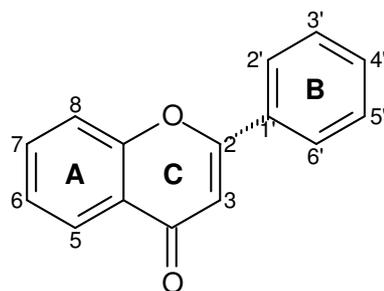


Figura 3: Estrutura básica dos flavonóides.

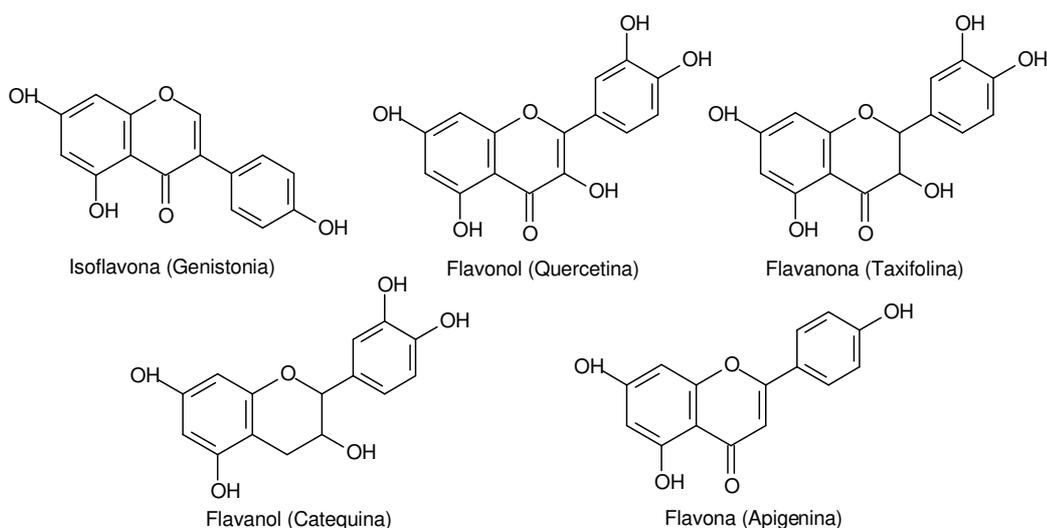


Figura 4: Estrutura dos flavonóides.

Alguns dos possíveis efeitos benéficos dos flavonóides, como aqueles encontrados no cacau, incluem: propriedades antioxidantes, aprimoramento da função endotelial, redução da pressão arterial, decréscimo do funcionamento e ativação da agregação plaquetária e modulação do sistema imune e das vias inflamatórias¹⁵.

A ação biológica benéfica dos flavonóides é devida à capacidade sequestradora de radicais livres, redução da formação destes radicais e estabilização de membranas pelo decréscimo de sua fluidez. Os dois primeiros protegem contra danos por oxidação de moléculas como DNA, lipídios (como a LDL) e proteínas; o último efeito reduz a mobilidade de radicais livres na bicamada lipídica e, conseqüentemente, inibe a peroxidação das membranas das células endoteliais¹⁶.

3.1.2 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos: o primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos mais simples desse grupo de fitoquímicos. O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal: ácidos: cinâmico, o-cumárico, p-cumárico, m-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (Figura 5). Como terceiro grupo têm-se as cumarinas que são uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico¹⁷ (Figura 5).

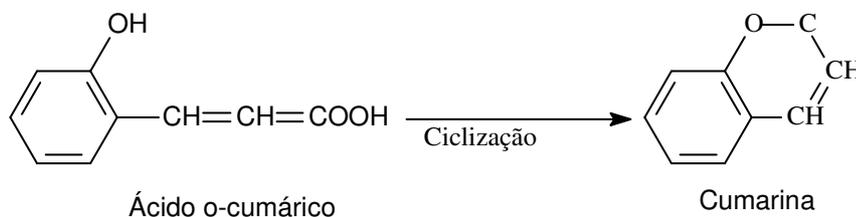
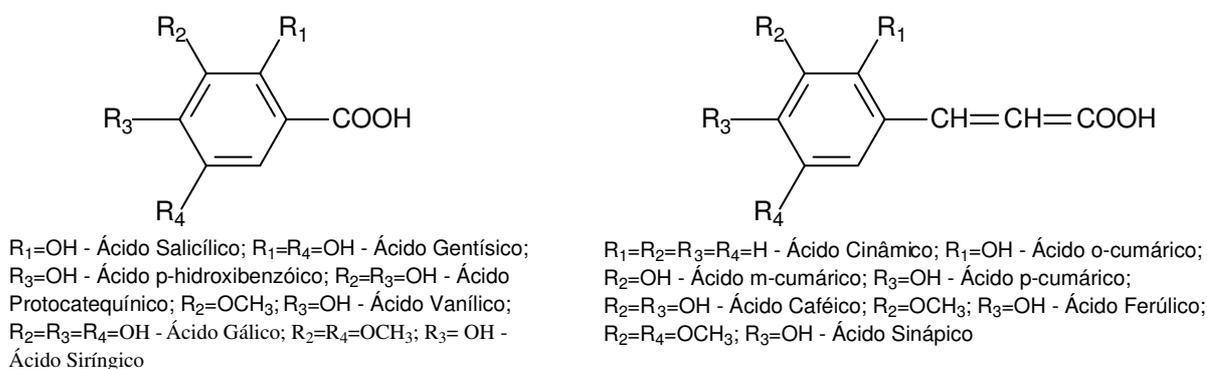


Figura 5: Estrutura química básica dos ácidos fenólicos.

Os ácidos vanilínico, gálico e elágico (Figura 6) derivados do ácido benzóico são importantes na nutrição de ruminantes. O ácido vanilínico é obtido após a hidrólise ácida de folhas de gimnospermas e angiospermas, possuindo estreita ligação com a composição da lignina. O ácido gálico é encontrado na natureza na forma de seu dímero de condensação, como ácido elágico, ambos são precursores de taninos hidrolisáveis, polifenóis que ocorrem em forrageiras¹⁷.

