

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE
Setor de Ciências Exatas e Tecnologia – Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEL/UEPG/UNICENTRO

OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE
***Baccharis druncunculifolia* VISANDO APLICAÇÃO EM PROCESSO**
PRODUTIVO INDUSTRIAL

Tese de Doutorado

MAIRA CASAGRANDE

Guarapuava – PR, 2019.

MAIRA CASAGRANDE

**OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE
Baccharis drancunculifolia VISANDO APLICAÇÃO EM PROCESSO
PRODUTIVO INDUSTRIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Estadual do Centro Oeste, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Química.

Professor Orientador: Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti.

Professor Co-Orientador: Dr. Américo Wagner Júnior.

Guarapuava – PR, 2019.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

A553p Casagrande, Maira
Otimização de extração de compostos bioativos de *Baccharis drancunculifolia* visando aplicação em processo produtivo industrial / Maira Casagrande. -- Guarapuava, 2019.
xx, 134 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, em ampla associação com UEL e UEPG, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

Orientador: Carlos Ricardo Maneck Malfatti
Coorientador: Américo Wagner Júnior
Banca examinadora: Carlos Ricardo Maneck Malfatti, Maria Lurdes Felsner, Najeh Maissar Khalil, Marianne Ayumi Shirai, Paula Fernandes Montanher

Bibliografia

1. Química. 2. Planejamento fatorial completo. 3. Planejamento de misturas. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Processos de extração. 6. Compostos fenólicos. 7. Atividade Antioxidante. 8. Concentração de compostos. 9. Filme ativo. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 540

MAIRA CASAGRANDE

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Baccharis drancunculifolia* VISANDO APLICAÇÃO EM PROCESSO PRODUTIVO INDUSTRIAL

Tese apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 7 de agosto de 2019


Prof.^a. Dr.^a. Maria Lurdes Felsner – Unicentro


Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil - Unicentro


Prof.^a. Dr.^a. Marianne Ayumi Shirai – UTFPR


Prof.^a. Dr.^a. Paula Fernandes Montanher – UTFPR


Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti - Orientador

GUARAPUAVA-PR

2019

Dedico,

Ao meu companheiro, Juliano.

In-memorian à minha avó Alzira.

In-memorian aos meus avós Rosa Maria e Valdomiro.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida, pela oportunidade e o privilégio de estudar e apreender, pela força que a mim concedeu para vencer meus limites pessoais e profissionais, bem como pelo Seu amparo durante toda minha vida.

À toda minha família, pelo alicerce durante a vida. Em especial a minha avó Alzira, minha companheira, minha auxiliar de coleta e de preparo de amostras, que hoje descansa em paz, deixando sua marca nesta e em várias etapas importantes da minha vida, assim como meus avós Rosa e Valdomiro, que também deixaram suas marcas em minha vida, aos quais serei eternamente agradecida. Também de forma especial à minha mãe Terezinha e à minha irmã Amanda.

Ao meu companheiro Juliano, não tenho palavras para agradecer.

À minha “Princesa”, minha amiga de quatro patas, companheira de escrita e da vida.

Aos meus amigos, pela construção da “leveza” durante a caminhada.

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Ricardo Maneck Malfatti, pela oportunidade, ajuda e compreensão.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Américo Wagner Júnior, pela amizade, pelo profissionalismo, pelo conjunto de qualidades que reúne, que tornaram possível minha formação.

Ao Professor Doutor Cleverson Busso, por toda orientação com a parte microbiológica, e pela sua amizade.

À Professora Doutora Paula Fernandes Montanher, por toda ajuda, orientação e ensinamentos com a parte cromatográfica, e pela sua amizade.

Aos membros da banca, aos docentes do PPGQ, à UNICENTRO e à Neusa Delgado, pela acolhida, pelo profissionalismo, pelos ensinamentos e pela oportunidade de aprender.

Aos colegas do PPGQ, do grupo Myrtaceae e do grupo Biomed, pela ajuda, companhia e troca de experiências.

À UEL e ao Professor Doutor Fabio Yamashita, pela acolhida e ensinamentos.

À UTFPR, por todo incentivo, tomando possível minha formação.

Aos colegas de trabalho, por todo companheirismo.

À família Zago, pela acolhida e permissão da coleta das amostras de *Baccharis dracunculifolia* em sua propriedade.

A cada contribuição, durante toda a vida, responsável e incentivadora, para que eu tivesse a oportunidade de chegar a esta etapa.

Agradeço e compartilho a minha alegria de transpor esse limite pessoal, e esta meta, que há 15 anos, quando concluía o Ensino Médio, parecia-me tão inatingível, devido a minha realidade.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa, ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”

(Isaac Newton)

RESUMO

CASAGRANDE, Maira. Otimização de extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* visando aplicação em processo produtivo industrial. 2019. 134 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Universidade Estadual do Centro Oeste - PR.

A adequação de um protocolo de extração de compostos antioxidantes de biomassa vegetal é de importância para a padronização de extração de compostos de interesse industrial. O objetivo deste trabalho foi adequar, dentre as condições avaliadas, as melhores condições de extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante da planta *Baccharis dracunculifolia* (Bd), usando a metodologia de superfície de respostas (MSR). Um planejamento fatorial completo (PFC) 2^3 foi conduzido para avaliar os efeitos do tempo, temperatura e concentrações dos solventes etanol e acetona e um PFC 2^2 para tempo e temperatura, utilizando água como solvente. Os compostos fenólicos totais (CFT) e a capacidade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) foram as variáveis dependentes analisadas em todos os PFC's. Houve variação de CFT de 19,81 a 37,22 mg (EAG) g^{-1} (Equivalente ao ácido gálico), de DPPH de 64,68 a 222,07 μmol (Trolox) g^{-1} , de ABTS de 140,26 a 399,67 μmol (TEAC) g^{-1} e de FRAP de 308,62 a 704,56 $\mu\text{mol Fe}^{2+} g^{-1}$. Os pontos ótimos de extração determinados pelos PFC's foram: 90 minutos a 80 °C em água, 90 minutos a 80 °C em etanol 40%, e 90 minutos a 80 °C em acetona 40%. Os extratos com maiores rendimentos de CFT tiveram maiores atividades antioxidantes, havendo uma correlação forte e positiva entre os CFT avaliados e os valores de DPPH, ABTS e FRAP, obtidos pelas extrações realizadas. Um planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL) foi utilizado para verificar a eficiência da extração de compostos bioativos de Bd quando os solventes água, etanol e acetona eram misturados em diferentes proporções. Através do PSL foi possível detectar, através do perfil de desejabilidade, que a melhor proporção entre os três solventes, que resultariam no maior rendimento de compostos bioativos era (56:0:44 / água:etanol:acetona). Para motivo de comparação com o perfil de desejabilidade, selecionou-se também como melhor condição a relação de mistura (33:33:33 / água:etanol:acetona), referente ao ponto central do PSL. Através da seleção das melhores condições de extração determinadas pelos PFC's e pelo PSL foram determinados o valor da concentração eficiente para reduzir o DPPH em 50% (CE_{50}), concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (CLAE-UV). Os compostos extraídos com solvente etanol (40%) tiveram maior atividade inibitória frente as bactérias testadas (CIM e CBM) e melhores valores de CE_{50} . A análise de CLAE-UV demonstrou que dentre os ácidos fenólicos identificados e quantificados, o ácido ferúlico (AF) foi o componente majoritário para os pontos ótimos analisados pelos PFC's, e a catequina (CAT) seguida por AF para o PSL. Sendo assim, os compostos extraídos da planta Bd, através dos pontos ótimos de extração determinados pelos PFC's e PSL, possuem potencial aplicação industrial. Com base na maior efetividade contra bactérias patogênicas e estudos adicionais, selecionou-se o solvente etanol 40%, para extrair durante 180 minutos, a uma temperatura de 80 °C, 2,5 gramas de amostra de Bd previamente liofilizada, como metodologia de extração para gerar um produto liofilizado de Bd (PL-Bd). Tal produto concentrou as atividades bioativas da planta Bd, bem como reduziu a concentração necessária do extrato preparado para promover melhores efeitos bactericidas e bacteriostáticos. Por fim, produziu-se um filme ativo, pela metodologia de *casting*, com adição de PL-Bd, o qual permitiu a migração dos compostos antioxidantes contidos no PL-Bd previamente imobilizados para diferentes simulantes de bases alimentares. O filme ativo apresentou atividade antimicrobiana e propriedades mecânicas regulares, sendo possível no formato estudado tornar-se um candidato para compor um produto de uso farmacêutico.

Palavras-chave: Planejamento fatorial completo, Planejamento de misturas, Atividade antimicrobiana, Processos de extração, Compostos fenólicos, Atividade Antioxidante, Concentração de compostos, Filme ativo.

ABSTRACT

CASAGRANDE, Maira. Optimization of the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia* aiming application in industrial production process. 2019. 134 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Universidade Estadual do Centro Oeste - PR.

The suitability of a protocol for the extraction of antioxidant compounds from plant biomass is of importance for the standardization of extraction of compounds of industrial interest. The objective of this work was to study the best conditions for the extraction of phenolic compounds with antioxidant activity of the *Baccharis dracunculifolia* (Bd) plant using response surface methodology (RSM). A full factorial design (FFD) 2^3 was conducted to analyze the effects of time, temperature, and solvent concentration for ethanol and acetone solvents and a FFD 2^2 for time and temperature, using water as a solvent. The total phenolic compounds (TPC) and antioxidant capacity (DPPH, ABTS and FRAP) were the dependent variables analyzed for all FFD. There was a variation for TPC from 19.81 to 37.22 mg (GAE) g^{-1} (Gallic acid equivalent), for DPPH from 64.68 to 222.07 ($\mu\text{mol Trolox } g^{-1}$), for ABTS from 140.26 to 399.67 ($\mu\text{mol TEAC } g^{-1}$), and for FRAP from 308.62 to 704.56 ($\text{mmol Fe}^{2+} g^{-1}$). The optimal extraction conditions determined by FFD were: 90 minutes at 80 °C in water, 90 minutes at 80 °C in 40% ethanol, and 90 minutes at 80 °C in 40% acetone. The extracts with a greater quantity of TPC presented higher antioxidant activities, and there was a strong and positive correlation between TPC and the antioxidant activity assays (DPPH, ABTS and FRAP). A Simplex-Lattice mixing design (SLD), was used to verify the efficiency of the extraction of bioactive compounds from Bd when the solvents water, ethanol, and acetone were mixed in different proportions. Through the SLD, it was possible to detect, through the desirability profile, that the best proportion among the three solvents, which yielded the highest yield of bioactive compounds was (56:0:44 / water:ethanol:acetone). For the reason of comparison with the desirability profile, the mixing ratio (33:33:33 / water:ethanol:acetone), referring to the central point of the SLD, was also selected as the best condition. The efficient concentration value (EC_{50}), minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV) of the extracts at their optimal points, were determined by selecting the best conditions determined by PFC's and SLD. The compounds extracted with 40% ethanol demonstrated higher inhibitory activity against the tested bacteria (MIC and MBC) and better values of EC_{50} . Analysis of HPLC-UV showed that among the phenolic acids identified and quantified, ferulic acid (FA) was the major component for the optimum points analyzed by PFC's and the catechin (CAT) followed by FA for SLD. Therefore, the compounds extracted from Bd, through the optimum extraction points determined by the FFD and SLD, present potential for industrial application. Based on the higher effectiveness against pathogenic bacteria and additional studies, the 40% ethanol solvent was selected, to extract for 180 minutes, at a temperature of 80 °C, 2.5 grams of sample of the Bd previously lyophilized, as extraction methodology to generate a lyophilized product of Bd (LP-Bd). Such a product concentrated the bioactive activities of the Bd plant as well as reduced the necessary concentration of the prepared extract promoting better bactericidal and bacteriostatic effects. Finally, an active film was produced, by casting methodology, with addition of LP-Bd, which promoted the release of the antioxidant compounds contained in the LP-Bd previously added, demonstrating antimicrobial activity and regular mechanical properties, it being possible in the studied format, to become it a product of pharmaceutical use.

Keywords: Full Factorial Design, Mixture Design, Antimicrobial activity, Extraction process, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Concentration of compounds, Active film.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Exemplar da planta <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) com 12 meses de cultivo, (B) Abelha recolhendo resinas da planta Bd, (C) Abelha produzindo a própolis verde a partir da planta Bd.	23
Figura 2. Etapas das reações de oxidação e ação antioxidante.....	25
Figura 3. Estrutura química mínima de um composto fenólico.	28
Figura 4. Estruturas químicas de compostos fenólicos.....	29
Figura 5. Reação do ácido gálico com molibdênio VI, levando a formação de molibdênio V.	32
Figura 6. Estrutura do DPPH* e reação dele com uma molécula antioxidante.....	33
Figura 7. Formação do ABTS ^{•+} pelo persulfato de potássio, e reação dele com uma molécula antioxidante, produzindo ABTS ^{•+}	34
Figura 8. Redução do complexo TPTZ com Fe ³⁺	35
Figura 9. Amostra após secagem em temperatura ambiente durante 2 dias.	40
Figura 10. Obtenção das amostras da planta <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) por diferentes procedimentos de preparo.	41
Figura 11. Fluxograma genérico de produção dos extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) através dos planejamentos fatoriais de extração completos 2 ² e 2 ³	42
Figura 12. Pontos de mistura de um planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL).	45
Figura 13. Fluxograma genérico de produção dos extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) pelas diferentes proporções entre os solventes água, etanol e acetona, para extração de compostos bioativos, através do planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL).....	46
Figura 14. Metodologia de produção do produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd) a partir de experimentos de otimização de extração de compostos bioativos da planta.	48
Figura 15. Gráficos de Pareto demonstrando as significâncias das variáveis independentes (Tempo e Temperatura) sobre a variável dependente CFT ($p < 0,05$).	64
Figura 16. Gráficos de Pareto demonstrando as significâncias das variáveis independentes (Tempo, Temperatura e Concentração do Solvente utilizado) sobre a variável dependente DPPH ($p < 0,05$).....	69
Figura 17. Gráficos de Pareto demonstrando as significâncias das variáveis independentes (Tempo, Temperatura e Concentração do Solvente utilizado) sobre a variável dependente FRAP ($p < 0,05$).	70

Figura 18. Gráficos de Pareto demonstrando as significâncias das variáveis independentes (Tempo, Temperatura e Concentração do Solvente utilizado) sobre a variável dependente ABTS ($p < 0,05$).....	71
Figura 19. Gráficos de superfícies de respostas do planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL) para a extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) a partir da amostra de Bd liofilizada (A2), demonstrando a influência das variáveis independentes (água, etanol e acetona) sobre as dependentes (CFT, DPPH, ABTS e FRAP).....	76
Figura 20. Gráficos de Pareto do planejamento de mistura Simplex-Lattice (PLS) para diferentes proporções entre os solventes água, etanol e acetona, em função das respostas de compostos bioativos extraídos (CFT, DPPH, FRAP e ABTS) de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) ($p < 0,05$).	79
Figura 21. Perfis cromatográficos dos extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) referente aos pontos ótimos de extração (PFC's e PSL). Aonde: A (80 °C, 90 minutos, água), B (80 °C, 90 minutos, etanol 40%), C (80 °C, 90 minutos, acetona 40%), D (80 °C, 180 minutos, água:etanol:acetona – 33:33:33), E (80 °C, 180 minutos, água:etanol:acetona – 56:0:44) em extratos preparados a partir de amostras de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) liofilizadas (A2); Aonde: picos 1 (Epigallocatequina), 2 (Catequina), 3 (Rutina), 4 (Ácido ferúlico), 5 (Quercetina), 6 (Epigallocatequina), 7 (Catequina), 8 (Ácido ferúlico), 9 (Miricetina) e 10 (Quercetina).....	91
Figura 22. Produto liofilizado produzido a partir de extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd).....	96
Figura 23. Perfil cromatográfico do produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd). Aonde: pico 1 (Epigallocatequina), 2 (Catequina), 3 (Ácido ferúlico), 4 (Miricetina), 5 (Apigenina) e 6 (Canferol).....	102
Figura 24. Filmes ativos contendo diferentes proporções de produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd). Aonde A: Controle, contendo 0% de PL-Bd (PL-Bd 0%); B: contendo 1,0% de PL-Bd (PL-Bd 1,5%); C: contendo 1,5% de PL-Bd (PL-Bd 1,5%). ...	104
Figura 25. Micrografias das secções transversais das superfícies de fratura das diferentes formulações dos filmes ativos contendo produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd). Aonde PL-Bd 0%: contendo 0% de PL-Bd; PL-Bd 1,0%: contendo 1,0% de PL-Bd; PL-Bd 1,5%: contendo 1,5% de PL-Bd.....	107
Figura 26. Migração de compostos bioativos pelos filmes ativos adicionados de produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd) em função do tempo de contato com diferentes solventes.....	109

Figura 27. Zonas de inibição de micro-organismos pelos filmes ativos contendo produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) PL-Bd. Aonde: GEN (Gentamicina – 10 µg de antibiótico por disco); PL-Bd 1.0% (contendo 1% de PL-Bd); PL-Bd 1.5% (contendo 1,5% de PL-Bd); A (*S. aureus*); B (*E. coli*); C (*P. aeruginosa*); D (*S. enterica*)..... 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de umidade dos diferentes preparos de amostras (A1, A2 e A3).	42
Tabela 2. Níveis decodificados do planejamento fatorial (2^2) para a extração de compostos bioativos dos preparos de amostras A1, A2 e A3, em solvente água.	43
Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial (2^2) para a extração de compostos bioativos dos preparos de amostras A1, A2 e A3, em solvente água.....	43
Tabela 4. Níveis decodificados do planejamento fatorial (2^3) para a extração de compostos bioativos dos preparos de amostra A1, A2 e A3, em solvente etanol.....	43
Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial (2^3) para a extração de compostos bioativos dos preparos de amostras A1, A2 e A3, em solvente etanol.	44
Tabela 6. Matriz do planejamento de mistura de solventes Simplex-Lattice (PSL) de grau três.....	45
Tabela 7. Formulação dos filmes ativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) contendo produto liofilizado de Bd (PL-Bd) em diferentes proporções (m/v).	55
Tabela 8. Respostas do estudo de extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) utilizando água, etanol ou acetona como solventes.	61
Tabela 9. Coeficientes de regressão dos planejamentos fatoriais de extração de compostos bioativos da planta <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) utilizando água, etanol ou acetona como solventes.	65
Tabela 10. Influência dos diferentes preparos de amostras (A1, A2 e A3) de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) sobre as variáveis dependentes CFT, DPPH, FRAP e ABTS.....	66
Tabela 11. Coeficientes de correlação de Pearson de CFT, DPPH, ABTS e FRAP de extratos aquosos, etanólicos e acetônicos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd).....	73
Tabela 12. Concentrações dos componentes conforme o planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL) para o processo de extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd).....	75
Tabela 13. Coeficientes de regressão para CFT e atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) para as diferentes proporções dos solventes extratores água, etanol e acetona sobre a extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd).	78
Tabela 14. Perfis de desejabilidade para adequação da proporção entre a mistura dos solventes água, etanol e acetona para obtenção da maior eficiência em função dos parâmetros de determinação de compostos bioativos a partir de amostra liofilizada de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd).....	79

Tabela 15. Atividade antioxidante (CE ₅₀) dos pontos ótimos de extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd).	82
Tabela 16. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos pontos ótimos de extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd).	84
Tabela 17. Compostos fenólicos quantificados referentes as condições ótimas de extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd), dos planejamentos fatoriais completos (PFC) e de mistura de solventes Simplex-Lattice (PSL).	87
Tabela 18. Rendimentos de compostos bioativos extraídos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) nos diferentes tempos de extração.	93
Tabela 19. Efeito da relação amostra Bd/solvente etanol (40%) no rendimento da extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) em um mililitro de solvente. ..	95
Tabela 20. Efeito da relação amostra Bd/solvente etanol (40%) no rendimento da extração de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) em um grama de Bd.	95
Tabela 21. Concentração dos parâmetros bioativos CFT, DPPH, FRAP, ABTS e CE ₅₀ no produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd) em comparação ao extrato etanólico de Bd.	97
Tabela 22. Variação de compostos bioativos conforme as diferentes extrações realizadas em amostras de plantas do gênero <i>Baccharis</i> e de própolis em diferentes pesquisas realizadas.	98
Tabela 23. Atividade antimicrobiana e efeito bactericida do produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd) e do extrato etanólico de Bd.	100
Tabela 24. Compostos fenólicos identificados no produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd).	101
Tabela 25. Opacidade aparente e diferença de cor dos filmes ativos incorporados de produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd).	104
Tabela 26. Características mecânicas dos filmes ativos incorporados de produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd).	105
Tabela 27. Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e migração de compostos bioativos, dos filmes ativos incorporados de produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd).	109
Tabela 28. Zonas de inibição de micro-organismos pelos filmes ativos incorporados de produto liofilizado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd).	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS: Reagente comercial (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico))

ABTS⁺: Espécie reduzida

ABTS^{•+}: Radical ABTS

AO[•]: Produtos não radicalares

AOH: Composto antioxidante

(b.s): Base seca

Bd: *Baccharis dracunculifolia*

CBM: Concentração bactericida mínima

CE₅₀: Concentração eficiente

CFT: Compostos fenólicos totais

CIM: Concentração inibitória mínima

CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV

DPPH: Reagente comercial (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)

DPPH[•]: Radical DPPH

DPPH-H: Espécie de DPPH na forma reduzida

E: Elongação

EAG: Equivalente ao ácido gálico

ERO: Espécies reativas ao oxigênio

H[•]: Radical hidrogênio

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MPa: Mega Pascal

MRS: Metodologia de superfície de resposta

MY: Módulo de Young

O₂: Oxigênio molecular

OH[•]: Radical hidroxila

Op: Opacidade

PFC: Planejamento fatorial completo

PL-Bd: Produto liofilizado de Bd

PSL: Planejamento de misturas Simplex-Lattice

PVA: Poli(vinil álcool)

PVAT: Poli(vinil acetato)

R[•]: Radical livre

TPTZ: Reagente comercial (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina)

TR: Tensão na ruptura

Trolox: Reagente comercial (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)

UFC: Unidades formadoras de colônias

$[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$: Complexo TPTZ na forma reduzida

$[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$: Complexo TPTZ

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd).....	23
2.2 ANTIOXIDANTES	24
2.2.1 Compostos fenólicos	27
2.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	29
2.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)	31
2.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH, ABTS e FRAP).....	32
2.6 PRODUÇÃO DE FILMES ATIVOS.....	35
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 METODOLOGIA	40
4.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	40
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS DOS PLANEJAMENTOS FATORIAIS DE EXTRAÇÃO (PFC's)	41
4.3 PREPARO DOS EXTRATOS DOS PLANEJAMENTOS DE MISTURA DE SOLVENTES SIMPLEX-LATTICE (PSL)	45
4.4 METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE UM PRODUTO LIOFILIZADO A PARTIR DAS OTIMIZAÇÕES DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd)	47
4.4.1 Diferentes tempos de extração de compostos bioativos a partir de <i>Baccharis</i> <i>dracunculifolia</i> (Bd).....	47
4.4.2 Saturação do solvente extrator de compostos bioativos a partir de <i>Baccharis</i> <i>dracunculifolia</i> (Bd).....	47
4.4.3 Metodologia de produção do produto liofilizado a partir de <i>Baccharis</i> <i>dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd).....	48
4.5 METODOLOGIAS DE ANÁLISE.....	49
4.5.1 Metodologia de análise de teor de umidade.....	49

4.5.2 Metodologias de análises de atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) e compostos fenólicos totais (CFT).....	49
4.5.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais (CFT) <i>in vitro</i>	49
4.5.2.2 Análise da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método da captura do radical DPPH	50
4.5.2.3 Análise de atividade antioxidante total <i>in vitro</i> pelo método de redução do ferro (FRAP).....	50
4.5.2.4 Análise de atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método da captura do radical ABTS	51
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NAS AVALIAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) EM SEUS PONTOS ÓTIMOS DE EXTRAÇÃO (PFC's E PSL) E PARA O PRODUTO LIOFILIZADO DE Bd (PL-Bd)	51
4.6.1 Análise da atividade antioxidante <i>in vitro</i> expressa em CE ₅₀	52
4.6.2 Teste de atividade antimicrobiana	52
4.6.2.1 Método da microdiluição em caldo: concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	52
4.6.3 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (CLAE-UV)	53
4.7 METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE UM FILME ATIVO CONTENDO PRODUTO LIOFILIZADO DE <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd)	54
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS.....	55
4.8.1 Umidade dos filmes ativos	55
4.8.2 Espessura dos filmes ativos.....	55
4.8.3 Propriedades mecânicas dos filmes ativos	56
4.8.4 Opacidade aparente (Op) e diferença de cor (ΔE^*) dos filmes ativos.....	57
4.8.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes ativos	57
4.8.6 Migração de componentes bioativos dos filmes ativos para diferentes simulantes de bases alimentícias.....	58
4.8.7 Análise da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método do radical DPPH e análise de compostos fenólicos totais <i>in vitro</i> dos filmes ativos.....	58
4.8.8 Análise de atividade antimicrobiana pelo método do disco de difusão dos filmes ativos	59

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 PLANEJAMENTOS FATORIAIS DE EXTRAÇÃO COMPLETOS (PFC's) (2² e 2³)	60
5.1.1 Efeito dos parâmetros de extração sobre as respostas de compostos fenólicos totais (CFT).....	60
5.1.2 Efeito dos parâmetros de extração sobre as respostas de atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP).....	66
5.1.3 Correlação de Pearson.....	72
5.2 PLANEJAMENTO DE MISTURA DE SOLVENTES SIMPLEX-LATTICE (PSL)	74
5.3 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO DOS PLANEJAMENTOS FATORIAIS COMPLETOS (PFC's) E PLANEJAMENTO DE MISTURA DE SOLVENTES SIMPLEX-LATTICE (PSL)	80
5.3.1 Atividade antioxidante expressa em CE ₅₀ das condições ótimas de extração dos planejamentos fatoriais completos (PFC's) e do planejamento de misturas Simplex-Lattice (PSL)	81
5.3.2 Atividade antimicrobiana – concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das condições ótimas de extração dos planejamentos fatoriais completos (PFC's) e do planejamento de misturas Simplex-Lattice (PSL).....	83
5.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) das condições ótimas de extração, de compostos bioativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd), dos planejamentos fatoriais completos (PFC's) e do planejamento de misturas Simplex-Lattice (PSL).....	86
5.4 PRODUÇÃO DE UM PRODUTO LIOFILIZADO A PARTIR DE <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd)	92
5.5 PRODUÇÃO DE FILME ATIVO CONTENDO PRODUTO LIOFILIZADO DE <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd) (PL-Bd).....	103
5.5.1 Opacidade aparente (Op) e diferença de cor (ΔE^*) dos filmes ativos	103
5.5.2 Propriedades mecânicas e espessura dos filmes ativos.....	105
5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes ativos	107
4.9.1 Migração do PL-Bd para diferentes simulantes de bases alimentícias, atividade antioxidante, e atividade antimicrobiana, dos filmes ativos.....	108
6 CONCLUSÃO	114
7 REFERÊNCIAS.....	116

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas envolvendo produtos naturais são importantes pela possibilidade de descobertas de novos produtos farmacêuticos (SFORCIN e BANKOVA, 2011; ALVES *et al.*, 2010). Através da exploração de suas substâncias bioativas, os produtos naturais são fontes valiosas para o desenvolvimento de novas tecnologias de produção industriais (MELO *et al.*, 2011), permitindo o avanço na descoberta de biomoléculas com potencial aplicação em várias áreas da ciência. Por exemplo, os polifenóis oriundos de fontes naturais podem vir a reduzir o risco de várias doenças que ameaçam a vida humana, como o câncer e doenças cardiovasculares, em função de suas atividades antioxidantes (KUMAZAWA, 2004).