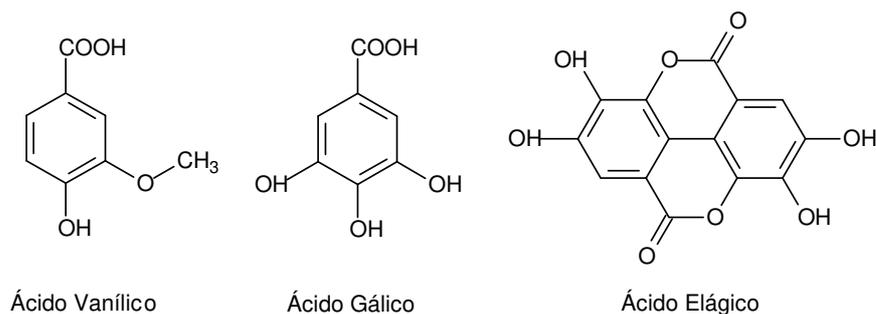


Figura 6: Estrutura química dos ácidos fenólicos.

Pela sua propriedade antimicrobiana, os ácidos fenólicos são muito utilizados pela indústria alimentícia para conservação de alimentos e pela farmacêutica na produção de cosméticos e medicamentos, principalmente de antifúngicos. Há outros processos em que esses ácidos são aplicados como a síntese de corantes, produção de resinas alquílicas, produtos plastificantes e componente de cremes dentais¹⁸.

3.2 Extração Assistida por Micro-ondas

Os fundamentos do processo de extração por micro-ondas (MAE - Microwave Assisted Extraction) são diferentes dos daqueles de métodos convencionais (sólido-líquido ou extração simples), porque a extração ocorre como o resultado de alterações na estrutura da célula causada por ondas eletromagnéticas.

Em MAE, o processo de aceleração e o elevado rendimento da extração pode ser o resultado de uma combinação sinérgica de dois fenômenos de transporte: calor e gradientes de massa trabalhando na mesma direção⁹. Por outro lado, nas extrações convencionais ocorre a transferência de massa do interior para o exterior, apesar da transferência de calor ocorrer do exterior para o interior do substrato. Além disso, na extração convencional, o calor é transferido do fluido de aquecimento para o interior da amostra, já na MAE o calor é dissipado volumetricamente no interior do meio irradiado¹⁹.

De forma mais simples no aquecimento convencional, o recipiente e todo o material contido no mesmo sofre aquecimento, resultando em um gradiente de temperatura do meio mais aquecido para o menos aquecido. No aquecimento por

micro-ondas tudo ocorre de forma contrária ao convencional (Figura 7), decorrente do mecanismo de aquecimento envolvido no sistema.

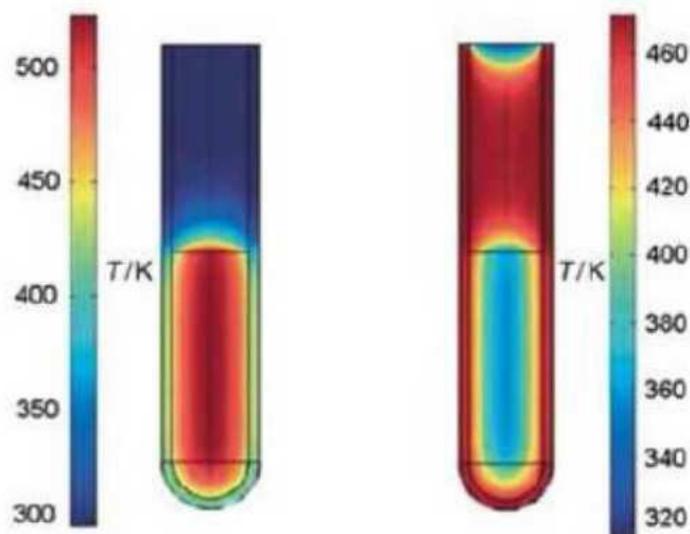


Figura 7: Gradiente de temperatura para o aquecimento por micro-ondas (esquerda) e em óleo (direita) após um minuto de aquecimento.
Fonte: Rev. Virtual Quim., 2014, 6 (6), 1713-1725.

As técnicas tradicionais de extração de solvente de materiais vegetais são baseadas na escolha correta de solventes (baseados na polaridade dos metabólitos a serem extraídos), o uso de calor e / ou a agitação para aumentar a solubilidade dos compostos desejados e melhorar a transferência de massa. Com a descoberta de diferentes metabólitos secundários, o desenvolvimento de rápidos métodos de extração, com alta performance é uma necessidade absoluta²⁰. As novas técnicas de extração, com tempo de extração reduzido, consumo de solvente reduzido e aumento da poluição ganharam atenção.

Nos muitos trabalhos publicados comparando MAE com outros métodos de extração, avançados e convencionais, a MAE foi aceita como uma potencial e poderosa alternativa para a extração de compostos orgânicos a partir de materiais de plantas²¹.

Houve numerosas avaliações e pesquisas sobre os avanços de diferentes técnicas de extração, comparando os seus resultados. Na extração de compostos bioativos a partir de plantas, a MAE foi relatada como a mais eficiente em comparação com as técnicas convencionais e métodos avançados de extração, incluindo a extração assistida por ultrassom (EAU) e extrações de líquidos pressurizados (PLE)²².

A eficiência do aquecimento por micro-ondas é a principal vantagem da técnica de extração assistida por micro-ondas (MAE). O emprego de recipientes fechados permite o uso de temperaturas mais elevadas, acelerando o processo extrativo do composto. O volume de solvente usualmente empregado na extração assistida por micro-ondas (MAE) é menor do que o volume empregado nas técnicas convencionais de extração, o que facilita a reprodutibilidade do processo.

4. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Através do uso de micro-ondas foi extraída a fração polifenólica, e a seguir foi realizada a caracterização química dos polifenóis, comparando a eficiência de separação de diferentes colunas cromatográficas. As separações dos polifenóis foram monitoradas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e, a mais eficiente, foi aplicada para a caracterização dos polifenóis presentes na fração extraída da rosa híbrida cultivar 'Jardin Granville'.

4.1 Preparação da amostra

Foram separados os galhos da Rosa híbrida cultivar 'Jardin Granville', colhida na região central de França, em fevereiro de 2014. Para a redução de tamanho, os galhos foram quebrados manualmente e a seguir moídos usando um moedor de café (Figura 8). Em seguida, foi separada a fração polifenólica utilizando o método de extração por micro-ondas.



Figura 8: Preparação dos galhos para a extração.

4.1.1 Extrações por Micro-ondas

Dois reatores (Figura 10) foram utilizados e em cada um deles foram inseridos 1,50 g de galhos moídos e 40 mL de solução etanol / água (90/10 v / v), solução que promove a interação polar com polifenóis. A extração por micro-ondas foi efetuada em três ciclos de 30s/1000watts, resfriando o reator no intervalo de cada ciclo durante 20 minutos num banho de gelo. Durante a extração a pressão permaneceu constante e a temperatura subiu ao longo do tempo o que é normal devido ao processo.

O extrato obtido foi então centrifugado durante 10 minutos, o sobrenadante foi concentrado através de um rota- evaporador por mais 10 min e por último foi utilizado o evaporador de nitrogênio (Figura 9), para eliminar o solvente que ainda estivesse presente na amostra, através da injeção de nitrogênio, por cerca de 24 horas.



Figura 9: Evaporador de nitrogênio.

Depois de concentrado o extrato, contendo 0,386 g, foi dissolvido em 19,3 mL de metanol, formando uma solução de 20.000 ppm. Esta foi diluída para formar uma solução de extrato de 10.000 ppm, a qual foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 10) para identificar a presença de polifenóis.



Figura 10: Micro-ondas (esquerda) e reatores (centro) utilizado para extração e HPLC utilizado para determinação de polifenóis.

4.2 Determinações dos Polifenóis por HPLC.

Uma solução-padrão contendo 200 µL de metanol e 100 µL de oito polifenóis (Tabela 1) foi usada para otimizar seis tipos diferentes de colunas utilizando diferentes gradientes. A fase estacionária utilizada variou de uma coluna para outra com tamanho de partícula que variam de 2 a 5 µm, mantida a 30 °C durante o experimento. A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de ácido fórmico em água 0,1 % e (B) ácido fórmico em metanol 0.1%; com vazão de 0,5 a 1,0 mL/min. Em todas as colunas foi utilizado o mesmo gradiente de partida (Tabela 2).

Para a identificação das substâncias polifenólicas presentes nas amostras foi utilizado o detector de arranjo de fotodiodos (DAD), no qual a luz que passa pela cela da amostra é dispersa por uma grade holográfica e os comprimentos de onda (λ) resultantes são focalizados sobre uma fila de fotodiodos, gerando espectros de absorção a vários λ simultaneamente²³. Desta forma, possibilitou-se a comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção (250 a 600 nm) com os de padrões autênticos de polifenóis.

A otimização das colunas procurou melhorar a separação dos compostos baseados no cromatograma do gradiente zero. Foram utilizados seis gradientes diferentes, em média, para cada coluna e aquelas em que permaneceram picos sobrepostos e cromatogramas com má resolução, foi aconselhado pela bibliografia alterar a coluna.

Após a identificação da coluna e do gradiente em que os polifenóis da solução padrão tiveram picos de melhor separação, foi injetado a amostra do extrato dos galhos, identificando, assim, os polifenóis presentes no extrato.

Usando a mesma coluna já otimizada, o metanol, solvente orgânico da fase móvel foi então substituído por acetonitrila contendo também ácido fórmico a 0,1%, para que fosse feita uma comparação da separação dos polifenóis de acordo com o solvente utilizado e assim ser possível determinar o melhor solvente orgânico para determinação de polifenóis.

Tabela 1: Polifenóis presentes na solução padrão

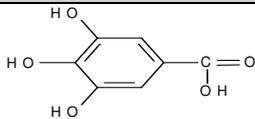
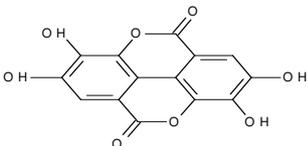
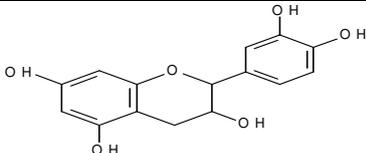
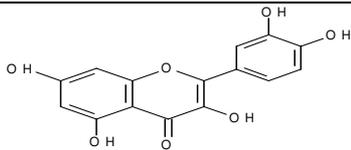
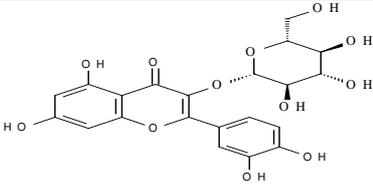
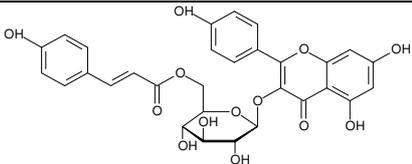
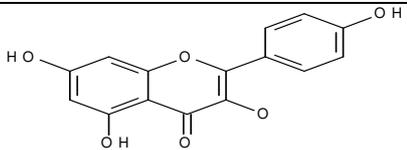
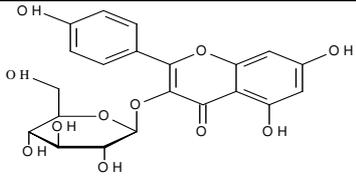
Compostos	Comprimento de onda	Estrutura
Ácidos fenólicos		
Ácido gálico	271nm	
Ácido elágico	366nm	
Flavonóides		
Catequina	278nm	
Quercetina	255 – 370nm	
Quercetina-3-β-D-glicosilada	256 – 354nm	
Tilirosida	266 – 366nm	
Kaempferol	264 – 366nm	
Kaempferol-3-β-D-glicosilado	264 – 347nm	

Tabela 2: Gradiente de início (Variação da concentração de MeOH e água)

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)
0	95	5
5	95	5
15	65	35
25	65	35
35	50	50
45	30	70
50	5	95
60	5	95
61	95	5
70	95	5

5. RESULTADOS

5.1 Extração de polifenóis

A extração de polifenóis foi realizada através de um processo de extração líquido/sólido, assistida pelo dispositivo de forno micro-ondas (Figura 10, p. 23). A massa utilizada dos galhos foi de 3,00 gramas. Após extração por micro-ondas, concentração por rota-evaporador e a evaporação por nitrogênio, a massa total do extrato obtido foi de 0,386 g. Assim, é possível determinar o rendimento em cálculos que se seguem:

$$\begin{array}{l} 3,00 \text{ g de galhos} \text{ -----} 100\% \\ 0,386 \text{ g de extrato} \text{ -----} 12,866\% \end{array}$$

O rendimento do extrato foi de aproximadamente 13%, considerado um bom desempenho, se levar em consideração os rendimentos obtidos em extrações tradicionais sem o uso de Micro-ondas, que utilizam uma quantidade maior de solvente e massa para obter o extrato.