A justificativa de que compostos bioativos oriundos de produtos vegetais podem prevenir e tratar doenças cancerosas, as quais atingem até 3 bilhões de pessoas mundialmente, unida ao fato de que o Brasil possui a flora com maior diversidade do mundo (INFANTE *et al.*, 2016), permitem e encorajam as pesquisas acerca deste tema, bem como estudos minuciosos de extração e testes de utilização destas substâncias nas mais variadas tecnologias de criação e elaboração de produtos de subsistência aos seres humanos.

A *Baccharis dracunculifolia* (Bd) é uma planta pertencente ao gênero *Asteraceae*, largamente encontrada no sul do Brasil e também conhecida popularmente como alecrim do campo (FUKUDA, 2006). No Brasil, a maior parte da própolis verde é derivada desta planta, aonde as abelhas recolhem das suas folhas substâncias para produzi-la, e isso a torna promissora para a realização de muitos estudos biológicos (GUIMARÃES *et al.*, 2012; SFORCIN e BANKOVA, 2011; SILVA FILHO *et al.*, 2009; FUNARI *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2004), principalmente pela capacidade de sequestrar radicais livres possuindo, portanto, capacidade antioxidante (PÁDUA *et al.*, 2010; BRIGHENTE *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Os antioxidantes são compostos que previnem a oxidação de outras substâncias (EMBUSCADO, 2015), agindo como estabilizadores de radicais livres (LLACUNA e MACH, 2012).

Em vista disso, há crescente busca por métodos de extrações que consigam reter no extrato maiores quantidades de compostos bioativos (MONROY *et al.*, 2016; MOKRANI e MADANI, 2016; GARMUS *et al.*, 2015; BURIN *et al.*, 2014; CHIRINUS *et al.*, 2007), e para este caso os compostos bioativos presentes na planta Bd. Poucos estudos foram encontrados na literatura consultada analisando grande número de variáveis de extração de compostos bioativos oriundos da planta Bd, simultaneamente, como: influência do preparo das amostras por diferentes métodos de secagem, tipos e concentrações variadas dos

solventes extratores, diferentes tempos e temperaturas de extração, diferentes proporções entre 3 solventes de extração, relação massa e volume entre o solvente e a amostra no processo de extração, por exemplo. Tais parâmetros são essenciais para possibilitar a veiculação industrial da Bd através da utilização de um protocolo adequado, possibilitando o rendimento máximo no processo de extração daquilo que se deseja extrair.

Este projeto teve como objetivo encontrar o ponto ótimo de extração de compostos bioativos da planta Bd através da quantificação desses extratos quanto a diferentes tipos de métodos analíticos de determinação de atividade antioxidante. Para isso, utilizou-se o planejamento fatorial de experimentos e o planejamento de misturas, a fim de permitir melhor compreensão dos efeitos de cada variável estudada, visando maior rendimento do processo de extração em função das respostas de interesse. Dos extratos com maiores rendimentos, apontados pelos planejamentos fatoriais e pelo planejamento de misturas, foram analisados a cinética de captura do radical DPPH (CE₅₀), atividades antimicrobianas contra micro-organismos patogênicos e quantificações de alguns compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (CLAE-UV).

Também foi objetivo deste trabalho, gerar um produto liofilizado padronizado, do ponto máximo e mais efetivo de extração, encontrado pela conclusão dos estudos de todas as variáveis avaliadas, e incorporá-lo a um polímero, com intuito de que este material funcione como um imobilizador do princípio ativo do produto liofilizado de Bd (PL-Bd), sendo esta uma opção prévia de aplicação teste do PL-Bd, conforme as suas características apresentadas. De qualquer forma, ainda há o propósito de que o PL-Bd seja utilizado em estudos futuros, para o desenvolvimento de novos produtos com adição de Bd, através de sua prévia caracterização já realizada no presente trabalho, para que suas propriedades e características sejam melhor compreendidas e aplicadas, podendo então, participar de alguma formulação alimentícia, cosmética e/ou farmacêutica, conferindo a estas um diferencial como um ingrediente ativo de fonte natural.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Baccharis dracunculifolia* (Bd)

O gênero *Baccharis* é composto por mais de 500 espécies, sendo observada no Brasil a ocorrência de 120 destas (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). A Bd é popularmente chamada no Brasil de “vassoura” ou “alecrim do campo”, caracterizando-se como uma planta arbustiva, perene e lenhosa, com altura média de 2 a 3 metros, de propagação seminífera, com caule bastante ramificado e recoberto densamente por tricomas (SANTOS *et al.*, 2012) (Figura 1A). A *Apis mellifera*, uma espécie de abelha africanizada, costuma recolher resinas de brotos ou folhas da planta Bd, utilizando-na para produzir a própolis verde (SFORCIN e BANKOVA, 2011; PARK *et al.*, 2004) (Figura 1B e 1C).

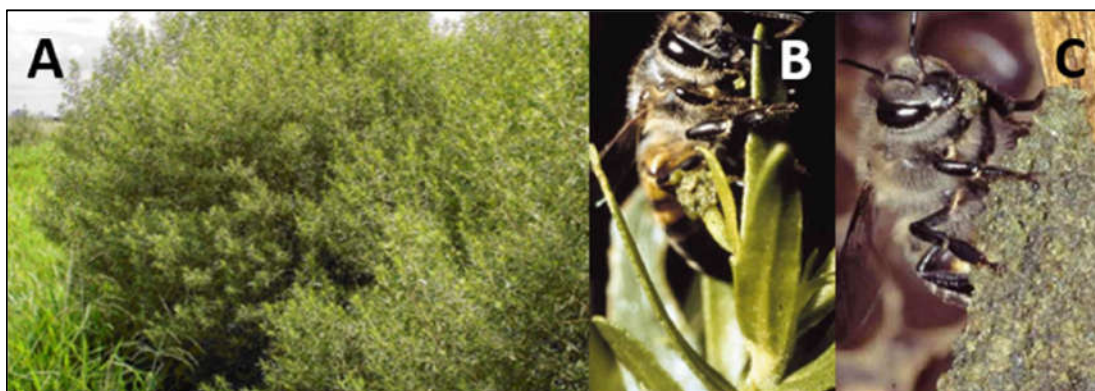


Figura 1. (A) Exemplar da planta *Baccharis dracunculifolia* (Bd) com 12 meses de cultivo, (B) Abelha recolhendo resinas da planta Bd, (C) Abelha produzindo a própolis verde a partir da planta Bd.

Fonte: Souza (2007); Kumazawa *et al.*, (2003).

A própolis é um produto biossintetizado a partir de plantas, por abelhas, com objetivo de proteger a colmeia contra patógenos, sendo assim, suas propriedades medicinais são conhecidas desde a antiguidade (SUN *et al.*, 2018; BANKOVA *et al.*, 2018; SIMÕES-AMBROSIO *et al.*, 2010). No Brasil, a planta Bd é a principal fonte botânica para produção da própolis verde, com muitos estudos biológicos realizados por tal característica (GUIMARÃES *et al.*, 2012; SFORCIN e BANKOVA, 2011; SILVA FILHO *et al.*; 2009; FUNARI *et al.*, 2007).

Funari e Ferro (2006), ao analisarem amostras da planta Bd e de própolis, coletadas em uma mesma área, observaram que tanto a planta quanto a própolis verde apresentavam uma grande variedade de substâncias fenólicas. Os autores observaram ainda um perfil químico muito similar entre as amostras de própolis e das plantas, corroborando com os

estudos que apontam a Bd como a principal fonte botânica de produção da própolis verde. Embora a própolis e a sua fonte botânica tenham perfis químicos semelhantes, como no caso exposto anteriormente, vale salientar que existem variados tipos de própolis (verde, marrom, vermelha), e conforme a sua fonte botânica e entre as diferentes própolis, as atividades biológicas e perfis químicos podem sofrer variações (ANDRADE *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2016; SFORCIN e BANKOVA, 2011). No entanto, o material da planta possui fonte de metabólitos com maior padronização se comparado aos diversos tipos de própolis existentes, o que torna mais fácil, do ponto de vista legal, a produção e registro de um novo medicamento utilizando a Bd (planta) como matéria-prima, se comparado a utilização da própolis produzida por um inseto (abelha), e que pode assim, ter maiores variações de seus perfis químicos conforme a região produtora (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

As espécies do gênero *Baccharis* apresentam atratividade para a indústria farmacêutica e de alimentos, uma vez que demonstram comprovadas atividades antimutagênicas (RESENDE *et al.*, 2007), anti-inflamatórias (LÍVERO *et al.*, 2016; BACHIEGA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2010), antimicrobianas (CASAGRANDE *et al.*, 2018; SALAZAR *et al.*, 2018; VEIGA *et al.*, 2017), antifúngicas (SOBRINHO *et al.*, 2016), hepatoprotetora (GUIMARÃES *et al.*, 2012), não citotóxicas e com atividade contra leishmaniose (SILVA FILHO *et al.*, 2009), anticariogênica (PEREIRA *et al.*, 2016; AIRES *et al.*, 2016), antidiabética (HOCAYEN *et al.*, 2016) e antioxidantes (CASAGRANDE *et al.*, 2018; VEIGA *et al.*, 2017; SOBRINHO *et al.*, 2016; SARTOR *et al.*, 2013; PÁDUA *et al.*, 2010; BRIGHENTE *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Estudos recentes de viabilidade econômica da planta Bd (PAULA *et al.*, 2016) e testes de avaliação de vida útil de compostos bioativos extraídos de Bd (TEIXEIRA *et al.*, 2017) foram realizados. Em função disso, e devido ao fato de a Bd ser uma planta de fácil e espontânea propagação (GOMES e FERNANDES, 2002), poder-se-ia viabilizar uma aplicação tecnológica, agregando-se valor aos processos produtivos que a utilizassem como matéria-prima, sendo reforçados pela justificativa de que, em um produto a base de Bd, podem ser encontradas substâncias, com maior possibilidade de padronização, também presentes na própolis verde, a qual já possui há longa data seu efeito medicinal reconhecido.

2.2 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são compostos que previnem a oxidação de outras substâncias (EMBUSCADO, 2015; BITTENCOURT *et al.*, 2015), atuando como estabilizadores de radicais livres (LLACUNA e MACH, 2012). Do ponto de vista estrutural, os antioxidantes

são compostos aromáticos que possuem ao menos uma hidroxila (-OH) ligada ao anel (RAMALHO e JORGE, 2006) ou cadeias carbônicas contendo duplas ligações alternadas ou conjugadas (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Os radicais livres, os quais são produzidos por hemólise através de fornecimento de energia à molécula, são espécies com um ou mais elétrons livres em uma camada de valência, e por isto são altamente reativos, possuindo assim a capacidade de abstrair um elétron de uma molécula para estabilizar-se (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; SOLOMONS e FRYHLE, 2011). As moléculas antioxidantes estabilizam-se por ressonância, tornando-se assim, incapazes de iniciar ou propagar reações oxidativas após a abstração de seu hidrogênio pelos radicais livres (RAMALHO e JORGE, 2006).

As reações de oxidação podem ocorrer através de três estágios: iniciação, propagação e terminação, sendo que a presença de calor, luz, oxigênio, enzimas, metais de transição, metal-proteínas e micro-organismos podem atuar como iniciadores (BOROSKI *et al.*, 2015). A Figura 2 demonstra as etapas das reações de oxidação e o efeito da ação antioxidante, na qual: RH = substrato, R[•] = radical livre, ROO[•] = radical peróxido, ROOH = hidroperóxido e AOH = composto antioxidante.

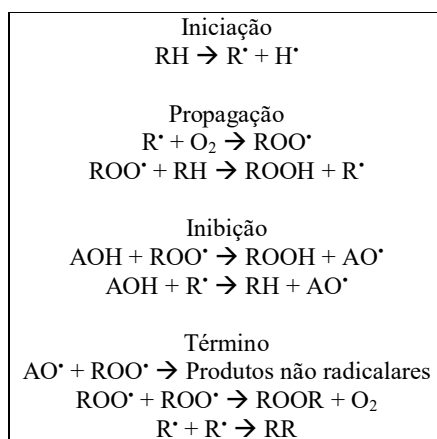


Figura 2. Etapas das reações de oxidação e ação antioxidante.
Fonte: Boroski *et al.*, (2015); Huang *et al.*, (2005); Frankel (1980).

O oxigênio é essencial à vida, mas também pode ser nocivo, apresentando algumas espécies altamente reativas, como as espécies reativas ao oxigênio (ERO) (HALLIWELL, 1997). As ERO são formas de O₂ parcialmente reduzidas que podem ser geradas naturalmente por células, no organismo, sendo consequência de atividades enzimáticas e da respiração (VALKO *et al.*, 2007). Entre as ERO, pode-se citar o ânion superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (OH[•]), radicais peroxila (ROO[•]), que quando em presença dos antioxidantes

podem resultar na redução da formação dessas espécies através da captura das mesmas ou de seus precursores (HALLIWEL, 1997).

As reações metabólicas do corpo humano produzem ERO, nas quais podem ser inclusos os radicais livres, e há uma captura dessas espécies naturalmente por antioxidantes biológicos produzidos pelo corpo humano por sistemas enzimáticos que funcionam como antioxidantes naturais (superóxido-dismutase, catalase e glutatona-peroxidase). Quando há desequilíbrio na quantidade de ERO podem ocorrer efeitos degenerativos ao organismo em função da não inativação dos radicais livres produzidos em excesso, e esta condição nomeia-se estresse oxidativo (NICOLAI *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2010; CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Desta forma, faz-se muito importante uma dieta de antioxidantes exógenos, especialmente quando as ERO estão em alta no organismo, como forma de auxiliar na captura dessas espécies, já que o desequilíbrio de ERO pode desencadear graves doenças (MENG *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2010; SIMÕES-AMBRÓSIO *et al.*, 2010).

Os compostos antioxidantes podem ser de origem sintética, os quais são largamente utilizados como conservantes, para o melhoramento da estabilidade oxidativa dos alimentos, pela indústria alimentícia (BHA – butilhidroxianisol, BHT – butilhidroxitolueno, TBHQ – tercbutilhidroquinona e PG – propilgalato), e também de origem natural (NICOLAI *et al.*, 2016; EMBUSCADO, 2015; PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2008; RAMALHO e JORGE, 2006). Sendo assim, são fontes de antioxidantes naturais as matérias vegetais (EMBUSCADO, 2015; SHAHIDI e ZHONG, 2010; RAMALHO e JORGE, 2006), os tecidos animais e micro-organismos (SHAHIDI e ZHONG, 2010).

Ocorre que os antioxidantes sintéticos, vem sendo apontados como tóxicos, podendo causar efeitos adversos em humanos com exposição a longo prazo (NICOLAI *et al.*, 2016; EMBUSCADO *et al.*, 2015; DEVATEKAL e NAVEENA, 2010; DEVATEKAL *et al.*, 2010; SHAHIDI e ZHONG, 2010), que podem levar a cânceres (SHAHIDI e ZHONG, 2010). Mesmo sendo amplamente utilizados pela indústria de alimentos no Brasil, em concentrações definidas (BRASIL, 1998; BRASIL, 1997; BRASIL, 1965), em outros países, o antioxidante sintético TBHQ, por exemplo, tem seu uso restrito, no Canadá e União Europeia, com proibição no Japão (SHAHIDI e ZHONG, 2010). Isso mostra que existe fomento na realização de pesquisas, as quais visam encontrar fontes antioxidantes naturais para testá-las e utilizá-las como substituintes dos antioxidantes sintéticos em diversas tecnologias, com objetivo de satisfazer o apelo do consumidor por produtos naturais agregados a tecnologias de produtos para subsistência humana, ao invés de produtos

sintéticos (CASAGRANDE *et al.*, 2018; CALDERÓN-OLIVER *et al.*, 2016; EMBUSCADO *et al.*, 2015; JERÓNIMO *et al.*, 2012).

Desta forma, a aplicabilidade dos compostos bioativos extraídos de produtos vegetais, já exposta pela literatura tem sido vasta e em desenvolvimento contínuo. Há estudos demonstrando sua eficácia na área alimentícia como conservantes naturais (VAITHIYANATHAN *et al.*, 2011; SELANI *et al.*, 2011; DEVATEKAL e NAVEENA, 2010; DEVATEKAL *et al.*, 2010; NAVEENA *et al.*, 2008), compondo biopolímeros em filmes antibacterianos (HOSSEINI *et al.*, 2015), em filmes nanométricos com propriedades anticarcinogênicas (ATHIRA e JYOTHI, 2015), em microcápsulas antibacterianas (SOLIMAN *et al.*, 2013), em filmes com propriedades antimicrobianas (ARAÚJO *et al.*, 2015), por exemplo. Os efeitos benéficos que podem apresentar as moléculas bioativas oriundas de Bd, derivadas da atividade antioxidante de seus extratos, podem ser justificativas para tornar essas moléculas bioativas extraídas, como matéria-prima, para o desenvolvimento de novos produtos pelas indústrias farmacêuticas, alimentícias e/ou cosméticas. Esta ideia pode ser reforçada pelo fato da própolis verde produzida a partir de Bd ter potencialidade em reduzir as ERO (SIMÕES-AMBRÓSIO *et al.*, 2010).

2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos (TAIZ e ZEIGER, 2009) e são um grande grupo de metabólitos secundários produzidos por várias plantas, podendo prevenir doenças cardiovasculares e tumorais (MENG *et al.*, 2012), devido a atividade antioxidante que podem exercer (EMBUSCADO, 2015; KUMAZAWA *et al.*, 2004; KAHKONEN *et al.*, 1999). Eles podem ser encontrados em plantas comestíveis ou não, e ter múltiplos efeitos biológicos (EMBUSCADO, 2015; KAHKONEN *et al.*, 1999), de forma que, os compostos fenólicos agem como agentes redutores, doando hidrogênios (EMBUSCADO, 2015). Os extratos de frutas, ervas, legumes, cereais e outros materiais vegetais são ricos em compostos fenólicos (EMBUSCADO, 2015; KAHKONEN *et al.*, 1999), sendo que possuem como estrutura básica um anel aromático, podendo ter uma ou mais hidroxilas ligadas a ele (MELO *et al.*, 2009) (Figura 3).

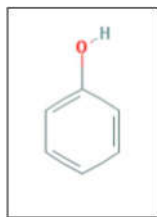


Figura 3. Estrutura química mínima de um composto fenólico.
Fonte: Pub Chem., (2017).

A importância dos produtos naturais já está bem evidenciada e em face disso eles são promissores para a descoberta de novos medicamentos (BARROS *et al.*, 2008). Sendo os compostos fenólicos um grupo importante de compostos bioativos (GARMUS *et al.*, 2015), a presença deles em quantidades significativas em um extrato, pode vir a inativar radicais livres e demonstrar bioatividades ligadas a esse potencial inativador, como por exemplo, compor de forma padronizada um fármaco que funcione por este mecanismo (SFORCIN e BANKOVA, 2011). Visto que, moléculas polifenólicas, tais como ácidos fenólicos e flavonoides, são compostos responsáveis por possuir alta capacidade antioxidante (SUN *et al.*, 2018).

Os compostos fenólicos vegetais naturais são compostos por uma grande e variável classe de moléculas produzidas pelas plantas. As quais são oriundas do metabolismo secundário vegetal. O qual não está ligado diretamente aos processos metabólicos primários de uma planta, como o crescimento e o desenvolvimento da planta, mas ligado a produção de moléculas pela planta com objetivo de defesa e perpetuação da mesma. Havendo uma classificação de todas as moléculas produzidas pelo metabolismo secundário vegetal em três grandes classes: os terpenoides, os alcaloides e os compostos fenólicos (GARCIA *et al.*, 2010; TAIZ e ZEIGER, 2009).

Os compostos fenólicos são subdivididos em classes devido a sua diversidade estrutural, e conforme o número e posição das hidroxilas (OH) e/ou outros grupos substituintes, em subclasses, tais como os ácidos fenólicos e os flavonoides (MELO *et al.*, 2009) (Figura 4). Conforme Verdi *et al.* (2005), entre os fitoquímicos que mais se destacam nas plantas do gênero *Baccharis* estão os flavonoides e terpenoides, sendo a Bd uma das espécies mais pesquisadas quanto a atividade biológica, e os flavonoides alvo de pesquisas aplicadas a medicina, devido as suas atividades antioxidantes.

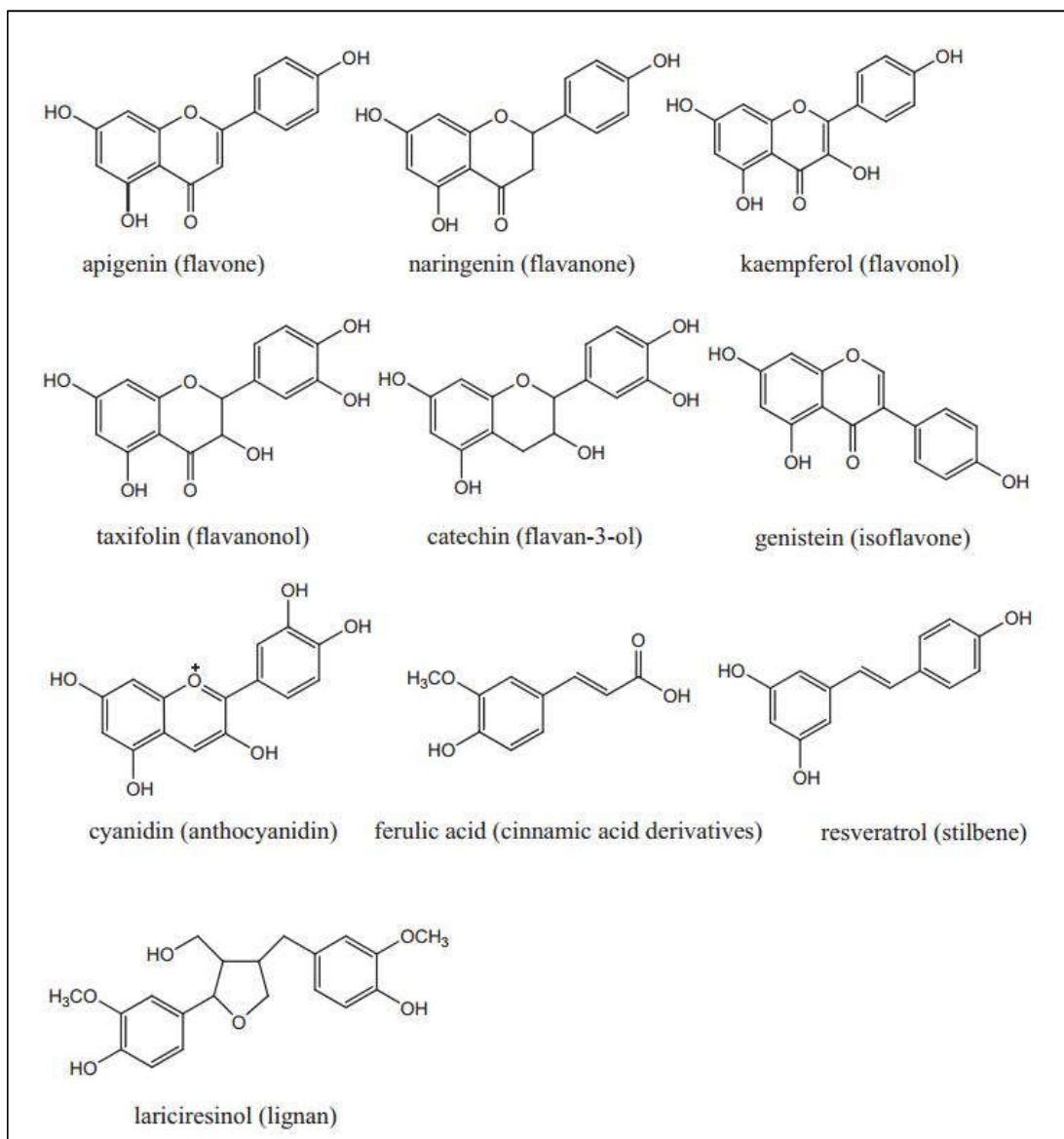


Figura 4. Estruturas químicas de compostos fenólicos.

Fonte: Shahidi e Zhong, (2010).

2.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O estudo de produtos naturais tem demonstrado dependência das técnicas de extrações utilizadas para separação dos compostos de interesse (GARMUS *et al.*, 2015; VARGAS *et al.*, 2013), requerendo mudanças frequentes das técnicas de extração, conforme os requisitos de produção e de qualidade, nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética (GARMUS *et al.*, 2015).

A dificuldade está em extrair, identificar e aplicar esses compostos bioativos. Pois, a solubilidade dos compostos fenólicos é dependente da polaridade do solvente utilizado para extração, da polimerização dos fenólicos, da interação deles com outros constituintes da

planta e da formação de complexos insolúveis, não existindo um processo universal que seja adequado para a extração de todos os compostos fenólicos ou de uma classe deles (FELIX *et al.*, 2018; CVETANOVIC *et al.*, 2015).

Desta forma, há a necessidade de adequar aos diferentes materiais vegetais um protocolo de extração. Neste sentido, muitos são os estudos que visam otimizar a extração desses compostos, de diversas matrizes, com o objetivo de potencializar seus efeitos benéficos à saúde (CASAGRANDE *et al.*, 2019; FELIX *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2017; CUJIC *et al.*, 2016; MASKOVIC *et al.*, 2016; ALBERTI *et al.*, 2014; PRASAD *et al.*, 2011; KARACABEY e MAZZA, 2010; POMPEU *et al.*, 2009; AMAKURA *et al.*, 2002), que podem ser agregados às tecnologias de processamento de alimentos e fármacos, devido e conforme as suas características de ação, mostrando assim a importância da realização de estudos de extração, concentração e purificação de compostos bioativos.

Para adequação de um protocolo de extração que possui um número considerável de variáveis que possam influenciar no processo, faz-se muito importante a utilização de ferramentas estatísticas que auxiliem na tomada de decisões sobre estes parâmetros. Quando existem duas ou mais variáveis de estudo (fatores: variáveis independentes), o planejamento fatorial de experimentos permite a combinação destas variáveis, e sendo assim, é possível saber como uma variável afeta a outra, pois uma estará sujeita a outra (CUJIC *et al.*, 2016; CALADO e MONTGOMERY, 2003).

A utilização do planejamento de experimentos permite ao analista verificar se são e o quanto são importantes, em seus experimentos, as variáveis independentes em questão, em função de uma resposta de interesse (variáveis dependentes) (ANDERSON-COOK *et al.*, 2009). Variáveis independentes como tempo de extração, temperatura de extração, pH dos extratos, concentração sólido-líquido da amostra-solvente, preparo de amostras diversificados para extração, concentração do solvente para extração (CASAGRANDE *et al.*, 2019; BURIN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2013; GAN e LATIFF, 2011; PRASAD *et al.*, 2011; KARACABEY e MAZZA, 2010; WIJNGAARD e BRUNTON, 2010; POMPEU *et al.*, 2009), vem sendo estudadas sobre as variáveis dependentes compostos fenólicos totais (CFT), e/ou atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) (FRAP, do inglês: *Ferric Reducing Antioxidant Power*), com intuito de promover o maior rendimento de compostos bioativos extraídos por estes parâmetros. Em vista de que, as condições de extração envolvidas no processo podem aumentar a eficiência do rendimento de compostos bioativos (POMPEU *et al.*, 2009), e extrair compostos químicos de variabilidade química diferente,

conforme o método de extração envolvido, implicando em variadas propriedades funcionais do extrato obtido (POVEDA *et al.*, 2018).