A título de comparação, mostram-se alguns dados de rendimentos de extrações feitas pelo método tradicional obtidos da literatura e sobre a eficiência da extração assistido por Micro-ondas, em comparação aos métodos convencionais, aplicados a

plantas (Tabela 3 e 4). A maioria dos trabalhos retrata a extração assistida por micro-ondas como a melhor quanto ao rendimento, eficiência na extração com amostras mais limpas e menor tempo de extração.

Tabela 3: Rendimentos de extratos de plantas obtidos sem o uso de Micro-ondas

Plantas	Experimental	Rendimento	Ref.
Casca do Araribá (<i>Centrolobium tomentosum</i>)	Método tradicional - Solvente etanol/água (7/3), 541 g de casca	10,1%	24
Lenho do Araribá (<i>Centrolobium tomentosum</i>)	Método tradicional - Solvente etanol/água (7/3), 771 g de lenho	7,4%	24
Galhos do <i>Simaba guianensis subesp. Ecaudata</i>	Extração a frio com MeOH e 991,1 g de galhos por 7 dias	6,3%.	25
Madeira de <i>Maclura tinctoria</i> (L.) D. Don ex Steud	Extrator de Soxhlet Etanol 95%	3,87 ± 0,65	26
Casca de <i>Maclura tinctoria</i> (L.) D. Don ex Steud	Extrator de Soxhlet Etanol 95%	1,43 ± 0,71	26

Tabela 4: Extração-assistida por micro-ondas (MAE) em diferentes matrizes

Matriz	Analito	Experimental	Rendimento	Ref.
Plantas variadas	Pesticidas Organoclorados	Soxhlet: 80 mL MAE: 15 mL	Menor consumo de solvente e tempo de extração comparado ao Soxhlet.	27
Grão de café verde	Compostos fenólicos	Soxhlet e MAE: Parâmetros iguais de tempo, temperatura, amostra e solvente (1:4, p/v).	Rendimento em cafeína e ácido clorogênicos maior para extração por micro-ondas.	28
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	Betalainas	Agitação orbital x MAE. Amostra e solvente (0,1g: 25mL, p/v).	Rendimento em betaninas e betaxantinas maior para extração por micro-ondas.	29
<i>Curcuma longa</i>	Curcumina	MAE, Soxhlet, CO ₂ supercrítico e ultrassom. Imersão em água ou etanol e extração com etanol ou acetona	Maior rendimento por micro-ondas (90%), após imersão em água e posterior extração com acetona	30

O sistema de extração por micro-ondas pode ser considerado como uma alternativa para extrações de fitoquímicos, porém muito mais do que isso, esse

sistema pode ser uma alternativa para minimizar a geração de resíduos, devido ao emprego de amostra e solvente em menor quantidade, diferentemente ao que ocorre nos métodos convencionais de aquecimento.

5.2 Identificações dos polifenóis por HPLC.

Os picos específicos de cada polifenol foram identificados pelo DAD-Detector Diode Array, comparando o comprimento de onda característico de cada composto, (Tabela 2), com comprimento de onda dada pelo detector. Assim, a ordem de eluição de polifenóis que pode ser vista na Tabela 5 foi estabelecida. No entanto, esta ordem de eluição pode variar em certas colunas.

Tabela 5: Ordem de eluição dos compostos nos cromatogramas

Ordem de Eluição	Composto
A	Ácido Gálico
B	Catequina
C	Quercetina-3- β -D-glicosilada
D	Ácido Elágico
E	Kaempferol-3- β -D glicosilado
F	Quercetina
G	Tilirosida
H	Kaempferol

Foram feitas análises da solução padrão em várias colunas, porem alguns fatores definiram qual a coluna mais adequada para ser utilizada na análise do extrato da rosa, entre esses fatores o principal foi a resolução do cromatograma dado por cada coluna. Um cromatograma é considerado aceitável principalmente se os picos dos solutos não apresentam sobreposição, nem desdobramentos, se os picos estão bem separados na linha de base, e se o fator de separação entre os compostos é maior que 1.

Usando um gradiente inicial, igual em todas as colunas, verificou-se que para cada coluna, os polifenóis têm diferentes separações, ocorrendo em alguns casos até coeluição (sobreposição de picos) e desdobramento de picos.

Considerando que as fases estacionárias das colunas têm a mesma característica, são colunas de fase reversa, os fatores que afetam o comportamento

de polifenóis nas separações são os fatores geométricos, o comprimento (L), o diâmetro interno da coluna (dc) e o diâmetro de partícula (dp). Estes fatores têm uma forte influência sobre o tempo de retenção de composto. Quando o valor do comprimento é elevado e o valor do diâmetro interno da coluna e o diâmetro de partícula é pequeno, os compostos são retidos mais tempo na coluna, o que aumenta o tempo de análise.

A fase móvel, mesmo sendo igual para todas as colunas, também tem uma influência na separação, por causa de fatores operacionais tais como a velocidade linear (U) e a perda de carga, ou da pressão aplicada (ΔP) entre a entrada e a saída da coluna. Estes fatores foram ajustados de acordo com os fatores geométricos de cada coluna, para evitar uma grande influência.

Os cromatogramas e o método com o melhor gradiente para cada coluna pode ser visto com mais detalhes abaixo.

5.2.1 Coluna Hydro

A primeira coluna a ser testada foi a Hydro, pelo cromatograma (Figura 11) é possível ver que a maioria dos polifenóis têm uma boa separação, especialmente depois da otimização. No entanto, o composto D exibiu uma resolução não aceitável, devido à formação de uma cauda, este composto também ficou muito próximo ao composto "E", na primeira análise, com um fator de separação ou seletividade (α) de 1,04. Fator de seletividade é a razão entre o tempo de retenção do soluto mais retido (E) com o do soluto menos retido (D), o valor de α deve ser sempre superior a 1 para que o cromatograma possa ser considerado com uma boa resolução.

Foram feitas seis análises na coluna Hydro, com gradientes diferentes afim de melhorar a resolução e a separação dos solutos, porém a deformação do pico D, mesmo depois de otimização não pode ser corrigida, e o fator de seletividade entre os solutos D e E, ainda permaneceu perto de 1, fazendo com que a coluna não fosse escolhida a mais adequada para a análise do extrato.

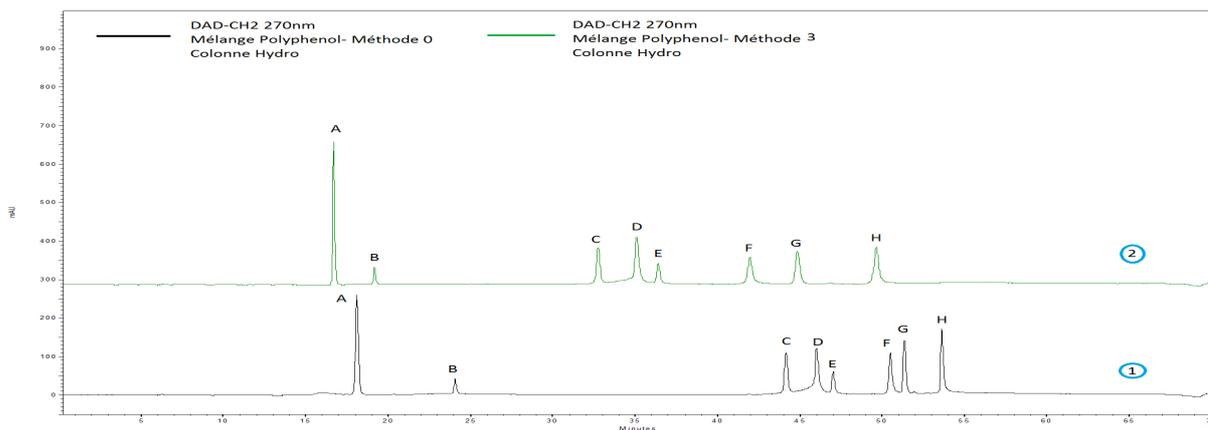


Figura 11: Solução padrão analisada na coluna Hydro com: (1) gradiente 0, gradiente de início e (2) método otimizado, gradiente 3.

Durante a otimização, o gradiente selecionado, que mostrou uma melhor separação foi o gradiente 3, (Tabela 6)

Tabela 6: Gradiente otimizado para a coluna Hydro

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)
0	95	5
5	95	5
10	60	40
20	55	45
30	43	67
35	43	67
38	40	60
40	40	60
45	30	70
50	5	95
60	5	95
61	95	5
70	95	5

5.2.2 Coluna Kinetex

A segunda coluna a ser testada foi a Kinetex e pode ser visto pelo seu cromatograma (Figura 12) que ela teve uma péssima resolução. Na primeira análise, utilizando o gradiente de início, ocorreu uma má separação dos solutos F e G, e uma coeluição (sobreposição de picos) dos solutos C e D. A otimização forneceu uma

melhor separação dos solutos F e G, mas para C e D a separação dos compostos não foi completa na linha de base, mantendo um fator de separação igual a 1.

Assim como na coluna Hydro, foram feitas seis análises na coluna Kinetex, com gradientes diferentes afim de melhorar a resolução e a separação dos solutos, porém os picos continuaram com uma má resolução. Levando isso em conta a coluna Kinetex não foi a escolhida para análise do extrato.

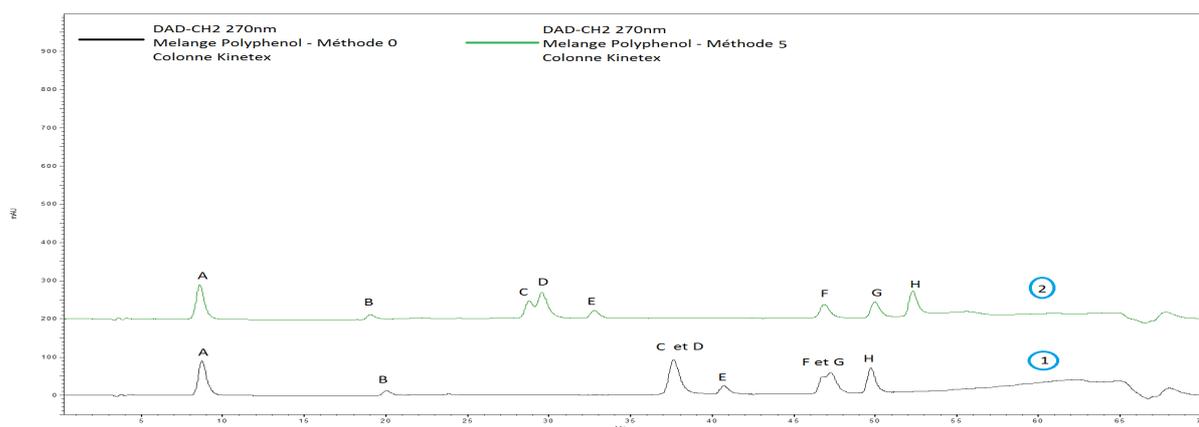


Figura 12: Solução padrão analisada na coluna Kinetex com: (1) gradiente 0, gradiente de início e (2), método otimizado, gradiente 8.

O gradiente que favoreceu a melhor separação dos polifénois foi o gradiente 5 (Tabela 7).

Tabela 7: Gradiente otimizado para a coluna Kinetex

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)
0	95	5
5	95	5
15	60	40
20	55	45
25	55	45
35	52	48
40	50	50
45	40	60
50	5	95
60	5	95
61	95	5
70	95	5

5.2.3 Coluna Luna

Comparando os cromatogramas fornecidos pelas colunas anteriores, foi a coluna Luna que mostrou uma melhor separação dos polifênóis presentes na solução padrão. Mesmo usando o gradiente inicial, como pode ser visualizado no cromatograma da (Figura 13), não ocorreu nenhuma coeluição ou desdobramento de picos. Existe apenas uma curta distância entre a picos C e D, com um fator de separação de 1,03, mas os picos estão bem separados em relação à linha de base. Assim, a coluna Luna foi considerada a mais adequada para a análise do extrato.

Neste caso, a otimização foi feita apenas para melhorar a separação, o que foi possível com a utilização do gradiente 7, (Tabela 8).