Quando a mistura de componentes pode ser útil para otimizar as variáveis respostas é indicado utilizar o planejamento de misturas como ferramenta estatística (CIRILLO, 2015; CALADO e MONTGOMERY, 2003). Neste planejamento, os fatores são os componentes da mistura, em função de uma resposta, a qual pode variar conforme a proporção desta mistura, e tal mistura deve satisfazer o somatório entre as partes resultando em um (1) (ANDERSON-COOK *et al.*, 2009). A mistura de diferentes solventes, como a água, o etanol e a acetona, por exemplo, também é um fator que pode interferir na qualidade e rendimento de compostos extraídos (FELIX *et al.*, 2018; KUBILIENE *et al.* 2015). Como outro exemplo, Baj *et al.* (2018) utilizaram o planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL) para avaliar o efeito sinérgico entre óleos essenciais extraídos das plantas de manjeriço, manjerona e alecrim, e definindo as condições de mistura e o modelo matemático, adequados, ao estudo de mistura dos óleos sobre o efeito da eficiência antioxidante.

Isto demonstra a extrema importância da utilização de ferramentas de apoio para a definição de condições de extração de compostos bioativos de produtos naturais, já que não há padronização de extração, além de uma possibilidade de maior rendimento dos compostos que se deseja extrair, variando as mais diversas possibilidades de condições de extração, simultaneamente. Em nível industrial, as condições adequadas, podem resultar em economia, auxiliando na maximização do rendimento dos compostos de interesse e na minimização dos gastos com matéria-prima, insumos, tempo de processo, dentro outros, auxiliando na viabilidade do produto, focadas em posteriores aplicações que venham a ser mercadológicas e de utilidade para os seres humanos.

2.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

É possível detectar compostos fenólicos por meio de espectrofotometria, aonde vários grupos de compostos fenólicos podem ser quantificados de forma total. Por outro lado, por meio de técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência é possível fazer a separação e quantificação individual, dos compostos fenólicos presentes em uma amostra (KUBILIENE *et al.*, 2015; NACZK e SHAHIDI, 2004).

Os métodos espectrofotométricos de quantificação de CFT já estão bem desenvolvidos e tem-se utilizado pela literatura, em avaliações de variados materiais vegetais, por exemplo, os métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu (CASAGRANDE *et al.*, 2019; CASAGRANDE *et al.*, 2018; VEIGA *et al.*, 2017; MOKRANI e MADANI, 2016;

SIMIRGIOTIS *et al.*, 2016; RAMIREZ *et al.*, 2015; NINA *et al.*, 2015; FIGUEIREDO-RINHEL *et al.*, 2013; SARTOR *et al.*, 2013; MELLO e HUBINGER, 2012; MARTINEZ-CORREA *et al.*, 2012; NACZK e SHAHIDI, 2004). O método de Folin-Ciocalteu é o mais utilizado dentre os autores anteriormente pesquisados. No entanto, ambos métodos possuem interferentes (Folin-Denis e Folin-Ciocalteu), tais como proteínas extraíveis, Cobre (I) e Vitamina C, por exemplo (HUANG *et al.*, 2005; NACZK e SHAHIDI, 2004).

Para a quantificação de CFT, no presente estudo, utilizou-se a metodologia do Folin-Ciocalteu, pois ela é reprodutível, e de fácil e rápida execução, tornando-a possível de utilizá-la em comparações, via literatura, seguras, entre as pesquisas que utilizam este método. Neste ensaio, espécies redutoras, como compostos fenólicos são desprotonados em meio básico, produzindo ânion fenolato. Estes, por sua vez, reduzem os sais de tungstato de sódio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), contidos no reagente Folin-Ciocalteu, que leva o nome do método, do estado de oxidação VI a V, formando os complexos molibdênio-tungstênio ($\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}$)⁴⁻, e estes são azuis (BOROSKI *et al.*, 2015; VADIVEL e BRINDHA, 2015; DICIAULA *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2005; SINGLETON, ORTHOFER e LAMUELA, 1999) (Figura 5).

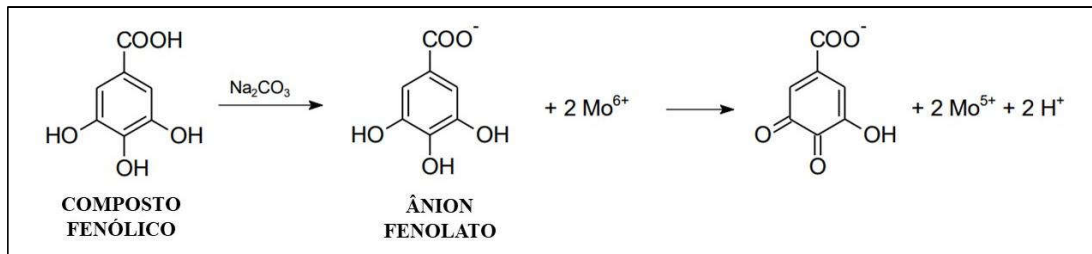


Figura 5. Reação do ácido gálico com molibdênio VI, levando a formação de molibdênio V.
Fonte: Oliveira, (2011).

2.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH, ABTS e FRAP)

Devido a simplicidade e rapidez de execução, sensibilidade e reprodutibilidade, os métodos de análise de atividade antioxidante DPPH, ABTS e FRAP, são amplamente utilizados para detectar a capacidade antioxidante *in vitro* de extratos de plantas (SALGUEIRO e CASTRO, 2016; PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2008).

Então, não existe método único *in vitro* capaz de determinar toda a atividade antioxidante em uma análise apenas, pois os antioxidantes têm diferentes mecanismos característicos de reação (SUN *et al.*, 2015). Desta forma, recomenda-se a utilização de ao

menos dois métodos complementares para avaliação antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2008; MENG *et al.*, 2012), sendo o mais frequentemente utilizado o da captura do radical DPPH (MENG *et al.*, 2012). Desta forma, os diferentes métodos de atividade antioxidante, devido aos diferentes mecanismos das reações que desempenham, exprimem resultados diferentes entre si, para a avaliação de uma mesma amostra (MELLO e HUBINGER, 2012).

A análise de captura do radical DPPH é baseada na capacidade do extrato que está sendo analisado capturá-lo (BITTENCOURT *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2010). Mensor *et al.* (2001) explicam que o DPPH é um radical estável em solução etanólica (DPPH[•]), e que produz coloração violeta quando dissolvido em etanol. Aceita um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, ou seja, é reduzido na presença de uma molécula antioxidante. Quanto maior a reação de redução dos radicais DPPH, maior a descoloração da cor púrpura violeta da solução de DPPH[•], tornando a solução amarelada, devido ao recebimento do átomo de hidrogênio (H) oriundo da espécie antioxidante (AOH) (BOROSKI *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2010) (Figura 6).

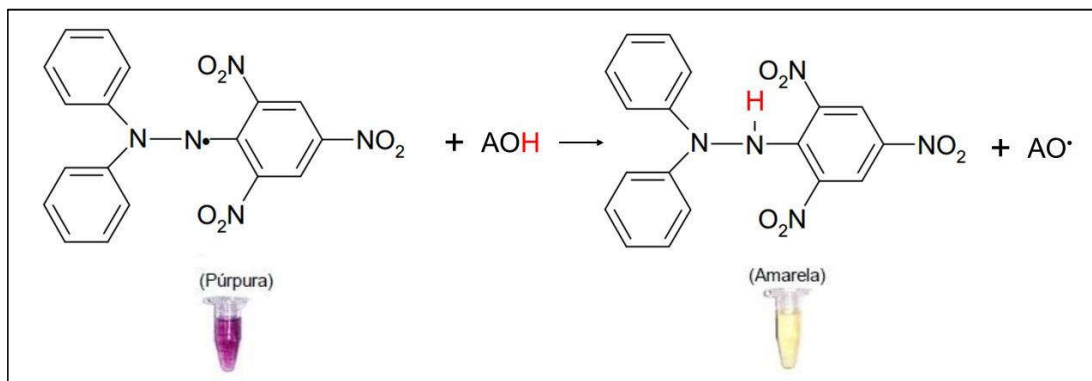


Figura 6. Estrutura do DPPH[•] e reação dele com uma molécula antioxidante.

Fonte: Boroski *et al.*, (2015); Oliveira, (2011); Rufino *et al.* (2007b).

O ensaio de ABTS, também conhecido internacionalmente como TEAC (*Trolox equivalente antioxidante capacity*), reage da mesma forma que o ensaio da captura do radical DPPH, através da captura do radical livre, pelas moléculas antioxidantes (AOH) (GULLÓN *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2005). No entanto, diferentemente do radical DPPH, o radical cátion ABTS precisa ser formado antes da análise e esta formação dá-se através da reação com persulfato de potássio (K₂SO₅), aonde o mesmo oxida o ABTS, para formar ABTS^{•+}, e este por sua vez é reduzido pelas moléculas antioxidantes quando em análise, formando o ABTS⁺. O ensaio de ABTS também se diferencia do de DPPH por ter o tempo de reação mais rápido, de aproximadamente 6 minutos (SINGH *et al.*, 2016; RUFINO *et al.*, 2007a). A reação de redução, do ABTS^{•+} para o ABTS⁺, pode ser visualizada pela

mudança de coloração do meio reacional do verde ao incolor, respectivamente (GULLÓN *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2005; RE *et al.* 1999) (Figura 7).

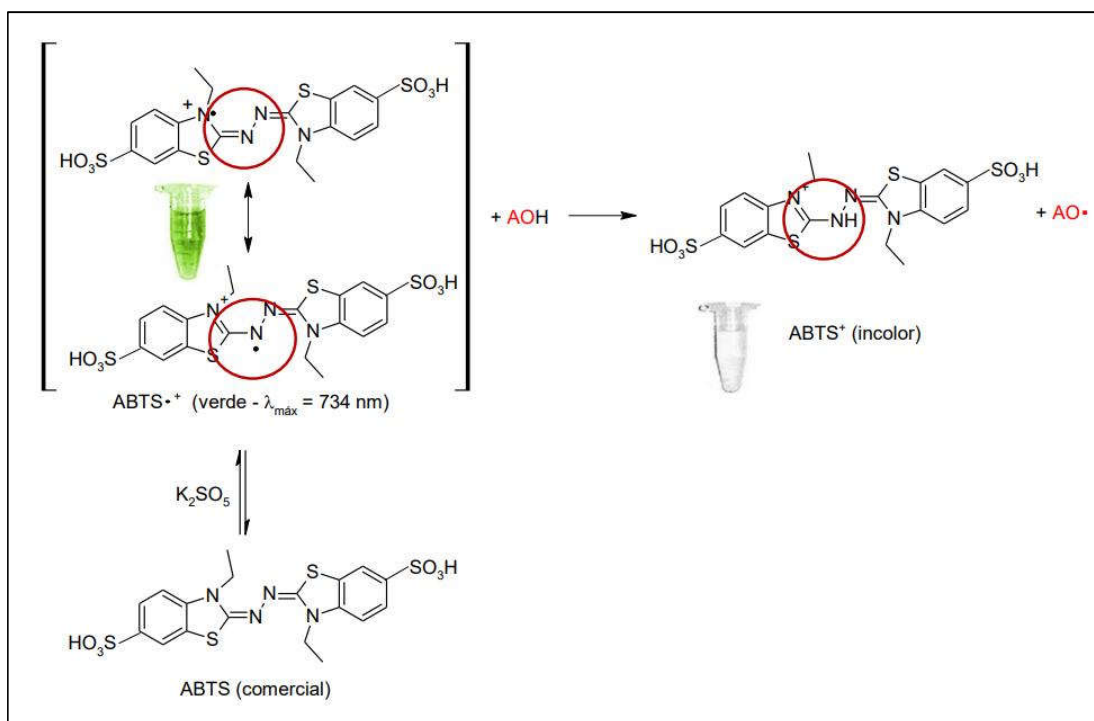


Figura 7. Formação do ABTS^{•+} pelo persulfato de potássio, e reação dele com uma molécula antioxidante, produzindo ABTS⁺.

Fonte: Oliveira, (2011).

O teste do FRAP mede a capacidade da amostra antioxidante reduzir o Fe³⁺ a Fe²⁺ (GULLÓN *et al.*, 2017; MENESES *et al.*, 2013). Quando em meio ácido (pH 3,6) e em presença de uma substância antioxidante redutora, o complexo TPTZ [Fe³⁺(TPTZ)₂]³⁺ {aonde TPTZ individualmente é o composto [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina]}, recebe um elétron, e é reduzido à forma [Fe²⁺(TPTZ)₂]²⁺, ele apresentar-se-á com coloração intensa azul (BOROSKI *et al.*, 2015) (Figura 8).

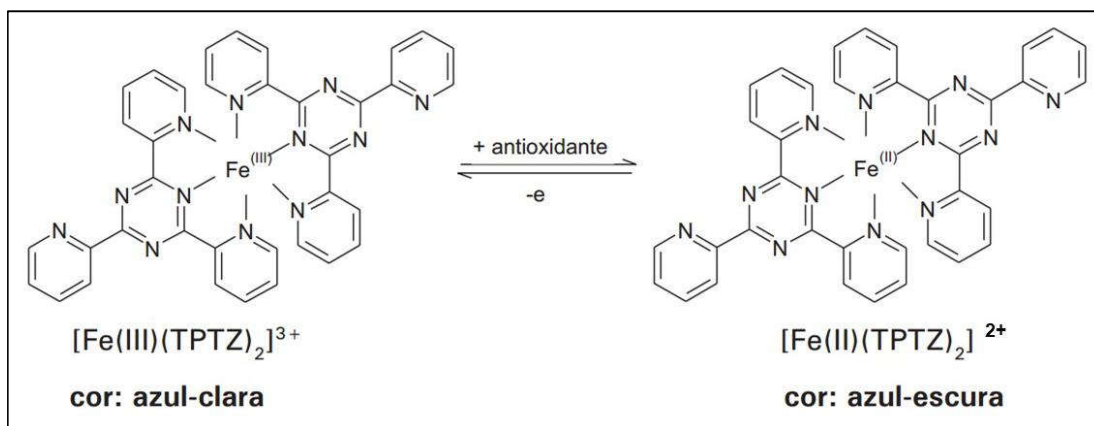


Figura 8. Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+} .
 Fonte: Rufino *et al.*, (2006).

A capacidade de uma molécula antioxidante capturar radicais livres frente ao estresse oxidativo é um fator importante biologicamente (MELLO e HUBINGER, 2012). Desta forma, embora as amostras testadas pela captura do radical DPPH, por exemplo, possam não reproduzir biologicamente a atividade detectada *in vitro*, tal teste pode ser utilizado como selecionador de amostras, para testes biológicos subsequentes.

2.6 PRODUÇÃO DE FILMES ATIVOS

Os polímeros são substâncias de alto peso molecular, compostas de monômeros (subunidades que se repetem), unidos através de reação de polimerização, e que podem possuir comprimento de cadeias e ramificações diferentes. Podem ser sintéticos (nylon, polietileno, baquelite) ou naturais (amido, celulose, seda). Data de 1839, o registro mais antigo de manipulação de substâncias com intuito de formar um polímero, quando Charles Goodyear transformou a borracha natural em uma substância elástica. De maneira geral, a classificação dos polímeros pode-se dar de variadas formas, dependendo do tipo de reação de obtenção, da estrutura, e de acordo com as propriedades físicas que apresentam (CAREY, 2011; SOLOMONS e FRYHLE, 2011).

A produção de plásticos a nível mundial vem apresentando crescimento constante. Estimativas afirmam que no ano de 2015 foram produzidos, no mundo, e na Europa, 322 e 58 milhões de toneladas de plásticos, respectivamente. Em 2016 esses valores subiram para 335 e 60 milhões de toneladas, respectivamente. O setor de embalagens foi responsável por 39,9% da demanda de plásticos na Europa em 2016 (PLASTICS EUROPE, 2017). Tais informações incentivam a pesquisa de formulações poliméricas a partir de fontes naturais e

biodegradáveis, contribuindo para a produção de polímeros que se degradem com maior rapidez, se comparados aos formulados apenas de fontes petroquímicas não biodegradáveis.

O amido é um material de baixo custo, totalmente biodegradável e amplamente disponível, no entanto, apresenta alguns inconvenientes para sua aplicação pura, pois é hidrofílico e não possui boas propriedades mecânicas, limitando sua utilização de forma individual, sendo necessário misturá-lo a outros polímeros para melhorar suas características poliméricas (TANG e ALAVI, 2011; VROMAN e TIGHZERT, 2009). O poli(vinil álcool) – PVA, é produzido através da hidrólise do poli(vinil acetato) – PVAT com hidróxido de sódio (NaOH), em meio metanólico, apresentando alta resistência mecânica associada a uma boa formação de filmes, e com aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em embalagens que entram em contato com alimentos (SEKISUI, 2019). Desta forma, o PVA apresenta potencialidades de utilização agregado ao amido para a produção de materiais devido ao fato de ambos apresentarem boa compatibilidade, conforme observado por Zanela *et al.* (2015) e Mao *et al.* (2002).

O glicerol é uma molécula muito utilizada em formulações de filmes biodegradáveis com função na matriz polimérica de plastificante (ZHANG *et al.*, 2018; ASSIS *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2015; CHANG-BRAVO *et al.*, 2014). Um plastificante pode ser definido como uma substância, ou material que é incorporado a um polímero, com a função de aumentar a sua flexibilidade e manuseabilidade, reduzindo sua rigidez (Módulo de Young) e tensão na ruptura (DANIELS, 2009). Em nível molecular, os plastificantes, que são moléculas de baixas massas moleculares, posicionam-se entre as grandes cadeias poliméricas, e assim, aumentam a distância entre essas cadeias, proporcionando redução das forças intermoleculares atrativas das cadeias, o que resulta em uma maior mobilidade intermolecular (CALLISTER e RETHWISCH, 2015).

Há fomento atualmente, para se produzir embalagens conservadoras de alimentos, focadas em ativos naturais, em substituição aos sintéticos, possuindo atividade antioxidante e antimicrobiana oriundas de materiais naturais, sendo assim, combinar em formulações de embalagens, para alimentos, antioxidantes naturais e os materiais das embalagens, pode auxiliar nas limitações dos processos oxidativos dos alimentos que as contiver, contribuindo para o aumento do tempo de estocagem destes alimentos (RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2017b; TALÓN *et al.*, 2017). Frente a isto, é um desafio produzir embalagens por novas técnicas, e as principais inovações neste campo são as produções de embalagens ativas, embalagens inteligentes e embalagens bioativas, havendo a interação intencional com o conteúdo delas, influenciando na saúde do consumidor (MAJID *et al.*, 2018).

Extratos ricos em compostos fenólicos, compondo um polímero, podem prover propriedades funcionais a ele, como antioxidantes e antimicrobianas, tornando então este polímero uma embalagem ou um filme ativo, pelo mecanismo de ação que podem exercer os compostos ativos adicionados (KAM *et al.*, 2018; CHANG-BRAVO *et al.*, 2014). Desta forma, há também o fomento pela produção de filmes ativos que visam criar produtos de subsistência aos seres humanos, testando suas propriedades e determinando suas possíveis aplicações em função delas. Araújo *et al.* (2015), por exemplo, produziram filmes ativos biodegradáveis incorporados de extrato etanólico de própolis verde, obtendo migração de moléculas antioxidantes com ação antimicrobiana, do filme, sendo esses filmes, passíveis de incorporação, após mais estudos, em processamentos de produtos de ordem alimentícia e/ou farmacêutica.

Não foram encontrados na literatura consultada filmes ativos a base de Bd, amido de mandioca e PVA. Segundo as propriedades biológicas da Bd já expostas por este trabalho, a produção de um filme incorporado de Bd poderia ser um carreador das atividades biológicas já comprovadas da planta. Desta forma, desenvolver filmes adicionados de antioxidantes de origem natural, poderia substituir a utilização de antioxidantes sintéticos, em aplicações para embalagens de ordem alimentar (ASSIS *et al.*, 2017). Além disso, conforme as características finais e atividades, do polímero produzido, tornar-se objeto de estudo e aplicação também pela indústria farmacêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

→ Avaliar o efeito do tempo e da temperatura de extração, dos diferentes preparos de amostra, concentrações, misturas e saturação de solventes, para determinar a melhor condição de extração de compostos bioativos de partes aéreas da planta *Baccharis dracunculifolia*, em função das respostas de atividade antioxidante e compostos fenólicos, buscando-se padronizar a melhor condição para a produção de um produto liofilizado com propriedades bioativas passíveis de incorporação em processo produtivo industrial.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Determinar as melhores condições de extração de compostos bioativos da planta *Baccharis dracunculifolia*, que resultem no maior rendimento das variáveis respostas, variando-se o tempo, temperatura, tipo e concentração de solventes;

→ Determinar qual (ais) variável (eis) independente (s) tem maior influência no processo de extração em função de cada variável dependente, em cada um dos planejamentos fatoriais de extração;

→ Verificar a influência de diferentes formas de preparo de amostra de *Baccharis dracunculifolia* (*in-natura*, seca em estufa e liofilizada), em função do rendimento das variáveis respostas;

→ Verificar se há correlação entre a capacidade antioxidante dos extratos produzidos e os compostos fenólicos, avaliados;

→ Avaliar a influência das proporções entre os solventes água, etanol e acetona, utilizados como extratores de compostos bioativos da planta *Baccharis dracunculifolia*, sobre o rendimento de compostos fenólicos e de atividade antioxidante através do planejamento de misturas;

→ Avaliar se os extratos selecionados como melhores pontos de extração, dentre as combinações avaliadas, são eficientes contra as bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*;

→ Separar e quantificar compostos fenólicos, por CLAE-UV, dos extratos produzidos, com os maiores rendimentos das variáveis respostas;

→ Utilizar o processo de extração com a maior capacidade de extração de compostos bioativos e maior espectro de efeito antimicrobiano, para desenvolver um produto liofilizado, por este protocolo, com intuito de facilitar futuros estudos de aplicação dos princípios ativos extraídos da planta *Baccharis dracunculifolia* focando em suas ações comprovadas;

→ Formular um filme ativo com a incorporação do produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* como um princípio ativo.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo foram oriundas da planta *Baccharis dracunculifolia* (Bd), coletadas no município de Dois Vizinhos – PR. A coleta foi realizada em 14 de dezembro de 2016, no período da manhã, segundo as coordenadas geográficas, latitude: 25°40'35''Sul, longitude: 53°6'33''Oeste. Foram colhidos aproximadamente 5 Kg de folhas (em base úmida). Desses 5 Kg de folhas (separadas de seus pedúnculos), após secagem em temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 2 dias (BESTEN *et al.*, 2013), houve um rendimento de aproximadamente 3 Kg de folhas secas (Figura 9).



Figura 9. Amostra após secagem em temperatura ambiente durante 2 dias.
Fonte: Da Autora, (2016).

Da quantidade total coletada da planta, foi retirado um ramo, sendo este depositado no herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *Câmpus* Dois Vizinhos – PR, como exsicata, no qual recebeu o número de registro DVPR5301.

Procedeu-se a separação da amostra (Figura 9) em 3 porções. Uma proveniente apenas da primeira secagem a temperatura ambiente durante 2 dias, amostra 1 (A1). A segunda porção foi submetida ao congelamento, posteriormente a liofilização (Liofilizador marca JJ científica, modelo LJ02) durante 24 horas (h), sendo nomeada amostra 2 (A2). E a terceira porção separada foi seca a 37 ± 3 °C por um período aproximado de 24 h, em estufa

de secagem (Estufa marca eletrolab, modelo 402/3), e foi nomeada amostra 3 (A3). Após o processamento, as amostras foram moídas em moinho de facas tipo Willey (TE-648, Tecnal, Brazil), e passadas por peneira de 20 mesh, de granulometria de 0,84 milímetros (Figura 10). As três amostras foram transferidas para sacos plásticos vedados, envoltos em papel alumínio, acondicionadas em potes plásticos âmbar, que foram armazenados a temperatura de -18 °C (graus Celsius) até o início dos procedimentos analíticos.



Figura 10. Obtenção das amostras da planta *Baccharis dracunculifolia* (Bd) por diferentes procedimentos de preparo.

Fonte: Da Autora, (2019).

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS DOS PLANEJAMENTOS FATORIAIS DE EXTRAÇÃO (PFC's)

Os extratos foram produzidos pesando-se 1 grama de cada amostra, em tubo de ensaio com tampa, adicionados de 25 mL de cada solvente (obedecendo as matrizes dos planejamentos fatoriais de extração – Tabelas 2 a 5), medidos em balão volumétrico, submetidos aos tempos de extração, temperaturas de extração, tipos e concentrações de solventes (conforme as matrizes dos planejamentos fatoriais – Tabelas 2 a 5), filtrados, avolumados novamente para 25 mL e armazenados a 4 °C (Figura 11). A massa pesada de Bd sempre foi corrigida para base seca (b.s), segundo a determinação da umidade das

amostras (Tabela 1), conforme metodologia descrita no item 4.5.1, realizadas na semana da produção dos extratos (CASAGRANDE, 2014).

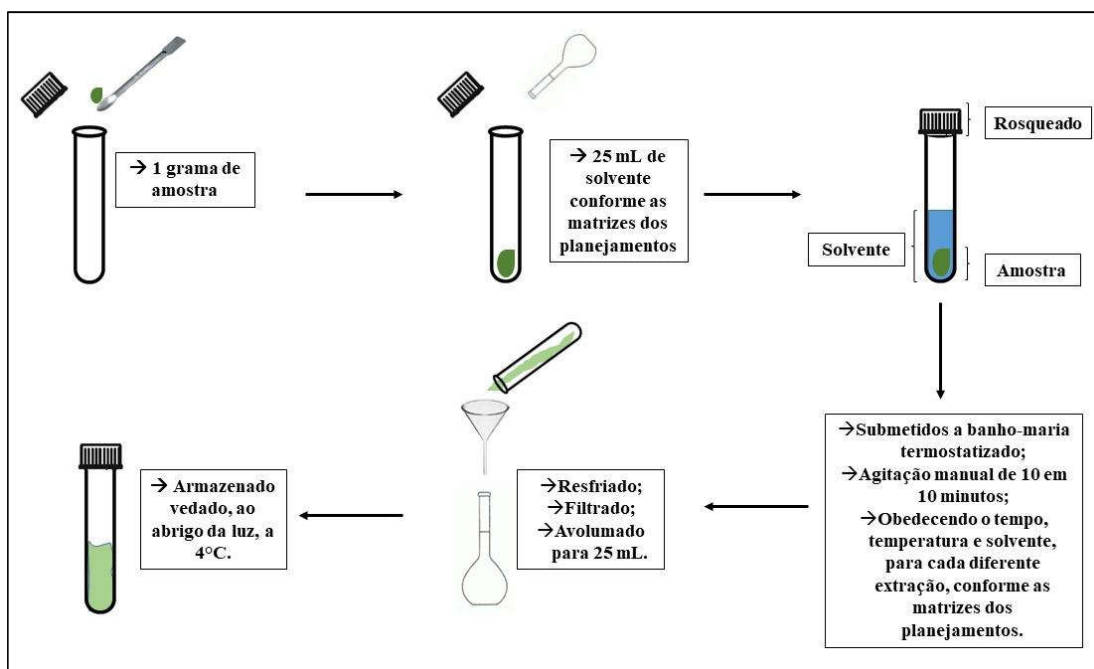


Figura 11. Fluxograma genérico de produção dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) através dos planejamentos fatoriais de extração completos 2^2 e 2^3 .

Fonte: Da Autora, (2018).

Tabela 1. Teor de umidade dos diferentes preparos de amostras (A1, A2 e A3).

Amostra	Processamento	*Umidade (%)
A1	Secagem natural (48 horas)	24,69±0,46
A2	Liofilização (24 horas)	4,62±0,15
A3	Estufa (24 horas)	11,46±0,48

*média ± desvio padrão (n = 3).