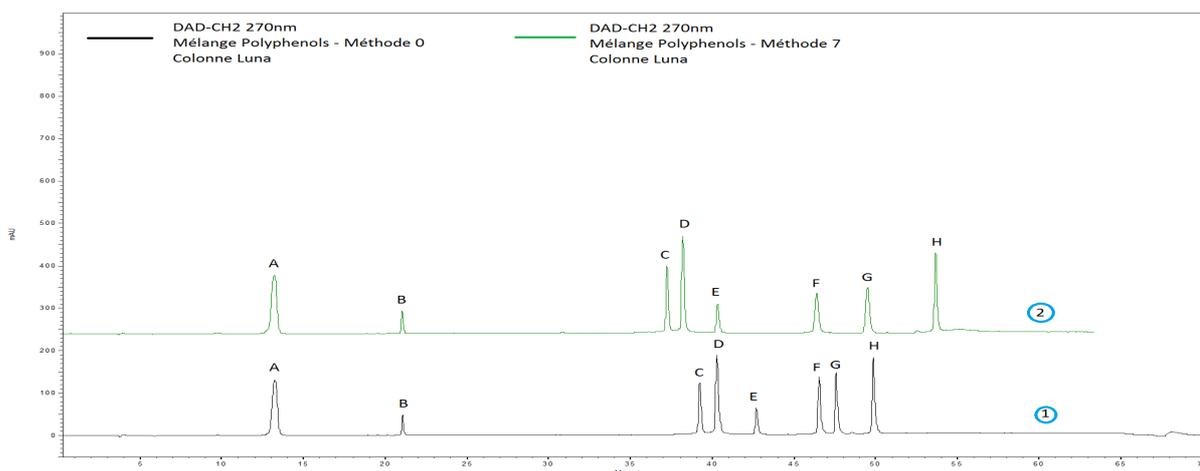


Figura 13: Solução padrão analisada na coluna Luna com: (1) gradiente 0, gradiente de início e (2) método otimizado, gradiente 7.

Tabela 8: Gradiente otimizado para a coluna Luna

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)
0	95	5
5	95	5
15	65	35
25	65	35
30	50	50
45	45	65
48	35	75
50	5	95
60	5	95
61	95	5
70	95	5

Para verificar se haveria uma melhor separação de polifenóis, a fase móvel foi mudada de metanol para acetonitrila. A fase móvel tem uma grande influência sobre o comportamento dos picos devido à interação dos compostos com solventes. Isto pode ser observado pelo o comportamento dos polifenóis com o metanol e a acetonitrila, utilizando o mesmo gradiente (Figura 14).

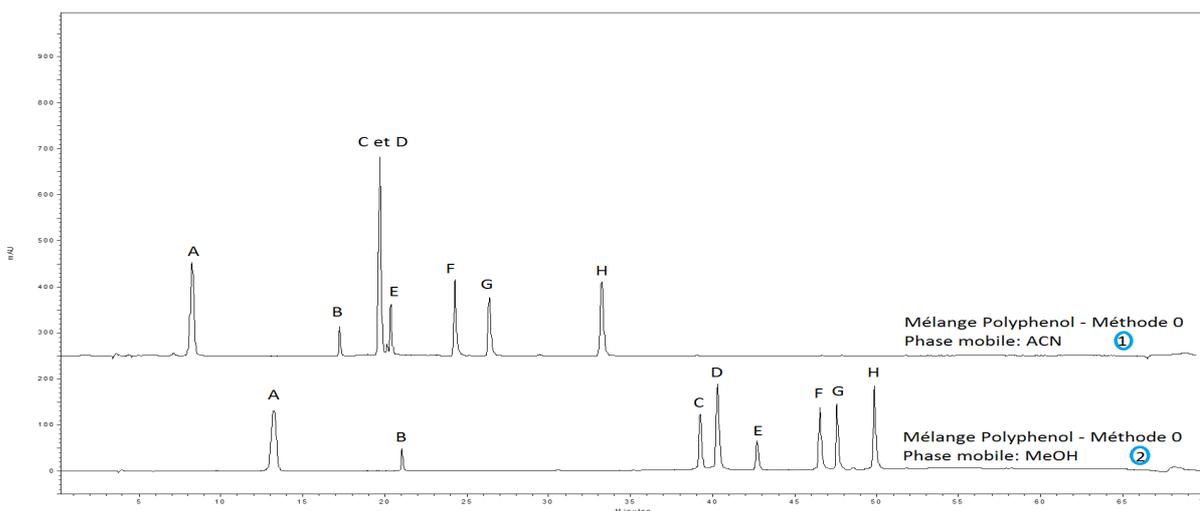


Figura 14: Comparação da interação dos polifenóis com a acetonitrila (1) e com o metanol (2), na coluna Luna.

No cromatograma acima, pode-se ver que os compostos polifenólicos têm maior interação com a acetonitrila do que com metanol, pois necessitam apenas de uma pequena porcentagem de acetonitrila para saírem da coluna. Isto é devido à natureza mais polar de acetonitrila em relação ao metanol. Este aumento da polaridade promoveu a coeluição dos picos C e D, fenômeno característico de ambos os compostos em outras colunas.

A coeluição foi removida durante a otimização da coluna utilizando outro gradiente (Tabela 9). No entanto, como mostrado no cromatograma a seguir (Figura 15), sobre a separação da linha de base a otimização não é completamente eficaz.

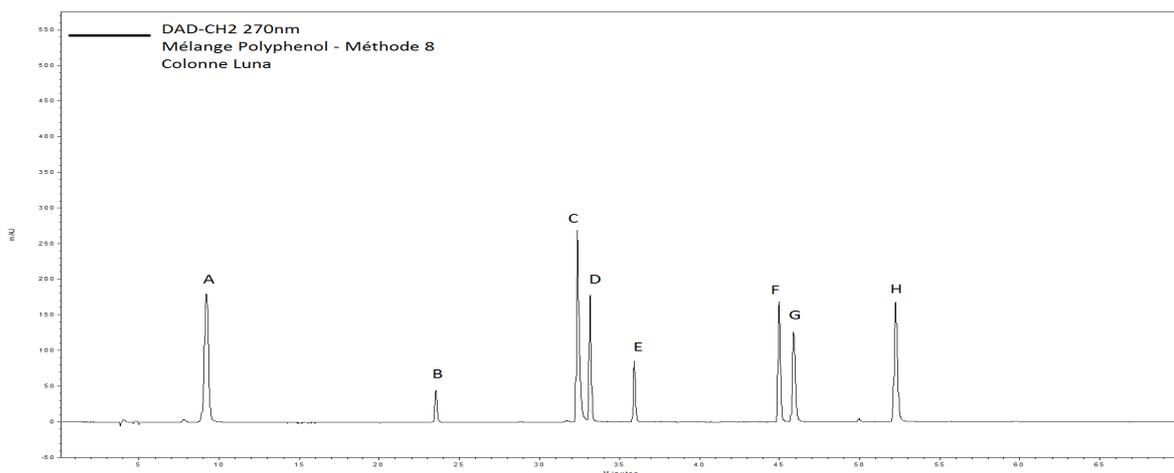


Figura 15: Solução padrão analisada na coluna Luna com gradiente otimizado (Tabela 6), utilizando acetonitrila na fase móvel.