As combinações das variáveis independentes tempo, temperatura, solvente e concentração de solventes, para o preparo de cada extrato, seguiram as matrizes dos planejamentos fatoriais, conforme Tabelas 2, 3, 4 e 5. Para os procedimentos de extração, utilizando-se solvente água adotou-se um planejamento fatorial completo (PFC) 2^2 , com 3 pontos centrais, e duplicatas genuínas dos pontos 1 a 7. Na Tabela 2 podem ser observados os níveis decodificados do PFC 2^2 , e na Tabela 3 as matrizes do planejamento. Este planejamento totalizou 7 extrações diferentes, 14 extratos devido a duplicata genuína e 14 ensaios para cada variável dependente. O experimento foi repetido para cada amostra (A1, A2 e A3). Para as 3 amostras totalizou 42 extratos produzidos.

Tabela 2. Níveis decodificados do planejamento fatorial (2²) para a extração de compostos bioativos dos preparos de amostras A1, A2 e A3, em solvente água.

Níveis decodificados		
Níveis Codificados	Tempo de extração em banho-maria (minutos)	Temperatura de extração (°C)
-1	30	40
0	60	60
+1	90	80

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial (2²) para a extração de compostos bioativos dos preparos de amostras A1, A2 e A3, em solvente água.

Níveis codificados		
Ensaio	Tempo de extração em banho-maria (minutos)	Temperatura de extração (°C)
1	(30) -1	(40) -1
2	(30) -1	(90) +1
3	(90) +1	(40) -1
4	(90) +1	(90) +1
5	(60) 0	(60) 0
6	(60) 0	(60) 0
7	(60) 0	(60) 0

Para os processos de extração com os solventes etanol e acetona, separadamente, foi utilizado um PFC 2³, com 3 pontos centrais, e duplicatas genuínas dos pontos 1 a 11. Na Tabela 4 podem ser observados os níveis decodificados do planejamento fatorial de extração com o solvente etanol, e na Tabela 5 a matriz do planejamento. Este planejamento totalizou 11 extrações diferentes, 22 extratos devido a replicata genuína, e 22 ensaios para cada variável dependente. O experimento foi repetido para cada amostra (A1, A2 e A3). Para as 3 amostras totalizou 66 extratos produzidos.

Tabela 4. Níveis decodificados do planejamento fatorial (2³) para a extração de compostos bioativos dos preparos de amostra A1, A2 e A3, em solvente etanol.

Níveis decodificados			
Níveis Codificados	Tempo de extração em banho-maria (minutos)	Temperatura de extração (°C)	Concentração da solução de Etanol (%)
-1	30	40	40
0	60	60	60
+1	90	80	80

Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial (2^3) para a extração de compostos bioativos dos preparos de amostras A1, A2 e A3, em solvente etanol.

Ensaio	Níveis codificados		
	Tempo de extração em banho-maria (minutos)	Temperatura de extração (°C)	Concentração da solução de Etanol (%)
1	(30) -1	(40) -1	(40) -1
2	(30) -1	(40) -1	(80) +1
3	(30) -1	(80) +1	(40) -1
4	(30) -1	(80) +1	(80) +1
5	(90) +1	(40) -1	(40) -1
6	(90) +1	(40) -1	(80) +1
7	(90) +1	(80) +1	(40) -1
8	(90) +1	(80) +1	(80) +1
9	(60) 0	(60) 0	(60) 0
10	(60) 0	(60) 0	(60) 0
11	(60) 0	(60) 0	(60) 0

Para as extrações com solvente acetona, as combinações foram as mesmas das Tabelas 4 e 5, nas quais geraram o mesmo número de extratos e ensaios. Para interpretar as Tabelas, substituir apenas a palavra etanol pela palavra acetona.

Os CFT (Y_1), atividade antioxidante sobre o DPPH (Y_2), atividade antioxidante sobre o ABTS (Y_3), e atividade antioxidante sobre o FRAP (Y_4), foram as variáveis dependentes analisadas para todos os PFC's. Os coeficientes do modelo matemático linear (Equação 1) das respostas ($Y = Y_1, Y_2, Y_3$ ou Y_4) das variáveis independentes tempo (x_1 ; 30, 60 ou 90 minutos), temperatura (x_2 ; 40, 60 ou 80 °C) e concentração do solvente (x_3 ; 40, 60 ou 80%) foram:

Equação 1

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

Aonde β_0 é o coeficiente médio, β_1 (tempo), β_2 (temperatura) e β_3 (concentração do solvente); os coeficientes β_{12} (tempo x temperatura), β_{13} (tempo x concentração do solvente), e β_{23} (temperatura x concentração do solvente), são os coeficientes lineares de interação.

Os dados dos planejamentos fatoriais de extração foram apresentados como média \pm desvio padrão. As variáveis dependentes foram analisadas utilizando o software Action Stat 3.4. As diferenças significativas foram avaliadas ao nível de 95% de intervalo de confiança ($p < 0,05$), examinados por ANOVA.

4.3 PREPARO DOS EXTRATOS DOS PLANEJAMENTOS DE MISTURA DE SOLVENTES SIMPLEX-LATTICE (PSL)

Os extratos foram produzidos pesando-se 2,5 gramas de cada amostra, para tubo de ensaio com tampa rosqueável, adicionados de 25 mL das diferentes combinações dos solventes água, etanol e acetona, obedecendo-se a matriz do PSL (Tabela 6), com proporções representadas graficamente (Figura 12), medidos em balão volumétrico, submetidos ao tempo de extração e temperatura, de 180 minutos e 80 °C, respectivamente, conforme condições ótimas definidas pelas conclusões descritas nos itens 5.3 e 5.4.

Tabela 6. Matriz do planejamento de mistura de solventes Simplex-Lattice (PSL) de grau três.

Ensaio	Composição do solvente extrator*		
	Água destilada	Etanol	Acetona
1	0	0	1
2	0	1	0
3	1	0	0
4	0	2/3	1/3
5	2/3	0	1/3
6	2/3	1/3	0
7	0	1/3	2/3
8	1/3	0	2/3
9	1/3	2/3	0
10	1/3	1/3	1/3
11	1/6	1/6	2/3
12	1/6	2/3	1/6
13	2/3	1/6	1/6

*Equivalente a proporção (%) com somatório final entre os diferentes solventes igual a 1.

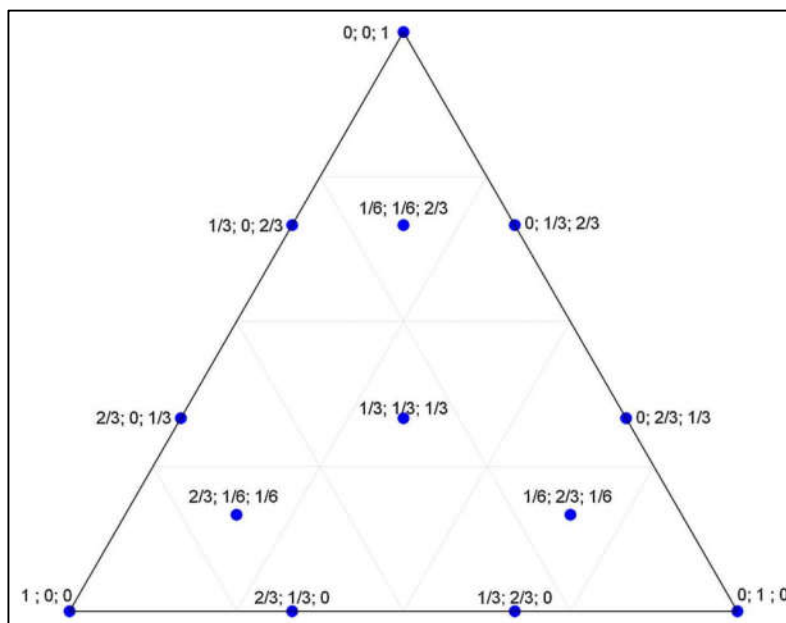


Figura 12. Pontos de mistura de um planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL).

Fonte: Baj *et al.* (2018).

Após a conclusão do preparo, os extratos foram filtrados, avolumados novamente para 25 mL, e armazenados a 4 °C (Figura 13). A massa pesada de Bd foi corrigida para (b.s), com base na determinação da umidade das amostras (Tabela 1), conforme metodologia descrita no item 4.5.1, realizadas na semana da produção dos extratos (CASAGRANDE, 2014).

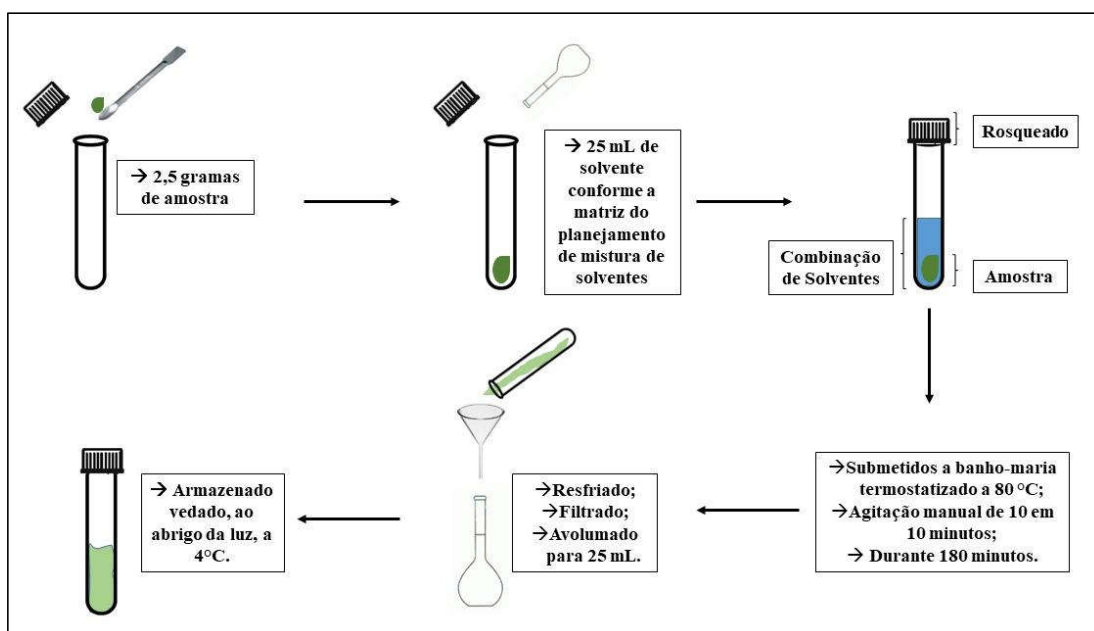


Figura 13. Fluxograma genérico de produção dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) pelas diferentes proporções entre os solventes água, etanol e acetona, para extração de compostos bioativos, através do planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL).

Fonte: Da Autora, (2018).

O PSL de três componentes (água, etanol e acetona), consistiu da produção de 13 extratos diferentes, aonde um deles era o ponto central. Totalizando 26 extrações devido a replicata genuína, e 26 ensaios para cada variável dependente avaliada. A amostra utilizada foi a A2 (Liofilizada), conforme resultados de estudo descrito no item 5.1. Os CFT (Y_1), atividade antioxidante sobre DPPH (Y_2), atividade antioxidante sobre ABTS (Y_3), e atividade antioxidante relativo ao FRAP (Y_4), foram as variáveis dependentes avaliadas pelo PSL. Os coeficientes do modelo matemático quadrático (Equação 2) para as respostas ($Y = Y_1, Y_2, Y_3$ ou Y_4), das variáveis independentes água destilada (x_1), etanol (x_2), e acetona (x_3), foram expressos conforme o modelo abaixo:

Equação 2

$$Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

Aonde β_1 é o coeficiente (água destilada), β_2 (etanol) e β_3 (acetona) e os coeficientes β_{12} (água destilada x etanol), β_{13} (água destilada x acetona) e β_{23} (etanol x acetona), são os coeficientes de interação.

Os dados do PSL foram apresentados como média \pm desvio padrão. As variáveis dependentes foram analisadas utilizando o software *Statistica* 8.0. As diferenças significativas foram avaliadas ao nível de 95% de intervalo de confiança ($p < 0,05$), examinados por ANOVA. Também foram traçados perfil de desejabilidade do PSL, sendo esta otimização realizada de forma simultânea sobre as variáveis respostas.

4.4 METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE UM PRODUTO LIOFILIZADO A PARTIR DAS OTIMIZAÇÕES DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Baccharis dracunculifolia* (Bd)

Para a produção do produto liofilizado de Bd (PL-Bd), após estudos prévios realizados, realizaram-se pequenos estudos adicionais, com um relativo a avaliação de diferenciados tempos de extração e outro relativo a saturação de 25 mL de volume final do solvente utilizado.

4.4.1 Diferentes tempos de extração de compostos bioativos a partir de *Baccharis dracunculifolia* (Bd)

Fixaram-se as condições, definidas pelo PFC 2³, que utilizou solvente etanol como extrator de compostos bioativos de Bd (conforme conclusões do item 5.3): temperatura 80 °C, 1 grama de Bd, amostra A2 (liofilizada), e 25 mL do solvente etanol 40%. Variando-se os tempos de extração em banho-maria termostatizado de: 1, 3, 6, 9 e 12 h. As variáveis respostas avaliadas foram: atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) e CFT. Geraram-se ao todo 10 extratos em função da replicata genuína, e 10 ensaios para cada variável resposta.

4.4.2 Saturação do solvente extrator de compostos bioativos a partir de *Baccharis dracunculifolia* (Bd)

Fixaram-se as condições definidas pela avaliação dos dados obtidos em 5.3, e pelas conclusões obtidas pelas análises dos dados do item anterior a este (4.4.1): temperatura 80

°C, por 180 minutos de tempo de extração, e 25 mL de solvente etanol 40%. Variando-se as massas medidas de Bd, conforme as concentrações: 40, 60, 80, 100 e 120 mg mL⁻¹. Assim como nas extrações anteriores, esta também foi realizada em banho-maria termostatizado. As variáveis respostas avaliadas foram: atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) e CFT. Geraram-se ao todo 10 extratos em função da replicata genuína de extração, e 10 ensaios para cada variável resposta.

4.4.3 Metodologia de produção do produto liofilizado a partir de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd)

Após os estudos de otimização da extração de compostos bioativos de Bd, foram definidas as condições para gerar o PL-Bd: tempo de extração, temperatura de extração, preparo de amostra, solvente para extração, concentração do solvente de extração, e saturação do solvente utilizado (Figura 14).

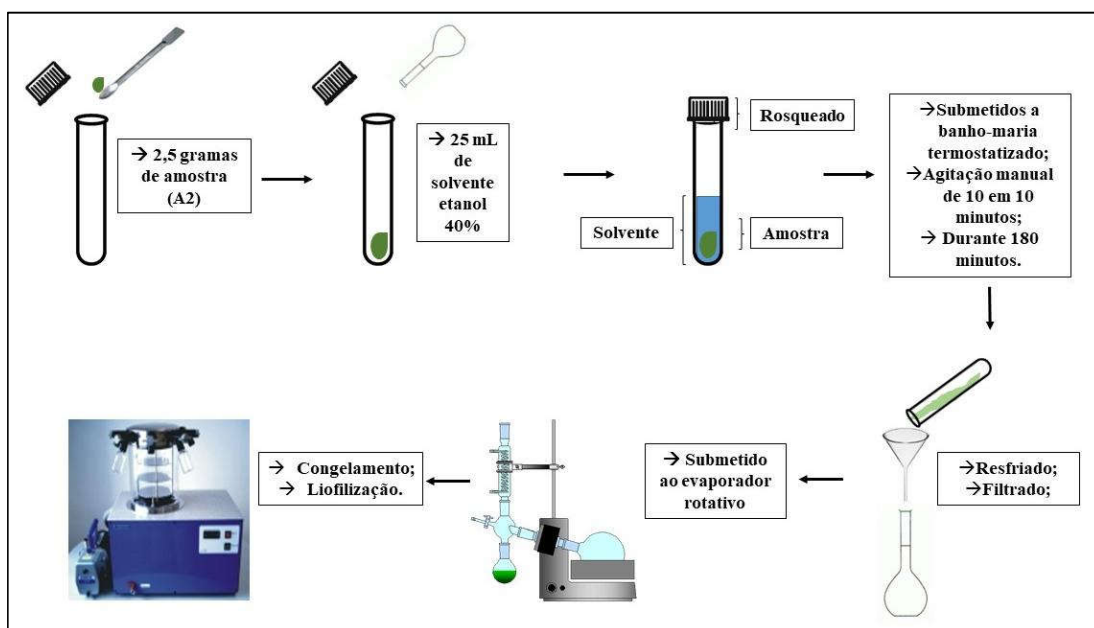


Figura 14. Metodologia de produção do produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd) a partir de experimentos de otimização de extração de compostos bioativos da planta.

Fonte: Da Autora, (2018).

Tais condições foram definidas com objetivo de continuar avaliando o PL-Bd, o qual pode servir de material constituinte para uma formulação: alimentícia, farmacêutica e/ou cosmética. Do PL-Bd foram avaliados: atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), CFT, CE₅₀, atividade antimicrobiana (CIM e CBM) e a identificação e quantificação de alguns compostos fenólicos por CLAE-UV.

4.5 METODOLOGIAS DE ANÁLISE

4.5.1 Metodologia de análise de teor de umidade

As análises de umidade (perda por dessecação) das amostras (Bd *in natura*, A1, A2, A3, PL-Bd e filmes ativos – PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), foram realizadas conforme o método número 012/IV, descrito nos métodos físico-químicos para análise de alimentos. Aproximadamente 2,0 g (Pa – Peso da amostra) de amostra foram pesadas em cadinhos previamente secos em estufa, resfriados e medida a sua massa (Pc – Peso do cadinho seco sem amostra), sendo submetidos novamente à estufa a 105 °C até peso constante (Pd – Peso do cadinho após secagem em estufa com a amostra). O percentual de umidade (%U) foi obtido pela equação 3 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Equação 3

$$\%U = \left\{ \frac{(Pc + Pa) - Pd}{Pa} \right\} . 100$$

4.5.2 Metodologias de análises de atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) e compostos fenólicos totais (CFT)

Seguem abaixo as descrições das metodologias utilizadas para a realização das análises das 4 variáveis dependentes (DPPH, ABTS, FRAP e CFT) avaliadas, dos extratos produzidos a partir de A1, A2 e A3, oriundos dos PFC's (2² e 2³), e dos extratos do PSL produzidos a partir de A2. Para análise de otimização dos extratos para produção do PL-Bd, bem como, do PL-Bd, utilizaram-se as metodologias de DPPH, ABTS, FRAP e CFT.

4.5.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais (CFT) *in vitro*

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton; Orthofer e Lamuela (1999), utilizando-se ácido gálico como padrão de referência. Para a realização da análise foi transferida uma alíquota de 500 µL (microlitros) de cada amostra avaliada, nas diluições cabíveis, 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada 1:10 (v/v) para um tubo de ensaio. Após 5 minutos foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 4% (m/v), seguido por homogeneização dos tubos de ensaio contendo as amostras. As soluções foram encubadas ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Realizaram-se as leituras

das absorbâncias após 2 h de reação, em espectrofotômetro a 740 nanômetros (nm) (Espectrofotômetro marca Spectrum, modelo SP 2000 UV). Foram conduzidas amostras em branco nas mesmas condições de análise, contendo água destilada ao invés de amostra. A curva analítica foi construída no intervalo das concentrações de 0,24 a 6,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico, com os resultados expressos em miligramas de EAG (equivalente ao ácido gálico) por grama de amostra (mg EAG g^{-1}) (b.s). Os resultados foram expressos através da equação da reta da curva analítica de ácido gálico ($y = 0,024x - 0,002/R^2 = 99,99\%$). Uma amostra em branco foi utilizada para zerar o espectrofotômetro.

4.5.2.2 Análise da atividade antioxidante *in vitro* pelo método da captura do radical DPPH

A atividade antioxidante sobre o radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações por Mensor *et al.* (2001). A solução de DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) foi preparada a 0,6 mM (milimolar) em solvente etanol. Para a realização da análise foram transferidas alíquotas de 500 μL de cada amostra avaliada, nas diluições cabíveis, seguido da adição de 3 mL de etanol P.A., e 300 μL da solução do radical DPPH. Uma amostra controle também foi conduzida, sendo composta por 300 μL da solução de radical DPPH, adicionados de 3,5 mL de etanol P.A. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 30 minutos de reação, em espectrofotômetro a 517 nm. O espectrofotômetro foi zerado com etanol P.A. Foram realizadas análises de DPPH expressas em micro mol de trolox por grama de amostra ($\mu\text{Mol Trolox g}^{-1}$) (b.s), através da construção da curva de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), no intervalo das concentrações de 10 a 100 μM de trolox ($y = -6,184x + 0,535/R^2 = 99,99\%$).

4.5.2.3 Análise de atividade antioxidante total *in vitro* pelo método de redução do ferro (FRAP)

Para a determinação da atividade antioxidante, por meio da redução do ferro (FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*), foram utilizadas as metodologias descritas por Rufino *et al.* (2006) e Kukic *et al.* (2008). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl_3 (Cloroeto férrico, 20 mM) em solução aquosa. Para a realização da análise, uma alíquota de 90 μL de cada amostra avaliada, nas diluições cabíveis, foi adicionada a tubos de ensaio. Em seguida acrescentaram-

se 270 µL de água destilada e 3 mL do reagente FRAP. Os tubos de ensaio foram incubados a 37 °C em banho-maria por 30 minutos. O espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. As leituras foram realizadas em absorbância a 593 nm de comprimento de onda. A curva de calibração foi construída através da utilização da solução de sulfato ferroso (FeSO₄), no intervalo das concentrações de 100 a 2000 µM. Os resultados foram expressos em micro mols de ferro (II) por grama de amostra (µMol Fe²⁺ g⁻¹) (b.s), através da equação de reta da curva padrão ($y = 7,220x - 0,002 / R^2 = 99,99\%$).

4.5.2.4 Análise de atividade antioxidante *in vitro* pelo método da captura do radical ABTS

A atividade antioxidante pelo método da captura do ABTS^{•+} foi realizada conforme metodologias descritas por Re *et al.* (1999) e Rufino *et al.* (2007a). O cátion radical ABTS foi formado pela reação da solução ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico)) a 7 mM, com persulfato de potássio (K₂SO₄) 140 mM, incubados à temperatura de 25 °C ao abrigo da luz, durante 16 h. Posteriormente, fez-se a diluição em etanol absoluto até obtenção do valor de absorbância de 0,700 a 734 nm. Para a realização da análise, uma alíquota de 30 µL de cada amostra avaliada, nas diluições cabíveis, foi transferida para tubos de ensaios. Em todos os tubos foram adicionados 3 mL de solução de ABTS^{•+}. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 6 minutos de reação em espectrofotômetro a 734 nm. O espectrofotômetro foi zerado com etanol P.A. A curva analítica foi construída no intervalo das concentrações de 50 a 1500 µM de trolox, com resultados expressos em µM de trolox por grama de amostra (µMol TEAC g⁻¹) (b.s), calculados a partir da equação da reta da curva analítica de trolox ($y = -9,940 + 0,679 / R^2 = 99,99\%$).

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NAS AVALIAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Baccharis dracunculifolia* (Bd) EM SEUS PONTOS ÓTIMOS DE EXTRAÇÃO (PFC's E PSL) E PARA O PRODUTO LIOFILIZADO DE Bd (PL-Bd)

Seguem as descrições das metodologias utilizadas para as avaliações dos extratos nos pontos ótimos de extração, definidas pelos planejamentos: fatoriais completos (2² e 2³), e de misturas (PSL). As mesmas metodologias também foram utilizadas para a avaliação do PL-Bd.

4.6.1 Análise da atividade antioxidante *in vitro* expressa em CE₅₀

A análise foi conduzida conforme metodologia do item 4.5.2.2, mas com expressão dos dados em CE₅₀. Diferentes concentrações de uma mesma amostra, em diluições cabíveis para análise, foram avaliadas quanto a atividade antioxidante relativa ao DPPH. O percentual de atividade antioxidante (%AA) foi expresso conforme a equação 4. Para a obtenção dos valores de CE₅₀ utilizou-se de cálculo de regressão linear, com o eixo das abscissas (x) representando as diferentes concentrações em µg mL⁻¹ de cada amostra avaliada, e o eixo das ordenadas (y), o valor do percentual de atividade antioxidante médio das triplicatas, de cada concentração avaliada (no instante da estabilização da reação). Através da equação da reta linearizada foram obtidos os valores de CE₅₀ em µg mL⁻¹ (b.s), fazendo-se a substituição de (y) por 50.

Equação 4

$$\%AA = \left\{ \frac{[(Abs amostra - Abs branco) \cdot 100]}{Abs amostra controle} \right\}$$

Em que: Abs amostra (absorbância da amostra), Abs branco (absorbância da amostra em branco) e Abs controle (absorbância da amostra controle, com utilização de etanol como alíquota da amostra).

4.6.2 Teste de atividade antimicrobiana

Foram utilizadas cinco bactérias nos bioensaios, sendo duas espécies Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (ATCC, do inglês: *American type culture collection*) e *Bacillus cereus* (ATCC 14579), e três Gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). As bactérias foram mantidas em ágar Mueller Hinton, estocadas a 4 °C e repicadas a cada 2 semanas.

4.6.2.1 Método da microdiluição em caldo: concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

As análises de atividade antimicrobiana dos extratos de Bd, obtidas nas condições ótimas de extração de Bd (PFC's e PSL) e do PL-Bd, foram determinadas conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines*, descritas pelo documento CLSI (M07-A10) (CLSI, do inglês: *Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines*) (CLSI, 2015), com

algumas modificações. Os solventes extratores foram evaporados utilizando-se evaporador rotativo, visando eliminar possível influência do solvente nos resultados de CIM e CBM, e novamente avolumados para 25 mL com água destilada. Microplacas de 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H) foram utilizadas. Foram adicionados ao primeiro poço de cada linha 200 µL de cada amostra, na concentração inicial de 102,00 mg mL⁻¹ e 95,35 mg mL⁻¹, para as condições ótimas de extração de Bd (PFC's e PSL) e do PL-Bd, respectivamente. Todos os poços receberam 100 µL do caldo Mueller Hinton, exceto o primeiro. A partir do segundo poço realizou-se a diluição seriada de 1:1, progressivamente, das amostras, até a coluna 12 para cada amostra testada. Adicionaram-se 5 µL de cada suspensão bacteriana, a cada poço de diferente diluição de cada amostra. As suspensões bacterianas foram corrigidas para o valor de 0,08 a 0,10 de absorbância a 625 nm [Escala McFarland, equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹]. Os antibióticos ampicilina e gentamicina foram utilizados como controle positivo nas concentrações entre 50,00 e 0,05 µg mL⁻¹. As microplacas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C, e posteriormente 20 µL do reagente cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, a 0,5% em água (m/v), foi adicionado a cada poço. Incubaram-se novamente durante 1 h as placas a 35 ± 2 °C. A CIM foi determinada fazendo-se a leitura da concentração menor existente dentre as testadas em que havia ausência de formação de um ponto vermelho no fundo da microplaca. De cada poço determinado em CIM, 10 µL do líquido contido neste poço, foram inoculados em placa de petri contendo ágar Mueller Hinton, incubados a 35 ± 2 °C, durante 24 h, fazendo-se a contagem do número de colônias presentes na placa do micro-organismo testado (CBM) (KARAMAN, 2003). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

4.6.3 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (CLAE-UV)

Os perfis cromatográficos dos pontos ótimos de extração de Bd (PFC's e PSL) e do PL-Bd foram analisados por CLAE-UV e realizadas em equipamento (HP – 1100), em coluna Lichrospher RP18 (5 µm) (250 mm X 4 mm), equipado com detector UV (210 nm) e sistema quaternário de bombas (HP – 1100 Series). A análise em fase reversa foi constituída de: solvente A (água Milli-Q com 1% de ácido fosfórico) e solvente B (Acetonitrila). O sistema de bombeamento de amostra foi gradiente: 90% (A) de 0 a 5 minutos, 60% (A) de 5 a 40 minutos, 90% (A) até 42 minutos. O fluxo padrão foi mantido a 0,5 mL minutos⁻¹. As amostras foram filtradas em membranas de Nylon (0,45 µm). Os compostos foram identificados conforme a sua ordem de eluição e por comparação de seu

tempo de retenção com aqueles de seus padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, através da correlação da área (mAU*S) do pico do composto com a área da curva padrão realizada em cada padrão avaliado. Os padrões avaliados foram: ácido ferúlico, catequina, epicatequina, epigalocatequina, epigalocatequina galato, hesperidina, miricetina, quercetina, rutina e vitexina. Para o PL-Bd, além dos padrões anteriores, foram avaliados também: apigenina e canferol. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de amostra avaliada, todos expressos em (b.s).

4.7 METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE UM FILME ATIVO CONTENDO PRODUTO LIOFILIZADO DE *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd)

Com intuito de testar previamente uma possível aplicação para o PL-Bd, obtido a partir dos estudos de otimização de extração de compostos bioativos de Bd, foi desenvolvido um filme, produzido pela metodologia de *casting*, adicionado de PL-Bd, como meio de estudo da migração dos compostos contidos no PL-Bd para diferentes simulantes de bases alimentares. Foram desenvolvidas três formulações, uma contendo concentração de 1,0% de produto liofilizado de Bd (PL-Bd 1,0%), uma segunda contendo 1,5% de produto liofilizado de Bd (PL-Bd 1,5%), e uma terceira formulação controle, com 0% de produto liofilizado de Bd (PL-Bd 0%).

As formulações consistiram na utilização de dois polímeros biodegradáveis: poli(vinil álcool) (PVA) (Selvol 325, grau de hidrólise de 98,42% - Sekisui, Japão) e o amido de mandioca (Yoki, Brasil). O glicerol (Dinâmica, Brasil) foi utilizado como plastificante. Os filmes foram preparados conforme Araújo *et al.* (2015), com modificações. O PVA e o amido de mandioca foram solubilizados em água (4%) (m/v), sob agitação constante em agitador magnético (QUIMIS, 6261-22), adotando-se aquecimento gradativo até atingir as temperaturas de $95 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $85 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Estes permaneceram nestas temperaturas e em agitação constante por 30 minutos. O glicerol foi adicionado na proporção de 20 g por 100 g de polímeros. Após o completo resfriamento das soluções filmogênicas, as mesmas foram combinadas em proporções adequadas, fazendo-se a adição do PL-Bd, conforme consta na Tabela 7. O percentual de Bd adicionado foi subtraído proporcionalmente do total dos outros componentes presentes na blenda, de forma a obter uma concentração final de 4% de polímeros. Por fim, as três formulações foram dispostas

em placas de acrílico retangulares (10 x 20 cm = 200 cm²), contendo aproximadamente 80 mL de solução filmogênica, e submetidas a estufa de secagem a 45 °C, durante 24 h.

Tabela 7. Formulação dos filmes ativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) contendo produto liofilizado de Bd (PL-Bd) em diferentes proporções (m/v).

Componentes	PL-Bd 0%	PL-Bd 1,0%	PL-Bd 1,5%
PVA	2	1,5	1,25
Amido de Mandioca	2	1,5	1,25
Glicerol	0,8	0,6	0,5
PL-Bd	0	1	1,5

PVA: poli(vinil álcool); PL-Bd 0%: formulação controle; PL-Bd 1,0%: formulação contendo 1,0% de PL-Bd; PL-Bd 1,5%: formulação contendo 1,5% de PL-Bd.

Após o preparo dos filmes, os mesmos foram avaliados quanto a: migração de compostos com atividade antioxidante para diferentes simulantes de bases alimentares (%AA), em tempos variáveis, atividade antioxidante (DPPH), CFT, atividade antimicrobiana (método do disco difusão – Kirby Bauer), espessura, tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (E), módulo de Young (MY), opacidade aparente (Op), diferença de cor (ΔE^*) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS

4.8.1 Umidade dos filmes ativos

No dia da realização da análise de migração de compostos bioativos, dos filmes ativos (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), foram realizadas análises de umidade, conforme o item 4.5.1 deste documento. Esta avaliação foi utilizada para expressar os dados em (b.s).

4.8.2 Espessura dos filmes ativos

As espessuras dos filmes (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), foram obtidas por um micrômetro digital (resolução 0,001 mm, Zaus Precision), realizadas pela média de dez medições aleatórias nos filmes.

4.8.3 Propriedades mecânicas dos filmes ativos

As propriedades mecânicas dos filmes (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), foram realizadas em aparelho texturômetro (Stable micro systems, modelo TAXT plus, Inglaterra), conforme ASTM (ASTM, do inglês: *American society for testing and material*) (ASTM D882-02, 2002), com adaptações. Todas as medidas foram realizadas em dez replicatas. Inicialmente os filmes, de dimensões 10 x 60 mm, foram condicionados sob 53% de umidade relativa durante 48 h, a 25 °C. As amostras foram posicionadas entre as duas garras do equipamento, com distância de 30 mm, e procedido o tracionamento com velocidade de 0,8 m s⁻¹.

O módulo de Young (MY) foi determinado a partir da região linear da curva de tração versus deformação, e expresso conforme equação 5:

Equação 5

$$MY = \left(\frac{Fx}{(e.L)} \right) \cdot \left(\frac{DG}{Ax} \right)$$

Na qual: MY (Módulo de Young – mega Pascal – MPa), Fx (Força registrada no ponto x, na região linear – Newton), e (Espessura média do filme – metro), L (Largura inicial do filme – metro), DG (Distância inicial entre as garras – metro), e Ax : (Alongamento no ponto x – metros).

A tensão na ruptura (TR) é a razão entre a força necessária para romper o filme, e a área transversal inicial da amostra, sendo expressa conforme a equação 6:

Equação 6

$$TR = \frac{Fmáx}{A}$$

Na qual: TR (Tensão na ruptura – MPa), $Fmáx$ (Força máxima – Newton), e A (Área transversal do filme – metro quadrado).

A alongação na ruptura (E) é a razão entre os comprimentos finais e iniciais dos filmes, sendo expressa e percentual, conforme a equação 7:

Equação 7

$$E = \left(\frac{At}{DG} \right) \cdot 100$$

Na qual: At (Alongamento total do filme – metro), e DG (Distância inicial entre as garras – metro).

4.8.4 Opacidade aparente (Op) e diferença de cor (ΔE^*) dos filmes ativos

As propriedades ópticas dos filmes (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), foram avaliadas utilizando-se o equipamento colorímetro (Byk Gardner, Alemanha), conforme Maria *et al.* (2008). As operações foram realizadas com iluminante D65, e ângulo visual de 10°. Foram realizadas 5 replicatas de cada amostra.

A opacidade aparente (Op) é a razão entre a opacidade dos filmes sobre padrão preto (L^*p) e a opacidade dos filmes sobre o padrão branco (L^*b), sendo expressa em percentual, conforme a equação 8:

Equação 8

$$Op = \left(\frac{L^*p}{L^*b} \right) \cdot 100$$

Para a análise de diferença de cor (ΔE^*), utilizou-se o padrão branco como referência (L^* : 94,31, a^* : -1,52, b^* : -0,63). Determinaram-se os parâmetros ΔL^* (Luminosidade: diferença de cor entre o padrão puro e a leitura da amostra sobre o padrão puro, da cor branca – variando de zero, preto puro, a 100, branco puro), Δa^* (Componente vermelho-positivo/verde-negativo: diferença de cor entre o padrão puro e a leitura da amostra sobre o padrão puro, da cor branca), e Δb^* (Componente amarelo-positivo/azul-negativo: diferença de cor entre o padrão puro e a leitura da amostra sobre o padrão puro, da cor branca). A diferença de cor foi calculada então conforme equação 9:

Equação 9

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5}$$

4.8.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes ativos

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), dos filmes ativos (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), foram realizadas em equipamento microscópio eletrônico de varredura (Philips, modelo FEI Quanta 200, EUA). Inicialmente os filmes permaneceram durante 7 dias em dessecador com cloreto de cálcio ($CaCl_2$), para a remoção de umidade. Posteriormente, fraturaram-se em nitrogênio líquido os filmes e foram fixados em suportes de alumínio, resvestindo-os em película de ouro (Sputter Coater Balzers SCD-050, Baltec, Austria) (40-50 micrômetros), a 25 °C, em 2.105 Torricelli, durante 180 segundos. A magnitude da observação da fratura foi definida em 1600 vezes de ampliação.

4.8.6 Migração de componentes bioativos dos filmes ativos para diferentes simulantes de bases alimentícias

Com objetivo de verificar a existência, a quantidade total e a migração, dos compostos bioativos, dos filmes ativos (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%) foram realizadas análises de atividade antioxidante pelo método do DPPH, conforme item 4.5.2.2 deste documento, a partir dos filmes ativos em contato com diferentes solventes. Inicialmente os filmes foram cortados em formatos aproximados de 0,5 x 0,5 cm. Pesaram-se aproximadamente 0,7 gramas de cada filme em erlenmeyer de 125 mL e esta massa foi corrigida para b.s. A migração dos compostos presentes no PL-Bd, inicialmente extraídos da planta Bd por meio de metodologia previamente padronizada por este estudo, e adicionados aos filmes, foi avaliada durante os tempos: 90, 180, 360, 540 e 1500 minutos. Nestes instantes, retirava-se uma alíquota de 10 µL de cada amostra, realizando-se diluição cabível. As análises de migração dos componentes bioativos foram realizadas em duplicata de cada formulação de filme ativo, para cada solvente, no volume final de 25 mL dos solventes: água destilada, ácido acético 3% (v/v), etanol 10% (v/v), e etanol 50% (v/v). Os solventes foram escolhidos, com adaptações da norma, em consulta ao regulamento da União Europeia (EU 10/2011), o qual orienta a utilização de solventes de diferentes características como simulantes para migração de componentes através de embalagens alimentares para diferentes bases alimentares. Os testes foram realizados em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Os dados foram expressos em percentual de atividade antioxidante (%AA), conforme equação 4 e foram plotados em um gráfico de dispersão (x,y – tempo, %AA).

4.8.7 Análise da atividade antioxidante *in vitro* pelo método do radical DPPH e análise de compostos fenólicos totais *in vitro* dos filmes ativos

Ao final de 1500 minutos (aproximadamente 25 h de contato entre os filmes ativos e os solventes de teste), foram realizadas das soluções [água destilada, ácido acético 3% (v/v), etanol 10% (v/v), e etanol 50% (v/v)] contendo os filmes ativos (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), análises de atividade antioxidante pelo método da captura do radical DPPH e CFT, conforme metodologias constantes nos itens 4.5.2.2 e 4.5.2.1, respectivamente. Os resultados de DPPH e de CFT foram expressos em µmol Trolox e mg EAG, por grama de filme (b.s), respectivamente.

4.8.8 Análise de atividade antimicrobiana pelo método do disco de difusão dos filmes ativos

As análises de atividade antimicrobiana, pelo método de disco de difusão (Kirby Bauer), foram realizadas conforme Kun e Marossy (2013) e Araújo *et al.* (2015), com algumas modificações, contra o micro-organismo gram-positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e gram-negativos, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). As bactérias foram mantidas em ágar Muller Hinton, estocadas a 4 °C e repicadas a cada 2 semanas. Os micro-organismos foram mantidos em caldo Muller Hinton, na temperatura de 35 ± 2 °C, durante 24 h. Posteriormente, a concentração de cada um deles foi ajustada para conter 10^8 UFC mL⁻¹, equivalente ao valor de 0,08 a 0,10 de absorbância a 625 nm (Escala McFarland). Foram preparadas placas petri com ágar Muller Hinton. Adicionaram-se 100 µL da suspensão de cada micro-organismo a 10 mL de ágar soft (0,8% de ágar Mueller Hinton), sendo a adição realizada na temperatura de 39 °C. Esta mistura foi transferida para as placas de petri contendo ágar Mueller Hinton previamente preparadas (ESWARANANDAM *et al.*, 2004). Posteriormente, discos de 6 mm das amostras dos filmes ativos (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), em triplicata para cada micro-organismo, foram adicionados às placas. Foram inoculados micro-organismos nas mesmas condições de análises em placas contendo discos do antibiótico gentamicina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, na temperatura de 35 ± 2 °C, durante 24 h. Posteriormente, com auxílio de um paquímetro digital (resolução 0,01 mm, Zaas Precision), foram realizadas medidas do halo de inibição microbiana formado pelos filmes ativos.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As diferenças significativas foram avaliadas ao nível de 95% de intervalo de confiança ($p < 0,05$), examinadas por ANOVA e teste de Tukey como teste de separação de médias, através do software Action Stat 3.4. A análise de correlação de Pearson foi realizada utilizando o software Genes ($p < 0,05$) (CRUZ, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLANEJAMENTOS FATORIAIS DE EXTRAÇÃO COMPLETOS (PFC's) (2² e 2³)

5.1.1 Efeito dos parâmetros de extração sobre as respostas de compostos fenólicos totais (CFT)

Os resultados de CFT, nos diferentes extratos preparados, variaram de 19,81 até 29,90, de 21,20 até 35,08 e de 22,09 até 37,22, mg EAG g⁻¹ (b.s), nos solventes água, etanol e acetona, respectivamente (Tabela 8).

Analisando todos os PFC's, a quantificação de CFT foi dependente do solvente utilizado, conforme a relação: acetona > etanol > água, corroborando com Martinez-Correa *et al.* (2012) que obtiveram quantificações de CFT em Bd, de 132 e 142 mg g⁻¹ em solvente água e, de 176 e 197 mg g⁻¹ em solvente etanol, em mistura de folhas jovens e adultas e em apenas folhas jovens, respectivamente, sendo maior quando se utilizava etanol como solvente, comparado ao uso de água, e semelhantes a Mokrani e Madani (2016) aonde estabeleceu-se a relação acetona > metanol > etanol = água (60% - solvente/água), em quantificações de CFT de pêssego. Mello e Hubinger (2012) analisaram amostras de própolis verde brasileira em diferentes pH's, obtendo-se variações de 35,48 a 45,41 mg EAG g⁻¹ e 49,80 a 100,59 mg EAG g⁻¹, em solvente aquoso e etanólico (80%), respectivamente. A maior extração de CFT também pode estar ligada a natureza e grau de polaridade dos solventes extratores envolvidos, sendo que para Garmus *et al.* (2015), o solvente etanol, em comparação a água concentrou mais compostos fenólicos, em amostras de alecrim-pimenta, demonstrando que este solvente teve maior afinidade para as substâncias de interesse para a amostra analisada, assim como no presente estudo.

Tabela 8. Respostas do estudo de extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) utilizando água, etanol ou acetona como solventes.

Cortida	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ SOLVENTE ÁGUA														
	Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes A1			Variáveis Dependentes A2			Variáveis Dependentes A3					
	x ₁	x ₂	x ₃	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
1	-1	-1	-	19,81±0,47	64,68±1,69	322,97±3,19	166,30±4,75	20,68±0,14	113,39±16,21	308,62±0,88	181,46±8,89	20,70±1,28	75,37±9,76	366,99±18,20	145,65±2,71
2	-1	1	-	24,99±1,12	108,41±4,19	436,13±18,88	202,44±12,01	27,97±0,05	145,70±4,84	470,59±0,46	231,05±15,59	25,54±1,91	125,25±7,27	511,11±39,11	178,38±13,57
3	1	-1	-	19,95±0,44	142,70±30,26	330,03±9,37	176,46±1,57	20,94±0,17	104,40±10,41	319,81±24,60	203,58±20,57	20,05±0,03	78,60±8,14	351,17±11,85	140,26±2,52
4	1	1	-	27,28±0,14	116,95±10,09	474,17±1,45	215,37±10,18	29,90±0,31	141,30±19,70	516,96±4,93	267,60±3,74	27,89±0,62	142,37±4,96	568,82±3,17	201,51±3,02
5	0	0	-	21,53±0,01	100,30±8,14	360,37±19,50	189,24±4,56	22,88±1,93	106,52±4,46	354,66±30,94	211,09±25,46	25,49±1,55	114,18±1,42	479,75±20,16	176,47±2,49
6	0	0	-	23,77±1,40	88,60±9,18	386,86±8,01	200,64±2,20	23,87±0,11	113,72±7,55	370,90±3,17	209,00±25,46	23,95±1,10	111,08±1,69	460,25±23,38	170,48±8,35
7	0	0	-	23,48±0,87	92,98±6,12	389,73±2,53	201,60±12,15	23,52±0,92	116,39±4,47	368,81±15,58	229,06±18,80	24,42±0,94	151,44±1,06	474,21±18,90	176,37±10,07
PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ SOLVENTE ETANOL															
Cortida	Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes A1			Variáveis Dependentes A2			Variáveis Dependentes A3					
	x ₁	x ₂	x ₃	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
	1	-1	-1	23,41±0,21	76,05±7,94	340,55±13,00	193,76±19,67	26,08±0,58	101,47±6,97	367,75±28,50	222,45±11,62	22,24±2,33	87,90±6,76	371,39±53,37	172,22±21,40
2	-1	1	21,20±0,14	86,57±2,25	379,16±13,31	196,49±1,39	21,69±0,17	97,23±1,26	346,47±20,68	212,97±6,74	22,59±0,15	105,20±3,46	472,76±18,96	167,03±17,25	
3	1	-1	31,31±0,24	156,78±5,68	537,70±11,53	265,88±9,49	34,08±0,24	174,75±10,33	574,08±25,79	320,00±8,19	33,08±1,40	161,81±4,60	688,55±26,46	267,61±6,44	
4	1	1	27,24±0,04	119,69±3,57	493,37±1,35	253,40±32,21	26,82±0,24	139,41±8,84	478,55±23,68	277,58±14,04	26,32±0,40	131,64±0,06	563,33±20,84	190,73±0,37	
5	0	0	23,11±1,66	86,13±8,56	332,60±50,46	221,58±25,20	22,93±2,05	108,56±1,69	359,93±4,07	259,45±8,97	24,32±1,28	96,78±10,51	399,05±16,01	195,41±18,21	
6	0	0	24,13±0,59	110,70±5,87	450,63±1,63	233,07±9,63	24,62±0,25	113,98±3,85	424,64±0,59	239,67±6,20	25,67±0,98	102,54±0,22	551,16±14,70	193,68±7,06	
7	1	1	32,56±3,04	175,47±19,53	581,05±57,79	295,07±54,90	35,08±1,11	185,23±1,32	675,25±101,9	341,54±6,17	34,47±0,89	173,41±4,19	704,56±21,23	228,33±18,06	
8	1	1	28,53±0,78	151,99±11,04	550,48±6,11	234,62±8,93	30,87±0,83	162,06±5,07	554,82±24,76	306,05±8,99	30,03±0,58	148,67±1,01	640,77±20,17	246,48±18,26	
9	0	0	29,49±0,55	125,46±12,82	549,12±13,29	235,85±18,92	33,10±0,94	177,41±14,89	573,57±28,78	292,11±10,75	31,65±0,33	150,88±7,76	638,78±9,78	221,85±32,75	
10	0	0	30,44±1,17	141,27±6,90	512,79±27,67	243,43±24,40	33,87±0,13	171,54±0,33	557,98±9,12	304,73±7,75	33,11±0,65	152,51±2,40	677,49±14,83	228,75±22,04	
11	0	0	30,78±0,81	152,67±6,88	525,59±21,77	257,32±9,43	33,24±0,14	162,79±0,43	551,58±14,43	316,78±24,28	33,07±1,08	153,83±2,16	681,86±11,91	232,68±36,17	
PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ SOLVENTE ACETONA															
Cortida	Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes A1			Variáveis Dependentes A2			Variáveis Dependentes A3					
	x ₁	x ₂	x ₃	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
	1	-1	-1	28,70±0,63	154,31±1,92	499,94±17,41	274,60±8,60	30,07±0,15	160,47±1,22	532,74±7,06	317,93±2,34	29,47±0,77	149,63±3,95	586,04±27,52	238,21±2,17
2	-1	1	24,66±0,65	160,36±2,58	484,59±6,68	265,49±4,92	23,31±0,97±	142,17±13,79	451,62±15,42	290,60±6,87	22,09±0,05	131,58±0,23	453,48±19,08	202,21±2,71	
3	1	-1	35,72±0,46	202,04±0,84	631,65±1,68	357,85±4,82	33,47±1,10	185,25±0,56	593,14±12,65	349,07±8,15	31,06±1,69	175,11±8,79	647,35±32,11	257,43±19,20	
4	1	1	30,47±2,01	191,83±9,51	581,86±16,63	328,79±5,10	25,18±0,67	159,33±3,59	511,85±22,00	309,28±18,06	25,49±0,32	151,55±8,38	573,10±27,26	236,08±12,68	
5	0	0	32,66±1,81	172,15±7,34	564,62±25,05	322,05±5,62	32,48±0,06	177,98±0,76	570,48±3,30	358,12±13,28	30,77±0,68	157,81±0,95	627,57±1,77	246,14±18,31	
6	0	0	28,85±2,48	182,58±11,73	541,23±29,48	316,48±9,91	24,21±1,52	151,18±4,63	487,07±38,20	300,37±44,39	23,79±0,37	139,80±6,16	516,91±2,16	255,65±6,38	
7	1	1	37,22±0,39	209,89±5,42	678,13±1,08	357,21±18,72	36,47±0,27	203,89±9,47	669,01±8,80	396,78±18,41	34,24±0,02	185,71±5,83	697,24±22,18	312,86±9,41	
8	1	1	29,19±0,14	191,49±0,77	580,24±26,04	327,67±23,00	30,12±0,43	204,90±6,45	624,72±4,58	354,43±23,60	27,71±1,26	171,46±6,92	612,74±22,13	279,04±11,47	
9	0	0	33,68±1,11	202,59±3,91	614,79±17,36	365,31±5,44	34,38±0,08	201,22±3,43	635,77±8,35	377,02±8,97	31,75±0,24	183,17±8,43	640,98±1,17	294,70±1,24	
10	0	0	32,30±0,30	191,60±10,40	593,92±0,92	324,58±34,30	35,20±4,18	209,16±22,23	637,81±68,24	375,87±41,68	32,72±0,44	188,03±3,60	652,67±16,22	306,82±5,26	
11	0	0	36,86±1,54	222,07±5,72	676,23±25,01	399,67±19,47	35,70±0,35	219,62±3,29	658,81±11,63	391,06±13,53	32,28±0,53	190,86±6,07	660,77±0,15	287,21±35,13	

Antioxidantes Padrões				
Antioxidantes padrões	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
Ácido ascórbico	362,34±3,90	5646,58±86,00	16376,38±640,90	5790,06±278,70
Ácido gálico	1006,79±7,27	19035,03±263,43	34522,18±494,87	18679,77±611,58
Quercetina	905,27±24,25	8032,29±358,16	10741,76±979,53	9831,91±203,86

A1 (amostra seca a temperatura ambiente por 2 dias), A2 (amostra liofilizada durante 24 horas); A3 (amostra seca em estufa 37 ± 3 °C durante 24 horas); Os extratos foram obtidos em réplicas genuínas e os resultados expressos em média ± desvio padrão (n = 3); Os valores (-1), (0) e (+1) referem-se aos níveis codificados utilizados para a obtenção de cada extrato. Variável x₁: tempo (minutos), onde -1 (30), 0 (60) e +1 (90); x₂: temperatura (°C), onde -1 (40), 0 (60) e +1 (80); x₃: solvente (%), -1 (40), 0 (60) e +1 (80); CFT: mg EAG g⁻¹ (Equivalente ao ácido gálico); DPPH: µmol de Trolox g⁻¹; FRAP: µmol de Fe²⁺ g⁻¹; ABTS: µmol de TEAC g⁻¹.

As significâncias das variáveis independentes sobre os dados de CFT podem ser visualizados na Figura 15 pela representação do gráfico de Pareto ($p < 0,05$), e Tabela 9 pela exposição dos coeficientes de regressão lineares de cada modelo matemático obtido ($p < 0,05$). O CFT foi significativamente ($p < 0,05$) afetado pela temperatura de extração para os três solventes utilizados (água, etanol e acetona), correspondendo ao nível positivo (+1) (80 °C), o que demonstrou que ao variar a temperatura de 40 para 80 °C a extração de CFT aumentou em até 50%, apresentando-se de forma geral, como a variável mais influente, dentre as avaliadas, no rendimento de CFT para Bd. A concentração de compostos fenólicos de açaí (*Euterpe oleracea*) também aumentou em até 1,3 vezes com o aumento da temperatura de extração de 45 para 60,5 °C (POMPEU *et al.*, 2009), corroborando com este estudo. Rajha *et al.* (2014) utilizaram planejamento fatorial para determinar parâmetros de extração de amostras de uvas, obtendo com 94 °C a maior quantificação de CFT, sendo esta temperatura próxima a avaliada por este estudo. A concentração de etanol afetou significativamente a extração de CFT para A2, e a concentração de acetona afetou os três diferentes preparos de amostras, ambas no nível negativo (-1) (40%). Foi detectado efeito negativo de interação significativo ($p < 0,05$) (temperatura x concentração do solvente), apenas para A3 em solvente etanol, para CFT. Os coeficientes de regressão lineares dos modelos obtidos, variaram de 60 a 88%, dentre os PFC's analisados, demonstrando boa confiabilidade do modelo experimental para a variável CFT (Tabela 9).

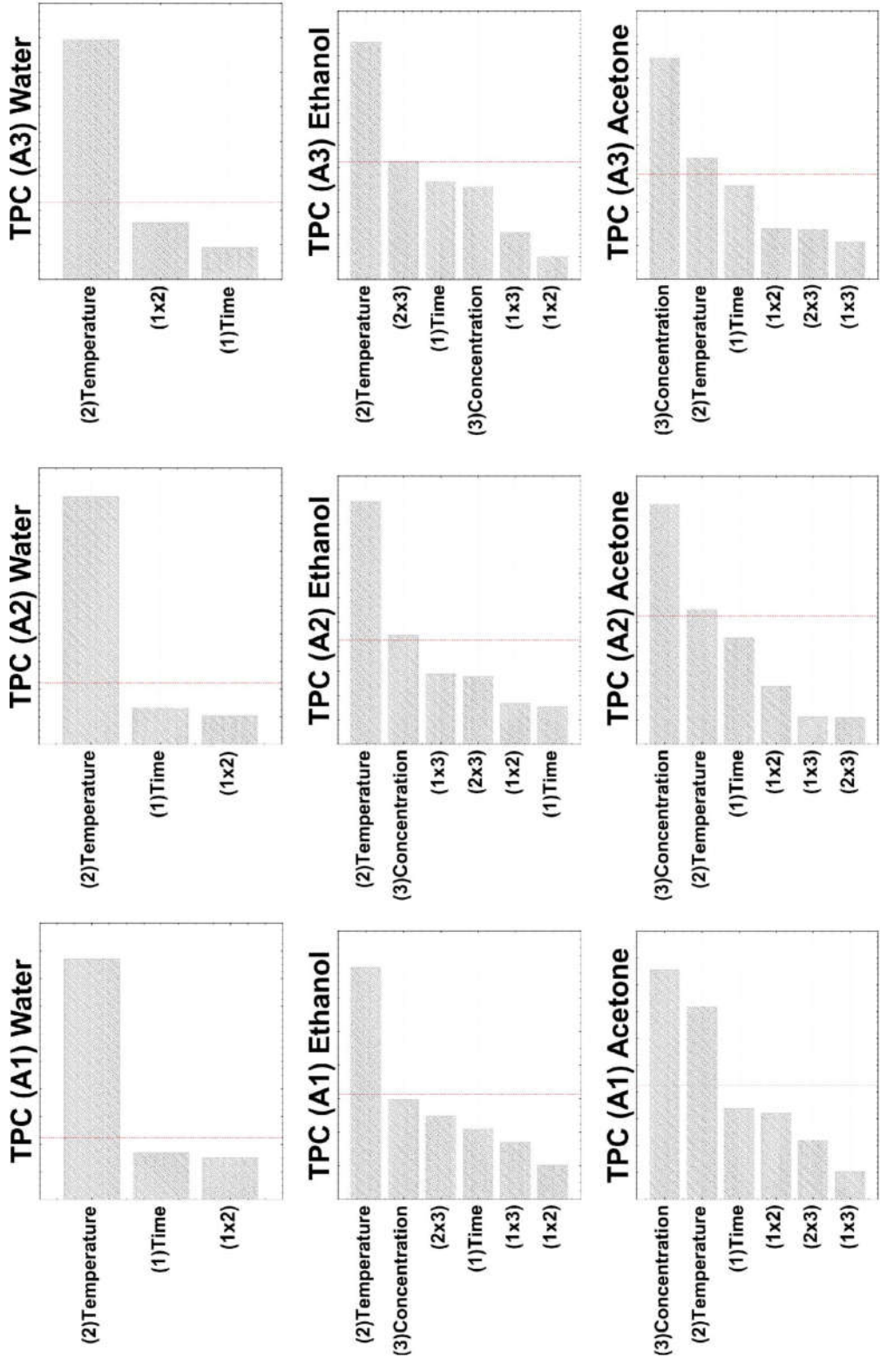


Figura 15. Gráficos de Pareto demonstrando as significâncias das variáveis independentes (Tempo e Temperatura) sobre a variável dependente CFT ($p < 0,05$).