Tabela 9: Gradiente otimizado para análise com acetonitrila

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
5	95	5
15	85	15
60	50	50
65	50	50
75	95	5
80	95	5

5.3 Caracterização química da fração polifenólica do extrato.

Ao analisar a fração polifenólica dos galhos, utilizamos a coluna Luna com o gradiente otimizado. Através do detector DAD foi possível identificar que o extrato tem apenas cinco variedades de polifénóis dos 8 analisados na solução padrão e ordem de eluição desses compostos (Tabela 10).

Tabela 10: Polifenóis presentes no extrato da rosa

Ordem de Eluição	Composto
A	Ácido Gálico
B	Catequina
C	Quercetinal-3- β -D-glicosilado
D	Ácido Elágico
E	Kaempferol-3- glicosilado

O primeiro cromatograma (Figura 16) mostra o comportamento dos polifenóis presentes na fração polifenólica do extrato, utilizando metanol como fase móvel, e o segundo cromatograma (Figura 17) utilizando acetonitrila como a fase móvel.

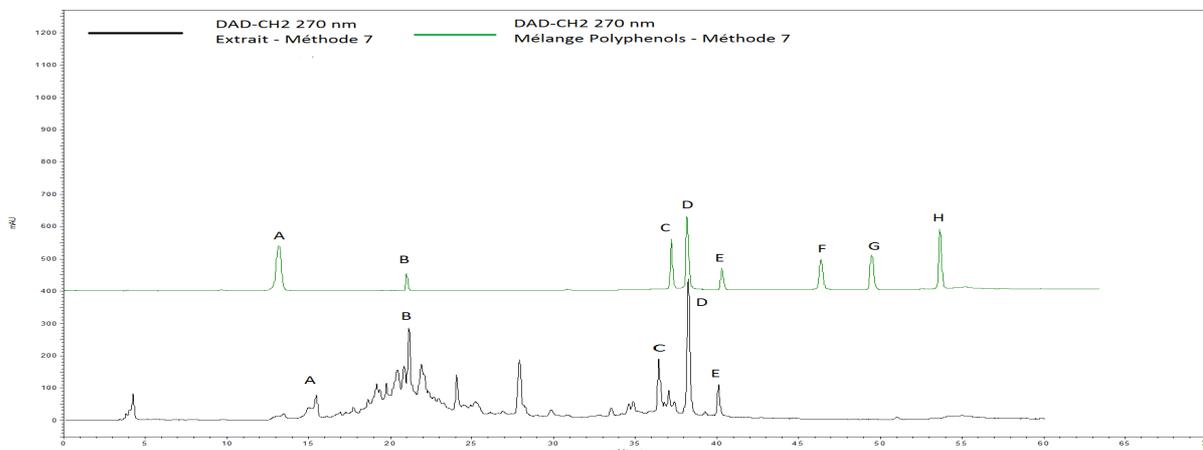


Figura 16: Comparação de cromatogramas da matriz complexa (preto) e da solução com padrões de polifenóis (verde), coluna Luna utilizando metanol na fase móvel.

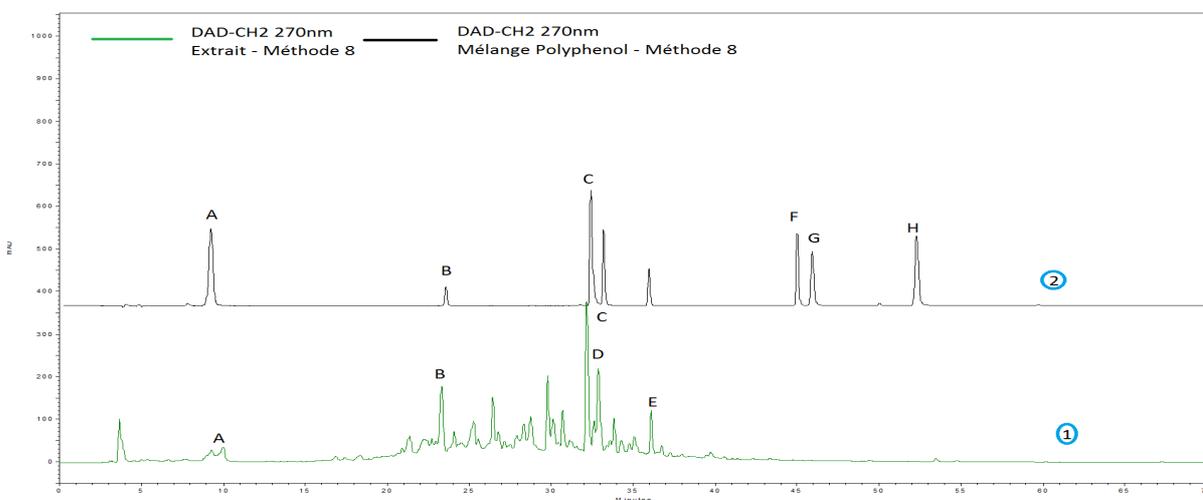


Figura 17: Comparação de cromatogramas da matriz complexa (1) e da solução com padrões de polifenóis (2), coluna Luna utilizando acetonitrila na fase móvel.

Os picos correspondentes a cada composto no cromatograma do extrato mostram que eles são eluídos quase no mesmo tempo de retenção que os da solução padrão usada.

Conforme previsto por estudos com a solução padrão, a fase móvel que oferece melhor separação dos polifenóis na matriz complexa, utilizando a coluna Luna, é o metanol com o gradiente 7 (Tabela 8).

6. CONCLUSÃO

Após a apresentação dos resultados obtidos pode-se observar que a extração assistida por micro-ondas (MAE) é uma técnica que possui características bastante significativas, como a de obter um extrato com rendimento maior do que os encontrados com outras técnicas de extração, utilizando uma quantidade menor de solventes, o que implica em uma quantidade menor de resíduos.

Os resultados mostraram também que esse maior rendimento obtido é atingido em um tempo significativamente menor do que com as outras técnicas comparadas, traduzindo-se, portanto, em uma maior eficiência.