Tabela 9. Coeficientes de regressão dos planejamentos fatoriais de extração de compostos bioativos da planta *Baccharis dracunculifolia* (Bd) utilizando água, etanol ou acetona como solventes.

Coeficientes	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ SOLVENTE ÁGUA											
	Variáveis Dependentes A1			Variáveis Dependentes A2			Variáveis Dependentes A3					
	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
β_0	22,97	101,96	385,75	193,15	24,23	120,21	387,19	218,98	24,02	111,22	458,75	169,88
β_1	ns	21,64	ns	ns	ns	ns	ns	14,67	ns	ns	ns	ns
β_2	3,13	ns	64,33	17,86	4,02	17,32	89,78	28,4	3,17	28,41	90,44	23,5
β_{12}	ns	-17,13	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	18,38	7,13
R ²	0,865	0,7512	0,9212	0,7923	0,8815	0,5988	0,8916	0,7428	0,7809	0,7197	0,8798	0,8565
Coeficientes	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ SOLVENTE ETANOL											
	Variáveis Dependentes A1			Variáveis Dependentes A2			Variáveis Dependentes A3					
	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
β_0	27,47	125,71	477,55	239,13	29,31	144,95	497,06	281,21	28,77	133,2	580,88	213,16
β_1	ns	10,65	ns	ns	ns	ns	ns	14,21	ns	ns	ns	ns
β_2	3,47	30,56	82,46	25,51	3,94	30,03	97,61	38,83	3,63	27,89	100,35	25,6
β_3	ns	ns	ns	ns	-1,77	ns	ns	-13,4	ns	ns	ns	ns
β_{12}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
β_{13}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
β_{23}	ns	-11,96	-28,94	ns	ns	-32,8	ns	ns	-1,61	-9,74	-55,31	ns
R ²	0,6943	0,841	0,7898	0,5351	0,6062	0,6913	0,775	0,8063	0,6831	0,804	0,7558	0,6104
Coeficientes	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ SOLVENTE ACETONA											
	Variáveis Dependentes A1			Variáveis Dependentes A2			Variáveis Dependentes A3					
	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
β_0	31,84	189,17	586,11	330,88	30,96	183,2	579,37	347,32	29,22	165,88	606,26	265,12
β_1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	32,74	17,85	ns	ns	24,31	19,97
β_2	2,22	15,73	47,69	24,11	1,9	15,2	44,6	17,82	1,55	13,13	43,3	17,9
β_3	-2,64	ns	-23,3	ns	-3,71	ns	-36,26	-20,9	-3,31	-9,23	-50,24	ns
β_{12}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
β_{13}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
β_{23}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
R ²	0,6416	0,5076	0,6236	0,3936	0,64	0,4659	0,5983	0,5138	0,7273	0,5171	0,7723	0,5143

A1 (amostra seca a temperatura ambiente por 48 horas), A2 (amostra liofilizada durante 24 horas), A3 (amostra seca em estufa 37 ± 3 °C durante 24 horas); Os extratos foram obtidos em réplicas genuínas e os resultados expressos em média ± desvio padrão (n = 3); Coeficientes: β_0 : Média; β_1 : tempo; β_2 : temperatura; β_3 : solvente; β_{12} : interação tempo + temperatura; β_{13} : interação tempo + concentração; β_{23} : interação temperatura + concentração; R²: Coeficientes de determinação; CFT: Compostos fenólicos totais; DPPH, FRAP, ABTS: Atividades antioxidantes; ns: não significativo p>(0,05).

Os dados relativos as médias das determinações de CFT, para cada solvente de extração, foram analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e não apresentaram diferença significativa entre os três preparos de amostra avaliados (A1, A2 e A3) (Tabela 10).

Tabela 10. Influência dos diferentes preparos de amostras (A1, A2 e A3) de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) sobre as variáveis dependentes CFT, DPPH, FRAP e ABTS.

	CFT			DPPH			FRAP			ABTS		
	Água	Etanol	Acetona	Água	Etanol	Acetona	Água	Etanol	Acetona	Água	Etanol	Acetona
A1	22,97 ^a	27,48 ^a	31,84 ^a	101,96 ^a	125,71 ^a	189,18 ^a	385,75 ^b	477,55 ^b	586,11 ^a	193,15 ^b	239,14 ^b	330,88 ^a
A2	24,23 ^a	29,31 ^a	30,96 ^a	120,22 ^a	144,95 ^a	183,20 ^a	387,19 ^b	497,06 ^b	579,37 ^a	218,98 ^a	281,21 ^a	347,32 ^a
A3	24,01 ^a	28,78 ^a	29,22 ^a	108,83 ^a	133,20 ^a	165,88 ^b	458,90 ^a	580,88 ^a	606,26 ^a	169,88 ^c	213,16 ^b	265,12 ^b

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao teste de Tukey ($p < 0,05$). CFT: Compostos fenólicos totais; DPPH, FRAP e ABTS: Atividades antioxidantes; A1 (amostra seca a temperatura ambiente por 2 dias), A2 (amostra liofilizada durante 24 horas); A3 (amostra seca em estufa 37 ± 3 °C durante 24 horas).

Simirgiotis *et al.* (2016) obtiveram 63,95 mg EAG g⁻¹ (b.s), em *Baccharis tola*. Sartor *et al.* (2013) obtiveram o intervalo de 36,44 a 45,83 mg EAG g⁻¹ (b.s), em *Baccharis dentata*. Veiga *et al.* (2017) aproximadamente 1,00 mg EAG g⁻¹ em extrato etanólico, e 0,05 mg EAG g⁻¹ em extrato metanólico, (b.s), em Bd. Figueiredo-Rinhel *et al.* (2013) de 100 a 170 mg EAG g⁻¹, para Bd. Estes dados estão próximos aos encontrados por este estudo, e evidenciam que as quantificações de CFT podem variar conforme os protocolos de extrações e as espécies avaliadas, embora pertençam ao mesmo gênero. O ideal é escolher o protocolo mais adequado de acordo com a finalidade de aplicação dos princípios ativos. Embuscado (2015) também evidenciou que o uso de solventes extratores diferentes, pode ocasionar em variadas respostas de CFT, nas quais sofrem variações conforme o genótipo da planta, localização geográfica de plantio, tipo de cultivo, e clima. Ramirez *et al.* (2015) obtiveram intervalo de 9,24 a 65,53 mg EAG g⁻¹ em pequenas frutas do Chile, demonstrando quantidades próximas a da planta Bd, visto que estas frutas são consideradas fonte de compostos fenólicos, demonstrando ser de bom rendimento a quantidade de CFT extraída a partir de Bd, pelo presente estudo.

5.1.2 Efeito dos parâmetros de extração sobre as respostas de atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP)

As análises de atividade antioxidante utilizadas para estudar a influência da concentração do solvente utilizado, do tempo e da temperatura de extração em diferentes preparos de amostras de Bd foram: DPPH, ABTS e FRAP. As determinações de atividade antioxidante sobre o DPPH variaram de 64,68 a 151,44, de 76,05 a 185,23 e de 131,58 a 222,07, µmol Trolox g⁻¹. As atividades antioxidantes sobre o ABTS variaram de 140,26 a 267,70, de 167,03 a 320,00 e de 202,21 a 399,67, µmol TEAC g⁻¹. E, as atividades antioxidante relativas

ao FRAP variaram de 308,62 a 516,96, de 340,55 a 704,56 e de 451,62 a 697,24, $\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$. Todas calculadas em (b.s), nos solventes água, etanol e acetona, respectivamente (Tabela 8). Da mesma forma que em CFT, ocorreu para as determinações de atividade antioxidante, a mesma relação de solvente mais eficiente em extração de compostos bioativos: acetona > etanol > água.

Amostras de própolis, de várias cidades bolivianas, em extrato metanólico, variaram de 225,43 a 2666,56 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ (NINA *et al.*, 2015). Rodrigues *et al.* (2015) avaliaram 8 tipos diferentes de chás comerciais, dentre eles, a carqueja (*Baccharis ginistelloides*), em extração à quente e a frio, obtendo 3255,54 e 1110,34 $\mu\text{mol TEAC L}^{-1}$ (equivalente a 3,25 e 1,11 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$), respectivamente, demonstrando que para esta determinação, e para este gênero, temperaturas maiores podem favorecer a extração de compostos antioxidantes. Estes dados demonstram que a atividade antioxidante de Bd relativa ao ABTS pode ser considerada relevante.

Mokrani e Madani (2016) obtiveram a relação de eficiência de extração, relativos aos diferentes solventes utilizados por eles, para atividade antioxidante sobre o radical DPPH, conforme segue: acetona > metanol > etanol > água (60% - solvente:água), e para a determinação de FRAP acetona > etanol = metanol > água, em amostras de pêssego. Tais dados corroboram com os resultados obtidos pelo presente estudo. Mello e Hubinger (2012) analisaram amostras de própolis verde brasileira em diferentes pH's, obtendo variação de 25 a 45% e de 50 a 90%, de atividade antioxidante frente ao radical DPPH. Para FRAP os mesmos autores obtiveram valores de 180,95 a 1038,09 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ e 219,04 a 2078,57 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$, em solvente aquoso e etanólico (80% - solvente:água), respectivamente. Sendo que seus maiores rendimentos obtidos foram em extratos etanólicos. Martinez-Correa *et al.* (2012) demonstraram ser o etanol mais efetivo que a água para extrair compostos com atividade antioxidante de extratos da planta Bd, tal qual o presente estudo, o que também ocorreu para Garmus *et al.* (2015), em amostras de alecrim-pimenta.

Conforme Koleva *et al.* (2000) a quantidade e a posição de grupamentos OH (hidroxila) estão ligados a atividade antioxidante de um composto, sendo que, quanto maior a disponibilidade e a quantidade deles, maior a atividade antioxidante sobre o radical DPPH. O valor da atividade antioxidante pela captura do radical DPPH em uma mesma amostra também pode variar com a utilização de diferentes solventes extratores (EMBUSCADO, 2015). Tais comparações supracitadas demonstram a necessidade de investigação do solvente e concentração mais eficientes, para extração daquilo que se deseja, justificando a investigação do presente trabalho.

Para DPPH, os preparos de amostra (A1, A2 e A3) não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), em solvente aquoso e etanólico. Em acetona, A1 e A2 não diferiram seus resultados entre si, apresentando as maiores médias em relação a A3. Em ABTS houve diferenças significativas ($p<0,05$) entre os preparos de amostra, em todos os solventes analisados, em que A2 obteve maiores valores de atividade antioxidante para todos os solventes. Em FRAP não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os preparos de amostra para o solvente acetona. Para os solventes etanol e água, A1 e A3 não diferiram entre si, mas foram superiores ao A2 (Tabela 10).

Quanto a significância dos fatores, na maior parte dos casos, para DPPH, FRAP e ABTS, a temperatura foi a variável mais influente ($p<0,05$), para todas as amostras e solventes analisados, correspondendo ao nível positivo (+1) (80 °C) (Tabela 9) (Figuras 16, 17 e 18). O incremento de 40 °C, quando a temperatura de extração passou de 40 °C para 80 °C, pôde aumentar progressivamente, em até 100%, 33% e 87%, a extração de compostos bioativos com atividade antioxidante determinados pelos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP, respectivamente. O aumento da temperatura de extração pode aumentar as taxas de difusão, a solubilidade dos analitos, a transferência de massa e reduzir a viscosidade e tensão superficial dos solventes, possibilitando o desenvolvimento de um protocolo de extração mais rápido e com menor consumo de solventes (RAMOS *et al.*, 2002).

Karacabey e Mazza (2010) encontraram o ponto ótimo de extração de compostos com maiores rendimentos em atividades antioxidantes, em amostras de bagaços de hastes de uvas, em 80 °C com utilização de etanol a 40,4%. Gullón *et al.* (2017) determinaram como ponto ótimo de extração de amostras de *Eucalyptus globulus* a temperatura de extração no maior nível estudado (50 °C) e a concentração de etanol (56%), em função de respostas de determinações de atividade antioxidante. Estes autores ainda testaram a influência de temperaturas mais elevadas (60 e 70 °C), no entanto, obtiveram valores de atividade antioxidante reduzidos. Desta forma, o aumento de temperatura pode ser positivo para o rendimento do analito desejado, no entanto, depende da característica da amostra que sofrerá a extração, por isso é importante estudar variáveis de extração como temperatura e tempo de forma combinada, já que a adequação delas pode interferir diretamente na economia e eficiência do processo de extração em escala industrial.

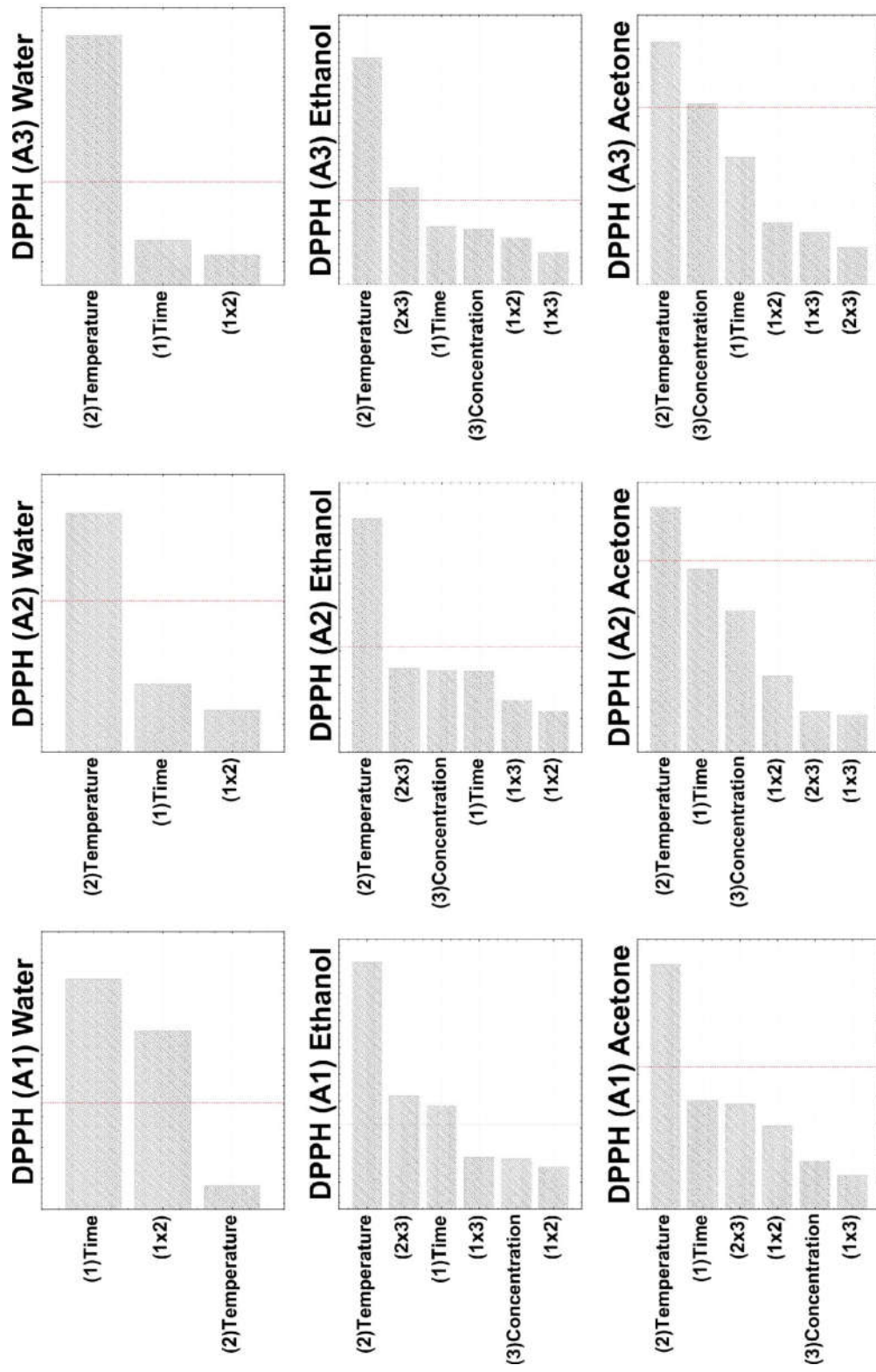


Figura 16. Gráficos de Pareto demonstrando as significâncias das variáveis independentes (Tempo, Temperatura e Concentração do Solvente utilizado) sobre a variável dependente DPPH ($p < 0,05$).

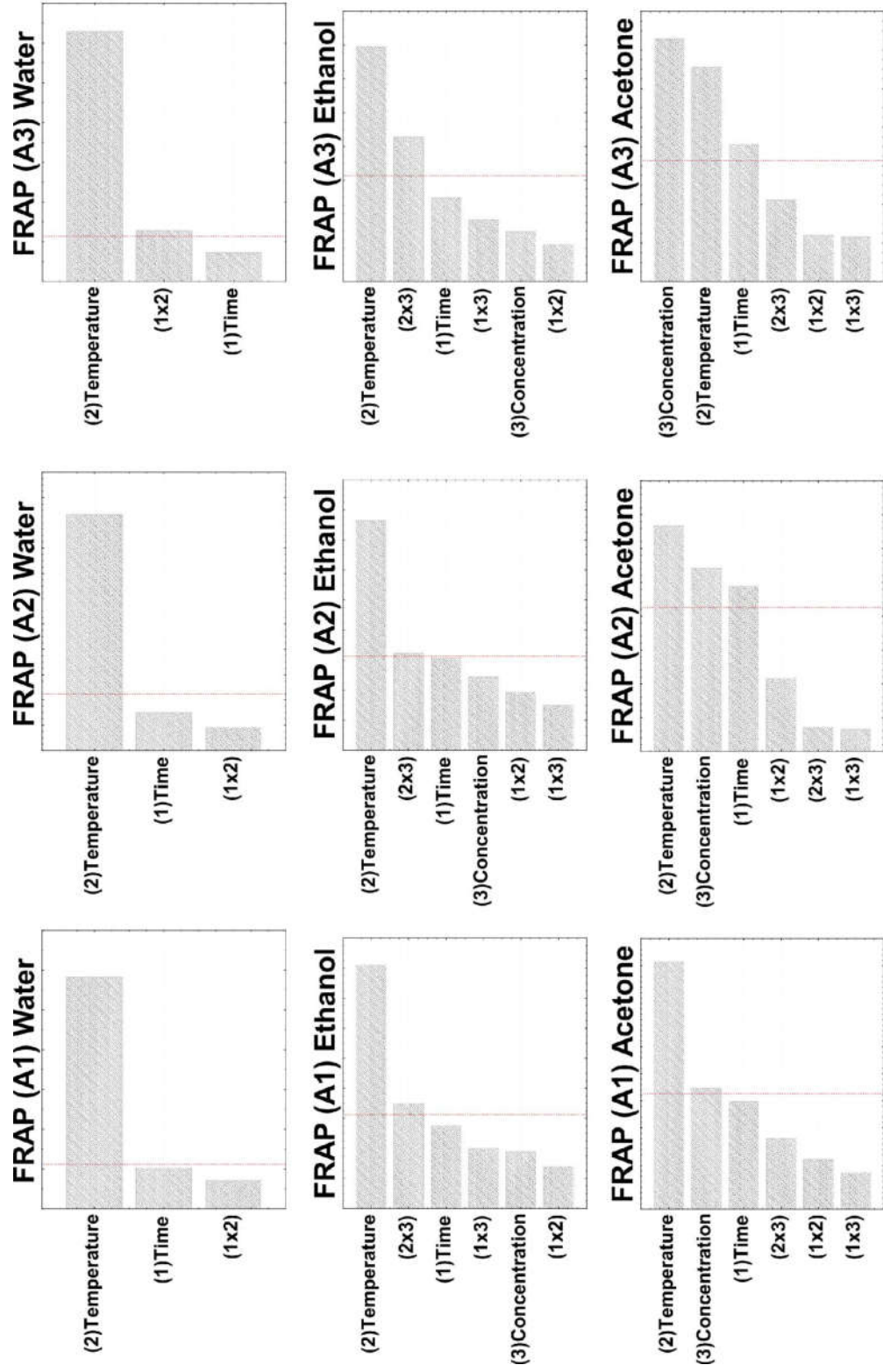


Figura 17. Gráficos de Pareto demonstrando as significâncias das variáveis independentes (Tempo, Temperatura e Concentração do Solvente utilizado) sobre a variável dependente FRAP ($p < 0,05$).

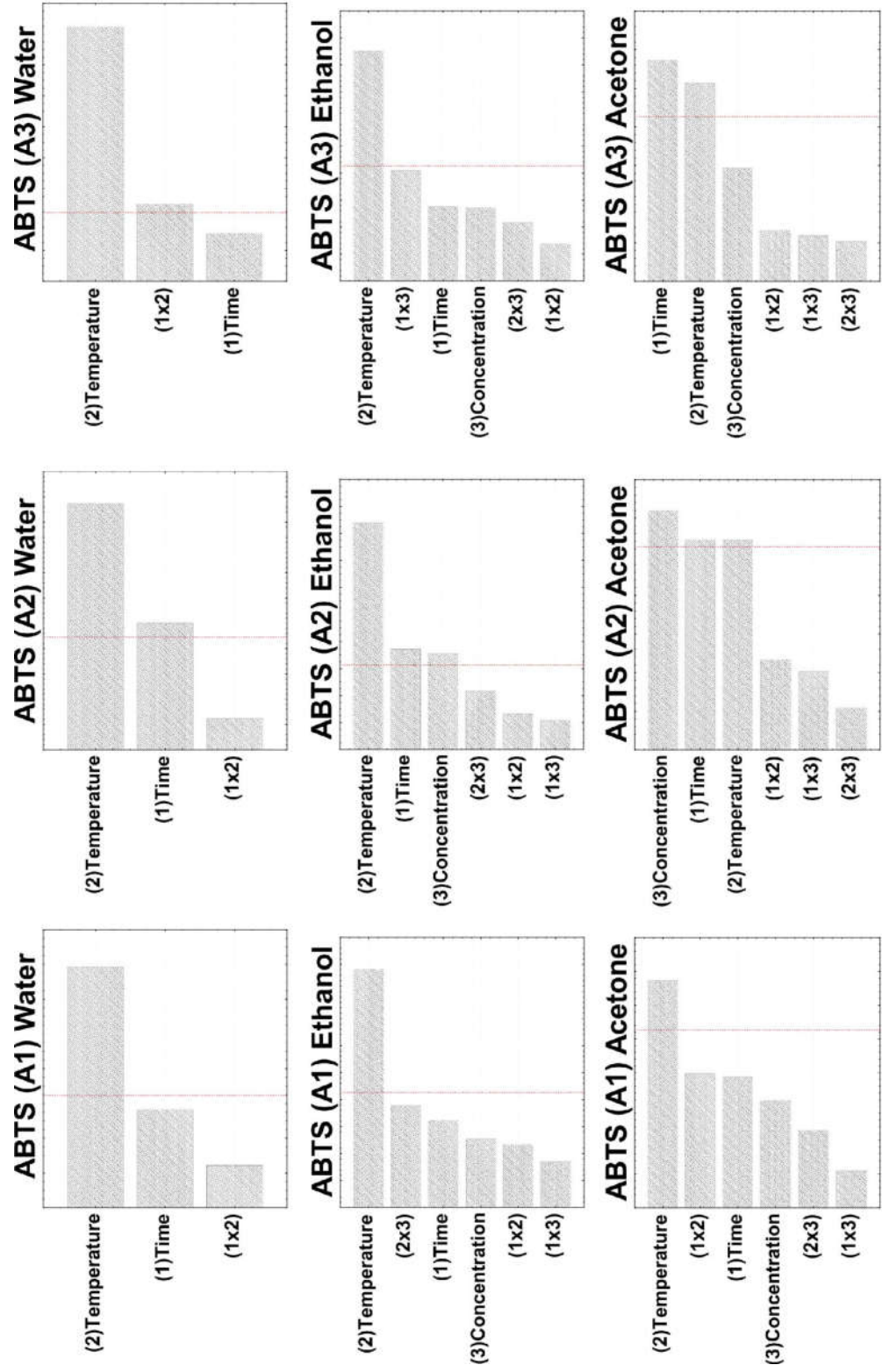


Figura 18. Gráficos de Pareto demonstrando as significâncias das variáveis independentes (Tempo, Temperatura e Concentração do Solvente utilizado) sobre a variável dependente ABTS ($p < 0,05$).

Quando houve efeito significativo de tempo de extração e concentração de solvente, em DPPH, ABTS e FRAP, os fatores foram relativos ao nível positivo para tempo (+1) (90 minutos), e ao nível negativo (-1) para concentração do solvente utilizado (40%). Efeitos de interação negativos entre as variáveis independentes temperatura e concentração do solvente foram observados para o solvente extrator etanol, em DPPH e FRAP, demonstrando antagonismo entre essas variáveis, de forma que conforme a temperatura aumentava e a concentração do solvente etanol diminuía, as respostas de atividade antioxidante aumentavam (Tabela 9) (Figuras 16, 17 e 18). Tal fato refere-se à relação adequada entre a temperatura de 80 °C e a concentração de 40% do solvente etanol, para as extrações com maiores rendimentos em compostos fenólicos com atividade antioxidante, em função das características das amostras de Bd. Para DPPH, ABTS e FRAP, os coeficientes lineares de regressão variaram de 47 a 84%, 39 a 85% e de 60 a 92%, respectivamente. Os coeficientes que conferiram maior confiabilidade ao modelo matemático linear foram os obtidos com a utilização de solvente água e etanol, sendo que a utilização de acetona como solvente resultou em coeficientes menores e, portanto, com reduzida confiabilidade (Tabela 9).

A Bd é a maior fonte botânica da própolis verde no Brasil, e os dados de Mello e Hubinger (2012) demonstram semelhanças com este estudo, bem como explicita o etanol como melhor solvente extrator de compostos bioativos (relativos as atividades antioxidantes determinadas e ao CFT), se comparado ao solvente água. É importante salientar que “*The European Food Safety Authority*” (EFSA) classifica o etanol como um solvente extrator seguro (EFSA, 2011). Além disso, ele possui propriedades antissépticas, reduzindo a contaminação microbiológica dos extratos (CVETANOVIC *et al.*, 2015), permitindo e encorajando sua utilização em etapas de processos industriais alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. E conforme Alberti *et al.* (2014), se o intuito é a utilização do produto da extração em alimentos ou drogas, a acetona e o metanol devido as suas toxidades não são recomendados.

5.1.3 Correlação de Pearson

A correlação de Pearson é uma medida de covariância linear, entre duas variáveis, dividida pelo produto de seus desvios padrões, podendo ser positiva, negativa ou nula. Quando a correlação é positiva, se tomadas duas variáveis (x e y), se “x” aumenta de valor, “y” também aumenta, e vice-versa, quando for negativa a correlação, se “x” diminuir de valor, “y” aumentaria (PRION e HAERLING, 2014). Se a correlação for nula (valor zero), quer dizer que não existe nenhuma relação entre as variáveis (TAYLOR, 1990). Para interpretação da

intensidade de uma correlação de Pearson há uma regra, conforme Taylor (1990), se o valor da correlação for de $\leq 0,35$ (fraca correlação), de 0,36 a 0,67 (correlação moderada), de 0,68 a 1,00 (correlação forte).

Em função disso, é possível inferir que, de forma geral, houve uma forte correlação significativa ($p < 0,05$) positiva, entre CFT e atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP), demonstrando que o aumento da quantificação de CFT, influenciou no aumento da atividade antioxidante expressa pelos extratos, sugerindo que os compostos fenólicos extraídos da planta podem ser responsáveis pela atividade antioxidante que ela exerce. FRAP e ABTS demonstraram moderada correlação positiva (Tabela 11).

Tabela 11. Coeficientes de correlação de Pearson de CFT, DPPH, ABTS e FRAP de extratos aquosos, etanólicos e acetônicos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd).

Variáveis	Água PFC 2 ²			Etanol PFC 2 ³			Acetona PFC 2 ³		
	DPPH	FRAP	ABTS	DPPH	FRAP	ABTS	DPPH	FRAP	ABTS
CFT	0,7959*	0,9178*	0,7623*	0,9154*	0,8742*	0,8004*	0,7795*	0,8551*	0,6565*
DPPH		0,7729*	0,7709*		0,8929*	0,8369*		0,6847*	0,8864*
FRAP			0,6126*			0,6485*			0,4644*

CFT: Compostos fenólicos totais; DPPH, FRAP e ABTS: Atividades antioxidantes; PFC: Planejamento fatorial completo; *significativo ($p < 0,05$);

Sartor *et al.* (2013) encontraram forte correlação negativa (-0,90) entre a atividade antioxidante (CE_{50}) e CFT, em *Baccharis dentata*, sendo esta atrelada a expressão de atividade antioxidante em valor de CE_{50} , aonde quanto menor o valor, mais efetiva ela é. Fortes correlações positivas, entre atividade antioxidante e CFT, também foram identificadas por Bittencourt *et al.* (2015), em amostras de própolis verde, por Garmus *et al.* (2015) em alecrim-pimenta, Skotti *et al.* (2014) em plantas da região da Grécia, por Boeing *et al.* (2014) para amora negra (*Morus nigra*), amora (*Rubus ulmifolius*) e morango (*Fragaria x ananassa*), e por Casagrande *et al.* (2019) em amostras de bagaços de uvas, corroborando com o presente estudo. Isso evidencia que para determinadas plantas o rendimento de compostos fenólicos pode influenciar no potencial antioxidante do extrato.

Os compostos fenólicos naturais podem exprimir atividade antioxidante (MONROY *et al.*, 2016; BITTENCOURT *et al.*, 2015; KUMAZAWA *et al.*, 2004), podendo haver uma relação entre a atividade antioxidante e a presença de ácidos fenólicos nas preparações de extratos de Bd (MARTINEZ-CORREA *et al.*, 2012), tal qual o presente estudo. Conforme Bittencourt *et al.* (2015), os compostos fenólicos possuem facilidade em doar seus elétrons às espécies reativas ao oxigênio (ERO). Então, a positiva e alta correlação entre os CFT e atividade antioxidante de um extrato pode indicar a eficiência dos compostos fenólicos extraídos em

neutralizar radicais livres, pois quanto maior essa correlação, maior a eficiência dessa neutralização. E tal mecanismo pode vir a favorecer a atividade biológica desses extratos.

5.2 PLANEJAMENTO DE MISTURA DE SOLVENTES SIMPLEX-LATTICE (PSL)

A extração de compostos bioativos a partir de amostra liofilizada de Bd (A2) através das diversas proporções definidas pelo PSL entre os solventes água, etanol e acetona, resultou para CFT no intervalo de 5,48 a 31,62, mg EAG g⁻¹, enquanto que as atividades antioxidantes sobre o DPPH, variaram de 32,80 a 209,78, µmol trolox g⁻¹, sobre o ABTS de 81,96 a 319,25, µmol TEAC g⁻¹, e relativas ao FRAP variaram de 80,19 a 629,32, µmol de Fe²⁺ g⁻¹. Todas calculadas em (b.s) (Tabela 12).

Tabela 12. Concentrações dos componentes conforme o planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL) para o processo de extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd).

Córda	Solvente Extrator (%)			Variáveis Dependentes											
	Água	Etanol	Acetona	CFT			DPPH			ABTS			FRAP		
				Observado	Predito	Observado	Observado	Predito	Observado	Predito	Observado	Predito	Observado	Predito	
1	0	0	100	5,48±0,24	6,04	32,80±6,24	44,44	81,96±2,50	95,11	80,19±3,56	108,48				
2	0	100	0	11,50±0,39	12,13	58,36±3,48	60,39	112,92±3,00	114,77	174,63±3,65	191,56				
3	100	0	0	25,76±0,83	23,70	152,67±13,27	135,62	188,01±30,65	165,44	483,66±13,68	432,28				
4	0	67	33	10,57±0,12	12,04	61,49±0,75	76,28	117,16±7,12	142,15	178,50±9,53	213,87				
5	67	0	33	30,62±0,66	33,47	193,12±6,40	223,87	278,30±22,03	319,32	598,00±30,91	682,99				
6	67	33	0	31,62±0,56	34,34	196,48±5,48	210,35	272,46±12,91	291,23	602,51±14,55	653,60				
7	0	33	67	8,86±0,12	10,01	62,89±1,21	70,96	129,32±7,29	135,59	161,19±7,80	186,17				
8	33	0	67	28,86±0,93	27,58	209,78±5,51	193,46	319,25±17,31	295,87	629,32±22,74	575,03				
9	33	67	0	31,30±0,87	30,48	187,33±10,37	185,27	271,91±6,88	274,33	588,64±16,30	573,35				
10	17	17	67	22,51±0,54	20,62	174,20±5,35	144,70	260,45±5,07	233,58	483,79±14,40	418,34				
11	17	67	17	26,00±0,55	23,22	168,13±5,52	145,62	266,74±9,64	230,42	517,51±22,20	438,47				
12	67	17	17	30,81±0,57	30,00	195,92±6,95	199,98	297,59±16,21	302,08	575,40±13,34	599,22				
13	33	33	33	29,84±1,80	30,00	198,51±15,61	199,98	304,62±46,63	302,08	599,22±27,21	599,22				

Os extratos foram obtidos em réplicas genuínas e os resultados expressos em média ± desvio padrão (n = 3); CFT (Y₁): Compostos fenólicos totais, mg EAG g⁻¹ (Equivalente ao ácido gálico); DPPH (Y₂): μmol de Trolox g⁻¹; ABTS (Y₃): μmol de TEAC g⁻¹; FRAP (Y₄): μmol of Fe²⁺ g⁻¹. Amostra utilizada A2 (amostra liofilizada durante 24 horas); (p<0,05).

Nos testes para solventes extratores puros (corridas 1, 2 e 3), o solvente água destacou-se dos demais na extração da maior quantidade de CFT, com as maiores atividades antioxidantes exibidas, obtendo-se a mesma relação de eficiência para as quatro variáveis dependentes avaliadas: água > etanol > acetona. As misturas binárias, de diferentes proporções entre etanol e acetona, resultaram em rendimentos inferiores de compostos bioativos de Bd extraídos, se comparadas as misturas binárias (água e etanol), (água e acetona) e/ou ternárias (água, etanol e acetona) (Figura 19). As misturas binárias entre etanol ou acetona a água, demonstraram um aumento aproximado do rendimento de até 91% de CFT, com 119%, 55% e 123% de incremento nas atividades antioxidantes sobre DPPH, ABTS e FRAP, respectivamente, se comparadas as misturas binárias entre etanol e acetona, isso demonstrou que para esta amostra (Bd), é imprescindível a mistura de água a solventes orgânicos, para maior rendimento de compostos fenólicos, assim como anteriormente apontado pelos PFC's. Possibilitando a redução do volume de solvente orgânico utilizado no processo, pela utilização de grande proporção de água para extração dos compostos de interesse, proporcionando a escolha de um protocolo mais econômico e sustentável.

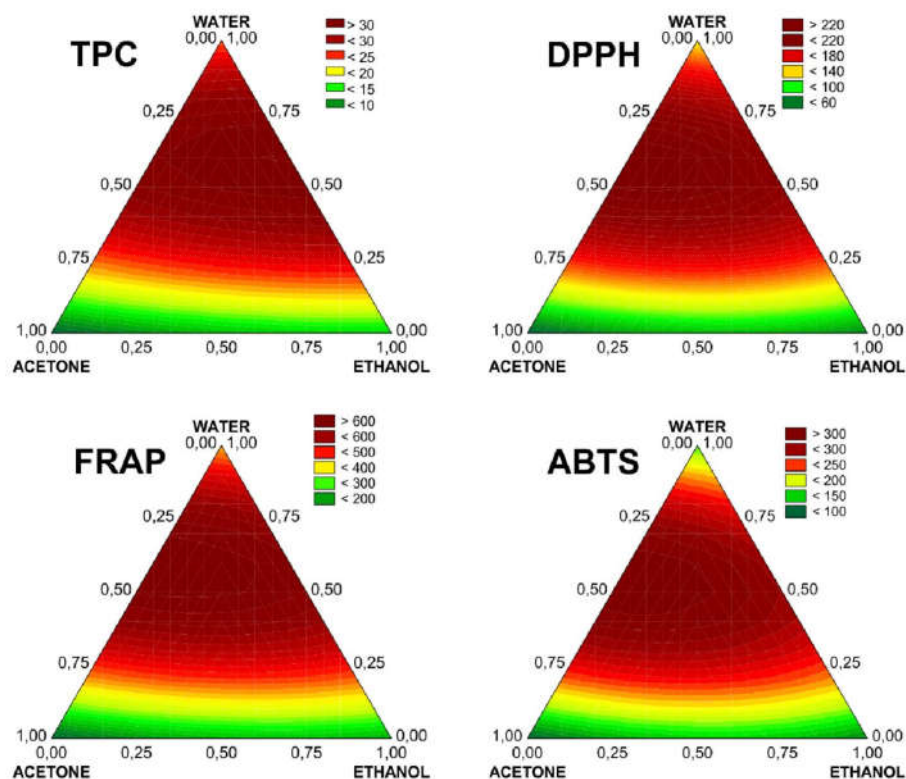


Figura 19. Gráficos de superfícies de respostas do planejamento de mistura Simplex-Lattice (PSL) para a extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) a partir da amostra de Bd liofilizada (A2), demonstrando a influência das variáveis independentes (água, etanol e acetona) sobre as dependentes (CFT, DPPH, ABTS e FRAP).

De acordo com Singh *et al.* (2016), a mistura de água a solventes orgânicos altera a polaridade final do solvente extrator e também gera um meio de dissolução lipofílico e hidrofílico simultâneo, permitindo rendimento maior de compostos antioxidantes extraídos, conforme a característica de cada molécula e a constituição da amostra, que passarão por processo de extração. Pois, no processo de extração, a água atua inchando o material vegetal, enquanto que o solvente orgânico pode ser responsável pelo rompimento das ligações entre a matriz da planta e seus solutos, facilitando a transferência de massa para o solvente, mostrando qual mistura entre água e solvente orgânico possui efeito sinérgico para extrair compostos fenólicos (CUJIC *et al.*, 2016).

Felix *et al.* (2018) realizaram extração de compostos fenólicos em misturas de água, etanol e acetona, com amostras de bagaço de cajá, e quando utilizaram os solventes puros, demonstraram que o solvente água proporcionou maior rendimento de compostos fenólicos, seguindo a mesma relação de eficiência do presente estudo (água > etanol > acetona). Os mesmos autores também demonstraram menores rendimentos de CFT's extraídos, resultante da mistura entre etanol e acetona, utilizados como extratores, o que demonstrou que a afinidade dos compostos fenólicos por solventes aquosos pode ter relação com o número de fenóis que a água pode dissolver, corroborando com o presente estudo para amostra de Bd.

Como já ficou evidente nos testes anteriores deste trabalho e conforme Singh *et al.* (2016), os dados de determinações de CFT, DPPH, ABTS e FRAP variam com a concentração e o tipo de solvente extrator, podendo interferir no rendimento dos compostos bioativos extraídos, sendo que, adicional a este fato, o tipo de amostra e a proporção (m/v) entre a amostra e o solvente, também são variáveis que interferem na extração de compostos bioativos.

Este experimento (PSL) visou encontrar a relação adequada entre os três solventes utilizados, em variadas proporções de misturas entre eles. No entanto, conforme o experimento anterior (resultados discutidos em 5.1 – PFC's), foi possível observar que as extrações executadas pelas combinações das variáveis independentes dos PFC's foram mais eficientes que as extrações realizadas pelas combinações das variáveis independentes do PSL. Ou seja, enquanto que nos PFC's (2² e 2³), foi possível extrair, no máximo, em CFT (29,90, 35,08 e 37,22), DPPH (151,44, 185,23 e 222,07), ABTS (267,70, 320,00 e 399,67) e FRAP (519,96, 704,56 e 697,24), para água, etanol (40%) e acetona (40%), respectivamente, os rendimentos conquistados pelo PSL foram um pouco inferiores (Tabela 12).

De qualquer maneira, tais extrações podem ser consideradas de bom rendimento em compostos bioativos, relativo ao tipo de amostra utilizada. Por exemplo, para amostras de grãos utilizados na produção de cerveja, em estudos de extrações de compostos bioativos por

diferentes solventes e concentrações testados, os valores variaram de 0,24 a 4,15 mmol de Fe^{2+} g^{-1} (aproximadamente 240 a 4150 μmol de Fe^{2+} g^{-1}) e 2,14 a 9,90 mg EAG g^{-1} , nas quantificações de FRAP e CFT, respectivamente (MENESES *et al.*, 2013). Visto que, esta quantidade extraída de compostos fenólicos com atividade antioxidante foi considerada relevante pelos autores e estão acerca do presente estudo, mesmo para os extratos produzidos pelo PSL.

Através das análises estatísticas pôde-se observar que os dados obtidos experimentalmente ajustaram-se ao modelo polinomial quadrático, com explicação no mínimo de 87% dos dados experimentais, baseados nos valores de R^2 obtidos a partir dos modelos matemáticos de cada variável dependente avaliada (CFT, DPPH, ABTS e FRAP) (Tabela 13). Para Baj *et al.* (2018), os quais utilizaram também um PSL para seu planejamento de misturas de diferentes óleos essenciais, visando incremento nas respostas de atividade antioxidante, o modelo matemático linear também não foi adequado, já a modelagem quadrática foi a que mais se adequou matematicamente ao seu experimento, corroborando com este estudo.

Tabela 13. Coeficientes de regressão para CFT e atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) para as diferentes proporções dos solventes extratores água, etanol e acetona sobre a extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd).

Coeficientes do modelo quadrático	Variáveis Dependentes			
	CFT	DPPH	ABTS	FRAP
β_1	23,70	135,62	165,44	432,28
β_2	12,13	60,39	114,77	191,56
β_3	6,04	44,44	95,11	108,48
β_{12}	65,24	449,14	642,07	1357,07
β_{13}	70,45	533,87	797,98	1613,92
β_{23}	8,74	95,44	160,90	225,00
R^2 ajustado	0,9576	0,9130	0,8756	0,9305

β_1 : água; β_2 : etanol; β_3 : acetona; β_{12} : interação água:etanol; β_{13} : interação água:acetona; β_{23} : interação etanol:acetona; ($p < 0,05$); CFT: Compostos fenólicos totais; DPPH, FRAP, ABTS: Atividades antioxidantes.

Pela Tabela 13 e Figura 20, pode-se observar claramente a influência majoritária da utilização do solvente água, puro, em comparação da utilização de acetona ou etanol, puros, como discutido anteriormente. Ao observar os coeficientes de interação foi possível confirmar, pelo alto valor dos coeficientes, para as quatro variáveis dependentes (CFT, DPPH, ABTS e FRAP), que as interações entre água e acetona e água e etanol extraíram a maior parte de compostos fenólicos com atividade antioxidante, com apontamento para maior eficiência de extração de compostos para a mistura entre água e acetona.

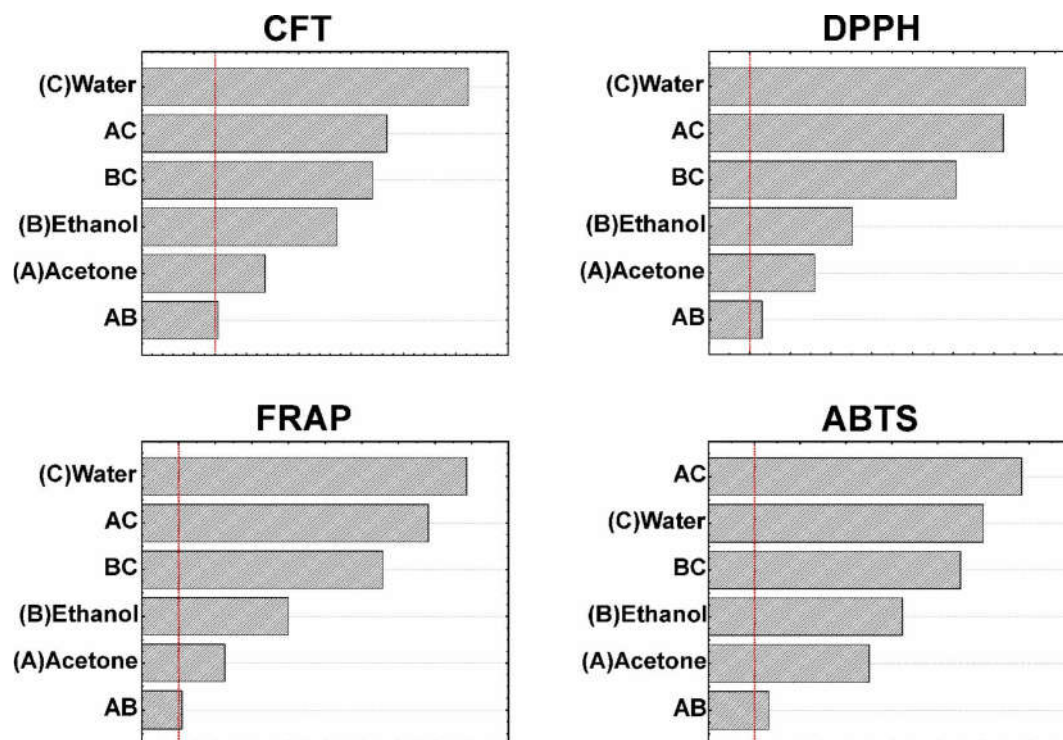


Figura 20. Gráficos de Pareto do planejamento de mistura Simplex-Lattice (PLS) para diferentes proporções entre os solventes água, etanol e acetona, em função das respostas de compostos bioativos extraídos (CFT, DPPH, FRAP e ABTS) de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) ($p < 0,05$).

Os perfis de desejabilidade e os dados obtidos experimentalmente podem ser observados na Tabela 14. Conforme o perfil calculado estatisticamente, a melhor mistura entre os solventes água, etanol e acetona deveria possuir a proporção aproximada de 44:0:56 (v/v/v). Conforme os dados, as condições experimentais exprimiram maiores valores quando comparadas as condições de extração de desejabilidade. Sendo assim, esta condição pode ser apontada como a mais vantajosa para extração dos compostos bioativos de Bd, sendo que, após determinações experimentais (CFT, DPPH, ABTS e FRAP) foi possível atingir uma extração mais rentável desses parâmetros se comparado aos PFC's.

Tabela 14. Perfis de desejabilidade para adequação da proporção entre a mistura dos solventes água, etanol e acetona para obtenção da maior eficiência em função dos parâmetros de determinação de compostos bioativos a partir de amostra liofilizada de *Baccharis dracunculifolia* (Bd).

Determinação	Valores preditivos	Dados experimentais
CFT	32,47	44,17±0,95
DPPH	218,66	274,04±3,38
ABTS	375,92	450,88±10,82
FRAP	662,94	908,04±23,51

Os extratos foram obtidos em réplicas genuínas e os resultados expressos em média \pm desvio padrão ($n = 3$); CFT: mg EAG g^{-1} ; DPPH: $\mu\text{mol Trolox } g^{-1}$; ABTS: $\mu\text{mol TEAC } g^{-1}$; FRAP: $\mu\text{mol Fe}^{2+} g^{-1}$; Amostra utilizada A2 (amostra liofilizada durante 24 horas).

O perfil de desejabilidade auxilia apontando a relação teórica mais eficiente em função das respostas estudadas experimentalmente, de qualquer maneira, por motivos de variações experimentais na execução dos processos analíticos como os processos de extração e de análise, é possível que valores preditivos se distanciem dos valores experimentais obtidos. De qualquer maneira, o perfil de desejabilidade pode atuar como um indicador de uma condição experimental de melhor rendimento teórico. Sendo que, para o presente estudo, cada condição experimental selecionada objetiva-se a testes subsequentes de funcionalidade e desenvolvimento de um produto baseado nas funcionalidades encontradas.

5.3 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO DOS PLANEJAMENTOS FATORIAIS COMPLETOS (PFC's) E PLANEJAMENTO DE MISTURA DE SOLVENTES SIMPLEX-LATTICE (PSL)

Com relação aos experimentos realizados pelos PFC's (2^2 e 2^3), após análise de comparação entre médias ($p < 0,05$), entre os diferentes preparos das amostras analisados (A1, A2 e A3), de forma geral, os resultados demonstraram que partes aéreas de Bd liofilizadas (A2) apresentavam maiores rendimentos em CFT e atividade antioxidante (Tabelas 8 e 10). Para cada solvente avaliado, as condições mais eficientes de extração determinadas pelos PFC's foram: 90 minutos a 80 °C em água (ÁGUA), 90 minutos a 80 °C em etanol 40% (ETANOL 40%), e 90 minutos a 80 °C em acetona 40% (ACETONA 40%), utilizando 1 g de A2 como amostra em 25 mL dos solventes anteriormente descritos. Embora os coeficientes de regressão dos modelos matemáticos gerados tenham sido baixos para os extratos em solvente acetona, este foi o que obteve os maiores rendimentos em CFT, DPPH, FRAP e ABTS em relação a água e ao etanol, conforme as variações de valores mínimos e máximos.

Com relação aos experimentos realizados pelo PSL, após análise estatística de perfil de desejabilidade, houve um apontamento para o preparo do solvente de extração na relação (56:0:44 / água:etanol:acetona) (DESEJABILIDADE). Sendo assim, considerou-se utilizar esta proporção e também a proporção relativa ao ponto central de extração do PSL (33:33:33 / água:etanol:acetona) (PONTO CENTRAL), com metodologia de extração determinada pela Figura 13, como amostras selecionadas para dar prosseguimento a esta pesquisa. É importante observar que a análise de desejabilidade evidenciou o que foi observado nos experimentos dos PFC's, em que os extratos em acetona resultavam em rendimentos maiores das variáveis dependentes (CFT, DPPH, ABTS e FRAP).

A utilização de misturas de água a solventes orgânicos melhora a extração de polifenóis, pois, gera um meio moderadamente polar (MOKRANI e MADANI, 2016). A presença de água em etanol também concentrou o conteúdo de compostos fenólicos e aumentou a atividade antioxidante em amostras de extrato de milho analisadas por Monroy *et al.* (2016). A mistura de água e solventes orgânicos é um fator que gera economia nos processos produtivos, e pode aumentar a eficiência de extração das moléculas alvo, sendo positiva a possibilidade de utilizá-los como co-solvente pelas indústrias. Em vista destes fatos, para os testes de EC₅₀, CIM, CBM e identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-UV, utilizaram-se as condições ótimas de extração determinadas pelos PFC's (ÁGUA, ETANOL 40%, ACETONA 40%), e também as determinadas pelo PSL (DESEJABILIDADE, PONTO CENTRAL), como forma de reduzir o número de amostras, e continuar avaliando a influência dos solventes sobre essas determinações para Bd (A2).

5.3.1 Atividade antioxidante expressa em CE₅₀ das condições ótimas de extração dos planejamentos fatoriais completos (PFC's) e do planejamento de misturas Simplex-Lattice (PSL)

Os valores de CE₅₀ determinam a concentração do extrato responsável pela redução de 50% da atividade inicial do radical DPPH, por isto, quanto menor o valor de CE₅₀, maior a atividade antioxidante do extrato (GARMUS *et al.*, 2015; BITTENCOURT *et al.*, 2015). Os dados de atividade antioxidante expressos em CE₅₀ demonstraram diferenças significativas entre os extratos nos solventes analisados, com ETANOL 40% demonstrando maior capacidade em reduzir o DPPH em 50%, se comparado a ÁGUA, ACETONA 40%, DESEJABILIDADE e PONTO CENTRAL ($p < 0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15. Atividade antioxidante (CE₅₀) dos pontos ótimos de extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd).

DPPH ¹ (atividade antioxidante) (n=3)			
Extratos de A2	Equação	(R ²)	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)*
ÁGUA ²	y = 0,1153x - 0,1372	0,9955	436,66±17,99 ^B
ETANOL 40% ³	y = 0,1497x + 25,397	0,9475	164,41±3,07 ^A
ACETONA 40% ⁴	y = 0,1028x + 6,6622	0,9839	423,91±30,03 ^B
PONTO CENTRAL ⁵	y = 0,1247x - 3,5307	0,9970	430,04±14,24 ^B
DESEJABILIDADE ⁶	y = 0,1188x + 4,2952	0,9842	386,50±21,51 ^B
Antioxidantes Padrões			
Ácido Gálico	y = 8,5396x - 4,7407	0,9983	6,41±0,10
Ácido Ascórbico	y = 2,7211x - 3,8604	0,9706	19,84±0,84
Quercetina	y = 4,6333x - 0,0527	0,9960	10,57±0,45

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Extratos PFC: ²80 °C, 90 minutos, água; ³80 °C, 90 minutos, etanol (40%); ⁴80 °C, 90 minutos, acetona (40%); Extratos PSL: ⁵80 °C, 180 min., (água:etanol:acetona / 33:33:33); ⁶80 °C, 180 minutos, (água:etanol:acetona / 56:0:44); A2: amostra liofilizada durante 24 horas, utilizada para o preparo dos extratos.

Se os valores de CE₅₀ ≤ 50 µg mL⁻¹ a amostra analisada é classificada como de alta atividade antioxidante, se estiver entre 50 e 100 µg mL⁻¹ possui atividade antioxidante moderada, se CE₅₀ > 200 µg mL⁻¹ não se considera relevante atividade antioxidante (SIMIRGIOTIS *et al.*, 2016) e se CE₅₀ estiver entre 100 a 200 µg mL⁻¹ o extrato é considerado ligeiramente ativo (REYNERTSON *et al.*, 2005). De acordo com tal parâmetro, o ETANOL 40% pode ser considerado um extrato com relevante atividade antioxidante e torna-se promissor a apresentar atividade biológica.