A qualidade da fração obtida, em termos da seletividade da classe de compostos extraídos, neste caso mostrada com a fração polifenólica, permite realizar a caracterização dos componentes da matriz obtida através do emprego de HPLC-DAD-DELS. Esta operação se torna muito importante no processo da análise fitoquímica, já que classicamente os compostos são primeiramente isolados e purificados, para depois, através de técnicas espectroscópicas serem determinadas suas estruturas. A metodologia aqui apresentada, trata-se de uma metodologia qualitativa, apenas identificação dos componentes da fração é realizada na matriz, deixando para uma etapa posterior o isolamento de algum constituinte. Se o objetivo do trabalho for quantificar compostos seria mais interessante a utilização de outro método.

7. REFERÊNCIAS

- [1] BRAVO, L. **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.** Nutrition Reviews, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- [2] COENTRÃO, Patrícia de Abreu Marques. **Avaliação de três técnicas de isolamento amostras de chocolate meio amargo.** 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.
- [3] Arts ICW, Hollman PCH. **Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies.** Am J Clin. Nutr. 2005; 81(Supl 1):S317-25.
- [4] ROSS J. A, KASUM C. M. **Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety.** Rev Nutr. 2002; 22:19-34. DOI :10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957.
- [5] SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. **Dietary intake and bioavailability of polyphenols.** J. Nutr., v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.
- [6] MOIRAH P. M. Menezes e Ulf Mehlig. **Manguezais: as florestas da Amazônia costeira.** Rev. Virtual Ciência Hoje, v.44 , nº 264, p. 34. 2009.
- [7] ALMEIDA, Vanessa C; **Extração de taninos da casca de Pinus caribaea var caribaea através da utilização de diferentes solventes.** 2006. 40 f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- [8] TSUKUI, Ana; REZENDE, Claudia M. **Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde.** Rev. Virtual de Química, v.6 , nº 6, p. 1713-1725. 2014.
- [9] CHEMAT, F; ABERT V. M, ZILL-e-HUMA Y. J. (2009) **Microwave assisted separations: green chemistry in action.** In: Pearlman JT (ed) Green chemistry research trends. Nova Science Publishers, New York, pp 33–62 2.
- [10] INFANTE, Juliana. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil.** 2013. 113 f. Tese (Ciência e Tecnologia dos Alimentos). - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba/São Paulo.
- [11] CROZIER, A. **Classification and biosynthesis of plants and secondary products: an overview.** In: GOLDBERG, G. (Ed). Plants: diet and health. Iowa: Blackwell Science for the British Nutrition Foundation, 2003, chap. 2, p. 27-48.
- [12] WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. **Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?** Food Res. Intern., v. 33, p. 449-459, 2000.

[13] HERTOOG, M. G.L.; HOLLMAN,P.C.H.;KATAN,M.B. **Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands** .J.Agr.Food Chem.,40, p 2379-2883, 1992.

[14] PINHEIRO, A.; CASÉ, F. **Flavonoides**. In: DOLINSKY, M. Nutrição funcional. São Paulo: Roca, 2009. cap. 3, p. 134-156.

[15] GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. **Phytochemicals and targets of chronic disease. In: Phytochemicals – a new paradigm**. BIDLACK, W.R.; OMAYE, S.T.; MESKIN, M.S.; JAHNER, D. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc, 1998.Chemistry, v. 53, p. 1370-1373, 2005.

[16] LAGE, Fabíola Fonseca **Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em forrageiras**. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

[17] DUTHIE, G.G.; DUTHIE, S.J.; KYLE, J.A.M. **Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants**. Nutrition Research Reviews, v. 13, p.79–106, 2000.

[18] Info Escola: Navegando e Aprendendo, **Acido Benzoico**. Disponível em: < <http://www.infoescola.com/quimica/acido-benzoico/>> Acesso em 15 de abril de 201.

[19] Fan JP, Zhang RF, Zhu JH (2010) **Optimization of microwave-assisted extraction of total triterpenoid in Diospyros kaki leaves using response surface methodology**. Asian J Chem 22(5):3487–3500.

[20] Nyiredy S (2004) **Separation strategies of plant constituents: current status**. J Chromatogr B812:35–51.

[21] Yuan L, Li H, Ma R, Xu X, Zhao C, Wang Z, Chen F, Hu X (2012) **Effect of energy density and citric acid concentration on anthocyanins yield and solution temperature of grape peel in microwave-assisted extraction process**. J Food Eng 109:274–280.

[22] Dhobi M, Mandal V, Hemalatha S (2009) **Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan–silybinin**. J Chem Metrl 3(1):13–23.

[23] JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATTO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: UNICAMP, 2006.cap. 9, p. 273-397.

[24] SILVA, R. C. S.; AKISUE, G.; COELHO, M. D. C.; ALMEIDA, J. C. R.; ALMEIDA, A. P. S. **Potencial do Araribá no desenvolvimento de fitoterápico: extração de**

fenóis e taninos totais. Disponível em:
<<http://www.unitau.br/unindu/artigos/pdf506.pdf>>. Acesso em: 17 de abr. 2015.

[25] NUNOMURA, R. C. S.; PINTO, A. C.; POHLIT, A. M.; NUNOMURA, S. M.; AMARAL, A. C. F. **Constituintes químicos dos galhos de Simaba guianensis subesp. Ecaudata (Cronquist).** Química Nova, v.35, n.11, p.2153-2158, 2012.

[26] LAMOUNIER, Keli Cristina. **Estudo dos polifenóis, atividade antioxidante e antimicrobiana da madeira e casca de Maclura tinctoria (L) D.** Don ex Steud - Uberlândia: UFU, 2010. 113 p.: il.

[27] BARRIADA, P. M.; CONCHA, G. E.; GONZÁLEZ, C. M. J.; MUNIATEGUI, L. S.; LÓPEZ, M. P.; PRADA, R. D.; FERNANDEZ, F. E. **Microwave-assisted Extraction versus Soxhlet Extraction in the Analysis of 21 Organochlorine Pesticides in Plants.** Journal of Chromatography A 2003, 1008, 115.

[28] UPADHYAY, R.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. **Microwave-assisted Extraction of Chlorogenic Acids from Green Coffee Beans.** Food Chemistry 2012, 130, 184.

[29] CARDOSO, U. G. A.; SOSA, M. M. E.; BALLARD, T.; LICEAGA, A.; González, M. F. S. M. **Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (Beta vulgaris).** LWT- Food Science and Technology 2014, 59, 276.

[30] WAKTE, P. S.; SACHIN, B. S.; PATIL, A. A.; MOHATO, D. M.; BAND, T. H.; SHINDE, D. B. **Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from Curcuma longa.** Separation and Purification Technology 2011, 79, 50.