Os valores de CE₅₀ encontrados por Martinez-Correa *et al.* (2012), em amostras da planta Bd, em solvente aquoso foram de 158 e > 200 µg mL⁻¹, e em etanol foram de 50 e 36 µg mL⁻¹, em mistura de folhas jovens e adultas e em apenas folhas jovens, respectivamente, demonstrando valores mais relevantes quando o etanol foi utilizado como solvente. Veiga *et al.* (2017) obtiveram CE₅₀ de 124,49 e 13,09 µg mL⁻¹ em extrato etanólico, e 141,45 e 95,86 µg mL⁻¹ em extrato de hexano, em Bd e própolis verde, respectivamente. Bittencourt *et al.* (2015) analisaram amostras de própolis verde em frações de etanol, hexano e diclorometano, obtendo intervalo de 21,50 a 78,77 µg mL⁻¹ de CE₅₀, sendo que a variação foi em função do solvente utilizado, na relação: diclorometano > etanol > hexano. Desta forma, os dados obtidos pelos autores acima corroboram com o presente estudo, demonstrando a dependência entre o valor de CE₅₀ e o solvente de extração utilizado. Acredita-se que uma atividade antioxidante maior pode ser obtida pelo uso do etanol como solvente, quando comparado à água como solvente, mas vale salientar, que a natureza da amostra também pode modificar esta condição, de acordo com a afinidade das moléculas extraídas pelo solvente utilizado e o potencial antioxidante dessas moléculas extraídas.

É importante notar, que a produção do extrato DESEJABILIDADE, traçado pelo perfil estatístico de desejabilidade (oriundo do PSL), apesar de apresentar quantificações otimizadas das variáveis dependentes analisadas (CFT, DPPH, ABTS e FRAP), não demonstrou maior efetividade se comparado ao ETANOL 40% (ponto ótimo de extração determinado pelo PFC 2³). É possível afirmar que as moléculas extraídas de Bd pela extração ETANOL 40% são mais eficientes na inativação de radicais livres se comparado as demais extrações realizadas.

5.3.2 Atividade antimicrobiana – concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das condições ótimas de extração dos planejamentos fatoriais completos (PFC's) e do planejamento de misturas Simplex-Lattice (PSL)

O extrato ETANOL 40% demonstrou efeito bactericida (51,00 mg mL⁻¹) de no mínimo 90% (CBM) contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), enquanto que os extratos ACETONA 40%, PONTO CENTRAL e DESEJABILIDADE obtiveram este mesmo efeito apenas contra *S. aureus*.

Dentre os micro-organismos testados, o extrato ÁGUA foi capaz de inibir (CIM – 51,00 mg mL⁻¹) apenas *S. aureus*. Os extratos ETANOL 40%, ACETONA 40%, PONTO CENTRAL e DESEJABILIDADE, demonstraram inibições semelhantes (CIM), havendo exceção para *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), a qual foi inibida apenas por ETANOL 40%.

É possível observar também potencial maior dos extratos testados em inibir micro-organismos de espécie gram-positiva, já que os melhores efeitos bactericidas (CBM) foram registrados contra eles, e que estes efeitos foram atingidos para os compostos presentes pela extração ETANOL 40%, ACETONA 40%, PONTO CENTRAL e DESEJABILIDADE.

O método de extração ETANOL 40% apresenta um maior espectro antimicrobiano, dentre os avaliados, isto pode ser notado principalmente pelo fato de *P. aeruginosa* ser resistente ao antibiótico ampicilina, e ainda assim ser inibida (CIM – 51,00 mg mL⁻¹) também por este processo de extração (Tabela 16).

Tabela 16. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos pontos ótimos de extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd).

Condições de Extração	Bactérias (n=2)				
	Gram-positivas		Gram-negativas		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis
CIM mg mL⁻¹ (n=2)					
ÁGUA ^a	51,00	-	-	-	-
ETANOL 40% ^b	12,75	3,19	6,37	51,00	25,50
ACETONA 40% ^c	12,75	3,19	6,37	-	25,50
PONTO CENTRAL ^d	12,75	3,19	6,37	-	51,00
DESEJABILIDADE ^e	12,75	1,59	12,75	-	51,00
Ampicilina	0,00019	R ^f	0,00156	R ^f	0,01250
Gentamicina	0,00039	0,00156	0,00019	0,00156	0,00312
CBM mg mL⁻¹ (n=2)					
ÁGUA ^a	i.n	i.n	i.n	i.n	i.n
ETANOL 40% ^b	51,00	51,00	51,00	i.n	i.n
ACETONA 40% ^c	51,00	i.n	i.n	i.n	i.n
PONTO CENTRAL ^d	51,00	i.n	i.n	i.n	i.n
DESEJABILIDADE ^e	51,00	i.n	i.n	i.n	i.n

Extratos PFC: ^a80 °C, 90 minutos, água; ^b80 °C, 90 minutos, etanol (40%); ^c80 °C, 90 minutos, acetona (40%); Extratos PSL: ^d80 °C, 180 minutos, (água:etanol:acetona / 33:33:33); ^e80 °C, 180 minutos, (água:etanol:acetona / 56:0:44); Extratos preparados a partir de A2 (amostra liofilizada durante 24 horas); ^fResistência ao antibiótico; - Não houve efeito nas concentrações testadas; *Menor concentração de extrato necessária para eliminar no mínimo 90% dos micro-organismos (CBM); i.n (ineficiente para CBM).

Veiga *et al.* (2017) obtiveram valores de CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$), para diferentes cepas de *S. aureus*, de 197 a 770 em amostras de Bd, e de 78,40 a 392,0 em amostras de própolis verde, demonstrando propriedades biológicas semelhantes entre a própolis verde e Bd, como por exemplo, efeito bactericida contra *S. aureus*, conforme o presente estudo (Tabela 16). Marcucci *et al.* (2001) também demonstraram que a própolis verde teve efeito antimicrobiano contra as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, sendo que a planta Bd foi provavelmente a fonte da produção desta própolis. Os mesmos autores, em comparações entre suas determinações, demonstraram que frente ao micro-organismo *P. aeruginosa*, o extrato exprimiou menor inibição, nas três frações de extratos de própolis verde obtidas, sendo que o *S. aureus* foi o que melhor foi inibido pelas frações analisadas, corroborando com este estudo.

Sartor *et al.* (2013) obtiveram CIM (mg mL^{-1}) semelhantes ao deste estudo com *Baccharis dentata* sobre *S. aureus*, sendo mais expressivo em amostra coletada no outono, em frações de diclorometano (0,75). Os mesmos autores também demonstraram inibição de *P. aeruginosa* e *E. coli*. Extratos etanólicos de co-produtos da indústria de vinhos foram mais eficazes contra micro-organismos patogênicos de ordem alimentar (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis – *S. enterica*), se comparados a extratos aquosos (POVEDA *et al.*, 2018), corroborando com o presente estudo.

Salazar *et al.* (2018) estudaram recentemente a atividade antimicrobiana CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de óleos essenciais da planta Bd, obtidos por hidrodestilação, contra os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, cujos valores foram de 102, ≥ 1024 e ≥ 1024 , respectivamente. Estes dados demonstram que os compostos presentes no óleo essencial de Bd também expressam atividade antimicrobiana (CIM), bem como os compostos extraídos pelos protocolos do presente estudo, principalmente naqueles obtidos pelo processo de extração ETANOL 40%.

Vale salientar, que a atividade antioxidante expressa em CE_{50} para ETANOL 40% no presente estudo, também obteve maior eficácia dentre as demais avaliadas. As preparações de Bd em etanol podem vir a ser eficientes antibióticos contra as bactérias testadas, mas ainda carecem de mais estudos sobre a aplicação, formulação e toxicidade, por exemplo. O fato das bactérias gram-negativas possuírem uma camada externa a membrana celular de lipossacarídeo, as tornam mais protegidas (PAZ *et al.*, 2015), se comparadas as bactérias gram-positivas, devido a isto, há maior facilidade de eliminar gram-positivas frente a maior facilidade de o extrato interagir com a membrana celular, conforme ocorreu no presente estudo.

Assim como em CE_{50} , os extratos, em seus pontos ótimos, obtidos pelo PSL, não tiveram atividade global superior ao processo de extração ETANOL 40% (obtido pelo PFC 2³). Desta forma, é importante observar que neste caso, a utilização do solvente etanol, como extrator, foi determinante na eliminação de maior espectro de micro-organismos. Pois, diferentes solventes extratores podem extrair diferentes variedades e quantidades de moléculas, as quais, por mecanismos próprios de ação, podem exibir maiores ou menores intensidades para uma mesma atividade biológica (KUBILIENE *et al.*, 2015).

Conforme Zielinski *et al.* (2014), atividades biológicas como propriedades anticancerígenas, neuroprotetivas, hipoglicêmicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias, por exemplo, podem estar vinculadas as atividades antioxidantes dos compostos químicos, como ácidos fenólicos e flavonoides, presentes em chás. Sendo assim, as atividades antimicrobianas apresentadas por este estudo podem estar ligadas a atividade antioxidante que possuem os extratos preparados a partir de Bd, e estas, por sua vez, podem ser remetidas ao conteúdo total e variedade de compostos fenólicos presentes nestes extratos.

Conforme Chaves *et al.* (2018) a busca por novos compostos antimicrobianos que possam ser transformados em medicamentos é de interesse mundial, já que é fomentada pelo surgimento de bactérias resistentes as várias drogas já existentes. Vale salientar, como já foi demonstrado no presente estudo, de forma geral, que as correlações de Pearson, entre o CFT e as atividades antioxidantes determinadas, foram maiores nos extratos etanólicos, e estes, por

sua vez, apresentaram efeitos biológicos potencializados em relação aos demais extratos avaliados.

5.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) das condições ótimas de extração, de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd), dos planejamentos fatoriais completos (PFC's) e do planejamento de misturas Simplex-Lattice (PSL)

Pertencem a classe dos compostos fenólicos os ácidos fenólicos, subdivididos em ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos, polifenóis e os flavonoides, podendo ser encontrados em plantas, frutas e vegetais, com a função de protegê-los contra danos oxidativos, e devido a isto, tem sido extraídos e utilizados pelos seres humanos como fonte de antioxidantes de origem natural, e de descoberta de novas biomoléculas (DO *et al.*, 2014), sendo a extração e identificação, bem como estudos de atividades biológicas deles, de grande interesse industrial.

Dentre os dez compostos analisados via CLAE-UV, dos extratos produzidos a partir de Bd, pelas condições determinadas pelos pontos ótimos de extração (PFC's e PSL), foram identificadas e quantificadas seis substâncias fenólicas nos cinco diferentes extratos produzidos (ÁGUA, ETANOL 40%, ACETONA 40%, PONTO CENTRAL, DESEJABILIDADE), estando presentes ácidos fenólicos e flavonoides (Tabela 17). Foram identificados: ácido ferúlico (AF), catequina (CAT), epigallocatequina (EPG), miricetina (MI), quercetina (QUE) e rutina (RU) (Figura 21) (Tabela 17).

Tabela 17. Compostos fenólicos quantificados referentes as condições ótimas de extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd), dos planejamentos fatoriais completos (PFC) e de mistura de solventes Simplex-Lattice (PSL).

Compostos Fenólicos	TR ¹	Curva de calibração ²	(R ²)*	ÁGUA ³	ETANOL 40% ⁴	ACETONA 40% ⁵	TR ¹	PONTO CENTRAL ⁶	DESEJABILIDADE ⁷
Ácido Ferúlico	19,07	y = 113,61x - 12,98	0,9990	0,629±0,011 ^C	1,459±0,015 ^B	1,740±0,005 ^A	21,60	0,426±0,001 ^D	0,420±0,008 ^D
Catequina	4,81	y = 179,43x - 30,56	0,9982	0,055±0,0004 ^B	0,055±0,0005 ^B	0,050±0,0004 ^B	9,70	1,798±0,009 ^A	1,803±0,018 ^A
Epicatequina	8,07	y = 123,22x - 54,57	0,9995	nd	nd	nd	14,90	nd	nd
Epigallocatequina	3,66	y = 210,26x + 6,31	0,9999	0,028±0,00009 ^E	0,035±0,0002 ^C	0,032±0,0003 ^D	7,50	0,050±0,0004 ^B	0,055±0,0002 ^A
Epigallocatequina galato	8,53	y = 117,06x - 59,58	0,9955	nd	nd	nd	15,30	nd	nd
Hesperidina	20,05	y = 40,76x + 4,50	0,9993	nd	nd	nd	26,70	nd	nd
Miricetina	21,24	y = 105,83x - 64,59	0,9972	nd	nd	nd	27,50	0,342±0,001 ^A	0,292±0,0004 ^B
Quercetina	29,62	y = 64,11x - 0,68	0,9999	0,025±0,0009 ^E	0,060±0,001 ^D	0,105±0,001 ^B	33,60	0,117±0,001 ^A	0,092±0,0003 ^C
Rutina	13,83	y = 29,71x + 1,19	0,9996	0,122±0,002 ^B	0,144±0,005 ^A	0,120±0,002 ^B	21,60	nd	nd
Vitexina	15,14	y = 38,89x + 1,62	0,9972	nd	nd	nd	21,60	nd	nd
Rendimento em função de 1g de Bd (b.s) (%)				0,086	0,175	0,205		0,273	0,266

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Resultados expressos em mg g⁻¹ de planta, em base seca (b.s); ¹Tempo de retenção; ²Equação de reta (y=ax+b); Extratos PFC: ³80 °C, 90 minutos, água; ⁴80 °C, 90 minutos, água; ⁵80 °C, 90 minutos, etanol (40%); ⁶80 °C, 90 minutos, acetona (40%); Extratos PSL: ⁶80 °C, 180 minutos, (água:etanol:acetona / 33:33:33); ⁷80 °C, 180 minutos, (água:etanol:acetona / 56:0:44); Extratos preparados a partir de A2 (amostra liofilizada durante 24 horas); nd (não detectado); *Linearidade.

O AF e a CAT foram os componentes majoritários identificados entre os extratos analisados. A metodologia de extração ACETONA 40% foi a que mais concentrou AF, com diferenças significativas ($p < 0,05$) para os demais extratos avaliados, conforme a relação: ACETONA 40% > ETANOL 40% > ÁGUA > PONTO CENTRAL = DESEJABILIDADE. O composto CAT foi melhor extraído pelas metodologias PONTO CENTRAL e DESEJABILIDADE, sendo iguais significativamente estas extrações ($p < 0,05$), e diferindo das demais realizadas, conforme a relação: PONTO CENTRAL = DESEJABILIDADE > ACETONA 40% = ETANOL 40% = ÁGUA. Os compostos EPG e QUE, tiveram diferenças significativas de rendimento de extração nas cinco metodologias de extração avaliadas, sendo que EPG teve maior concentração pela metodologia DESEJABILIDADE, e QUE pela PONTO CENTRAL, se comparado com as demais metodologias de extração avaliadas. O composto MI foi extraído apenas pelas metodologias otimizadas do PSL, enquanto que o composto RU, apenas pelas otimizadas dos PFC's.

Vale salientar que os extratos otimizados pelas metodologias de extração dos PFC's permaneceram durante 90 minutos a 80 °C e os do PSL durante o dobro do tempo, na mesma temperatura. Tais condições podem ser responsáveis pelo decréscimo da quantidade de AF e pela maior extração de CAT nos extratos do PSL. Assim como, pela presença de RU nos extratos dos PFC's e ausência nos do PSL, bem como, a ausência de MI nos extratos dos PFC's e presença nos dos PSL. Nos extratos do PSL pode ter havido degradação parcial e total de AF e RU, respectivamente. Tal fato talvez esteja relacionado a exposição ao calor por maior tempo. Por outro lado, o maior tempo de extração poderia ter atuado favoravelmente na extração de CAT, EPG e MI.

O perfil químico avaliado pelo presente estudo demonstrou a presença de vários flavonoides e do ácido fenólico AF, corroborando assim com Funari *et al.* (2007), que explicitaram que o perfil cromatográfico da própolis verde, demonstrou em sua maior parte flavonoides e ácidos aromáticos, sendo qualitativamente similar ao perfil de Bd. Visto que, para a própolis, os principais compostos responsáveis pelas suas propriedades funcionais são os fenólicos e flavonoides (ANDRADE *et al.*, 2017). O AF é um ácido hidroxicinâmico e pode ser responsável por efeitos antioxidantes, biológicos, fotoprotetores, e conservador de alimentos, por exemplo (SOUZA *et al.*, 2008; GRAF, 1992). A catequina é um composto pertencente a classe dos flavonoides, comumente encontrado em chás, sendo potencialmente benéfica à saúde humana (PAULI *et al.*, 2014; ARTS *et al.*, 2000), já que possui efeito antioxidante (SKROZA *et al.*, 2015). AF e CAT tem potencial para apresentar efeitos biológicos a partir de seus mecanismos antioxidantes.

Foram identificados ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeico, ácido p-cumarico, ácido cinâmico, artepillin-C e ácido ferúlico) em amostras de Bd (BACHIEGA *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2008; FUNARI *et al.* 2007). Estes compostos podem vir a remeter atividades biológicas (ZIELINSKI *et al.*, 2014), podendo servir para um preparo farmacêutico.

Foi identificado em própolis brasileira AF, no intervalo de 0,03 a 3,36 mg 100 mg⁻¹ de extrato (SALGUEIRO e CASTRO, 2016), sendo esta concentração, inferior a encontrada pelo presente estudo. Park *et al.* (2004) identificaram e quantificaram AF, em própolis verde, em broto da folha de Bd, em folha não expandida de Bd, e em folha expandida de Bd, obtendo os valores respectivos de 2,4, 4,8, 3,82 e 4,18 (mg g⁻¹, de amostra ou de planta seca), sendo estes dados um pouco superiores aos encontrados pelo presente estudo. Sun *et al.* (2018) encontraram em própolis chinesa, um intervalo de 0,22 a 0,94 (mg g⁻¹) de AF, sendo mais concentrado em solvente etanólico, e também o composto QUE, o qual variou de 0,10 a 0,22 (mg g⁻¹), tais dados estão semelhantes ao presente estudo. Andrade *et al.* (2017) encontraram para própolis verde concentrações (mg g⁻¹) de 0,45, 0,16, 0,01, respectivamente para QUE, RU, CA, corroborando com o presente estudo.

Sendo assim, diferentes rendimentos podem ser encontrados, conforme as diferentes preparações de extratos, a forma e a localização geográfica de cultivo, de uma mesma amostra, encorajando as pesquisas de otimização de extração de compostos, adequando-as a cada variedade amostral e a realidade regional, em função da finalidade de utilização dos compostos extraídos. Pois, Sevgi *et al.* (2015) estudaram as atividades antioxidantes de alguns ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido protocatecuico e ácido siríngico), individualmente, demonstrando que conforme a concentração testada, pode-se obter alta atividade antioxidante, sendo comparáveis ao BHT e ao BHA (antioxidantes sintéticos), podendo assim, tais compostos ser aproveitados para várias tecnologias de subsistência aos seres humanos.

No presente estudo, os rendimentos dos compostos fenólicos identificados, baseados em 1 (um) grama de Bd (b.s), foram: 0,086% (ÁGUA), 0,175% (ETANOL 40%), 0,205% (ACETONA 40%), 0,273% (PONTO CENTRAL) e 0,266% (DESEJABILIDADE) (Tabela 17). Paula *et al.* (2017), visavam extrair e concentrar compostos de Bd, através de extração por fluido supercrítico. Estes autores obtiveram o rendimento de substâncias fenólicas identificadas de 0,39 a 0,54%, em dióxido de carbono, e aproximadamente 1,69%, em extração sequencial, em água, etanol e dióxido de carbono, com base em um grama da planta Bd. Sendo assim, vale ressaltar que os dados do presente estudo evidenciaram o potencial bacteriostático e bactericida

da planta Bd, mesmo em extratos não purificados e não concentrados. Tais etapas poderiam refletir no aumento do potencial antimicrobiano, bem como na concentração de compostos e atividades bioativas das preparações dos extratos em seus pontos ótimos de extração (ÁGUA, ETANOL 40%, ACETONA 40%, PONTO CENTRAL e DESEJABILIDADE), determinados pelo presente estudo.

A natureza química das substâncias fenólicas e a presença de outros derivados, como os flavonoides, são fatores contribuintes para a atividade antioxidante total de extratos de plantas, visto que, os ácidos fenólicos, por exemplo, são fortes antioxidantes e agem inativando radicais livres por meio de seus grupos hidroxila (SEVGI *et al.*, 2015). Outro exemplo, na própolis, compostos flavonoides e fenólicos diversos, podem ser os responsáveis pelas altas atividades antioxidantes relatadas, sendo que a polaridade e característica de cada solvente também podem extrair diferentes quantidades e variedades desses compostos (ZABAIYOU *et al.*, 2017; SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

Sendo assim, os compostos contidos nos extratos dos pontos ótimos de extração (PFC's e PSL), podem ser responsáveis pelas atividades antimicrobianas (CIM e CBM), e antioxidantes já demonstradas por este estudo, e visto que a metodologia de extração ETANOL 40% possibilitou um espectro maior quanto ao efeito bactericida, é possível inferir então, que não apenas a concentração de compostos extraídos pode ser responsável por uma atividade biológica, mas a qualidade antioxidante do composto bioativo extraído. Para tal afirmação, pode-se tomar como exemplo o estudo de Sevgi *et al.* (2015), os quais evidenciaram variáveis atividades antioxidantes, para os ácidos fenólicos avaliados de forma individual (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido protocatecuico e ácido siríngico), podendo esses compostos exibir diferentes intensidades de atividades biológicas, as quais dependem de mecanismos de reações próprios.

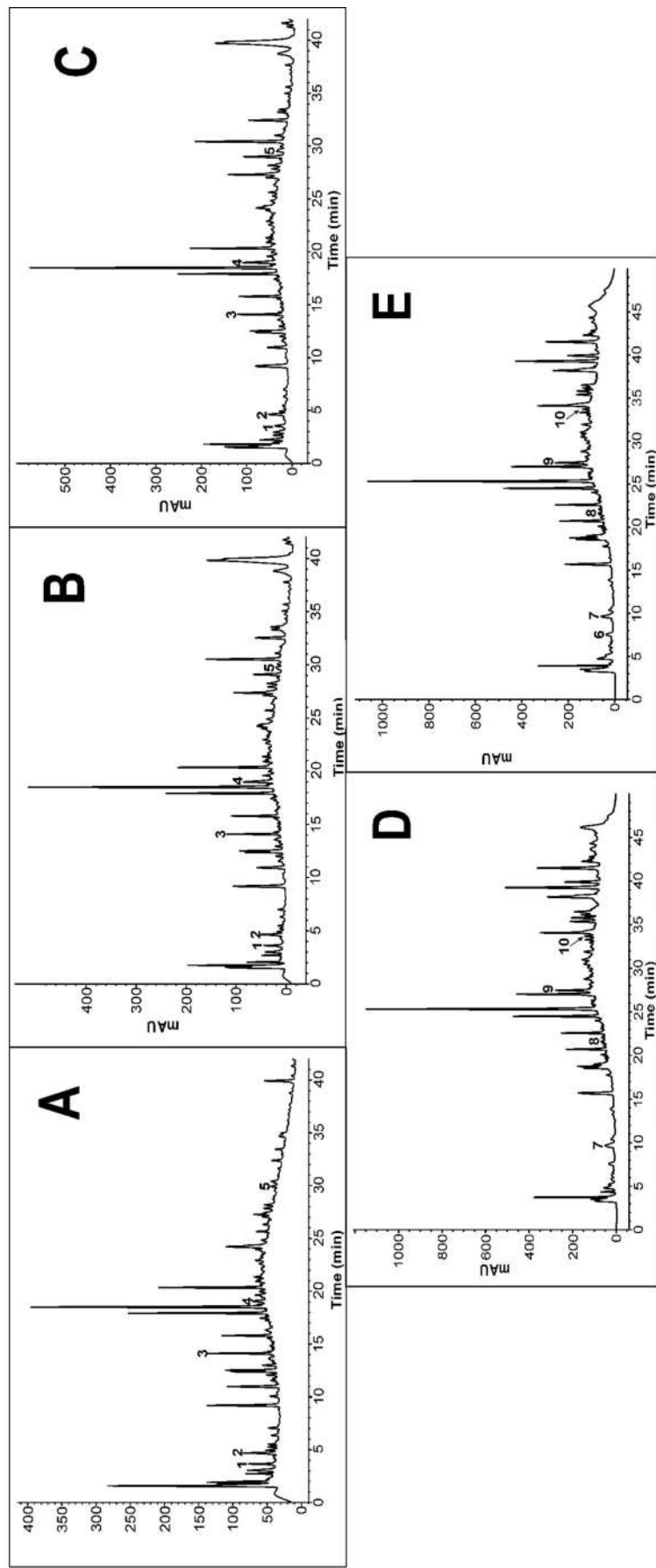


Figura 21. Perfis cromatográficos dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) referente aos pontos ótimos de extração (PFC's e PSL). Aonde: A (80 °C, 90 minutos, água), B (80 °C, 90 minutos, etanol 40%), C (80 °C, 90 minutos, acetona 40%), D (80 °C, 180 minutos, água:etanol:acetona – 33:33:33), E (80 °C, 180 minutos, água:etanol:acetona – 56:0:44) em extratos preparados a partir de amostras de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) liofilizadas (A2); Aonde: picos 1 (Epigalocatequina), 2 (Catequina), 3 (Rutina), 4 (Ácido ferúlico), 5 (Quercetina), 6 (Epigalocatequina), 7 (Mirricetina), 8 (Ácido ferúlico), 9 (Mirricetina) e 10 (Quercetina).

5.4 PRODUÇÃO DE UM PRODUTO LIOFILIZADO A PARTIR DE *Baccharis dracunculifolia* (Bd)

Os compostos metabólicos secundários dos vegetais são difíceis de extração e isolamento em grandes quantidades, podendo ser caros para aquisição em função da baixa quantidade disponível, o que os torna exaustivamente pesquisados pelos cientistas (GARCIA *et al.*, 2010). Unido a este fato e com objetivo de transformar a metodologia do preparo do extrato de Bd, em seu ponto ótimo de extração, já definido por este estudo, em um material com validade estendida, mantendo e concentrando as suas propriedades e, preservando-as por maior tempo, bem como propiciando sua utilização para testes subsequentes, desenvolveu-se o produto liofilizado a partir da planta Bd (PL-Bd), fixando-se as variáveis de preparo estudadas ao longo desta pesquisa. Pois, conforme Teixeira *et al.* (2017), a estabilidade física e química no estado sólido e a facilidade de preparar comprimidos e cápsulas a partir de extratos em pó secos, tornam essas preparações vantajosas na utilização dos princípios ativos extraídos.

A partir do estudo dos PFC's, bem como, nas avaliações subsequentes dos extratos em suas melhores condições de extração, foi possível fixar as variáveis de extração: tempo (90 minutos), temperatura (80 °C), solvente e concentração (etanol 40%), e preparo da amostra de Bd (amostra A2, liofilizada durante 24 h), para compor a metodologia de produção do PL-Bd. A partir do PSL foi observado que a utilização de acetona a 44% era a preparação mais eficaz em rendimento de compostos bioativos. No entanto, em função do espectro maior de efeito antimicrobiano, optou-se ainda pela utilização de etanol 40%, para compor a metodologia de produção do PL-Bd. Desta forma, realizou-se como estudo adicional, para obtenção de maiores informações sobre estabilidade térmica, rendimento, e concentração, dos compostos extraídos, testes de avaliação de maior tempo de extração (de 60 até 720 minutos), e de saturação do solvente etanol 40% (de 40 até 120 mg mL⁻¹).

Para CFT, DPPH e FRAP não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de extração avaliados. Para ABTS, o tempo de extração de 720 minutos não diferiu de 360 minutos, mas diferiu dos demais tempos de extração (Tabela 18). Sendo assim, apesar do aumento de tempo de extração ser considerado um alterador de economicidade em um processo produtivo, optou-se por fixar um tempo de extração de 180 minutos, devido as possíveis variações na qualidade de uma mesma amostra coletada, e pelos estudos prévios dos PFC's, aonde o tempo de 90 minutos teve apontamento como o tempo de extração que ocasionava no maior rendimento de compostos bioativos de Bd, dentre os demais tempos utilizados (30 e 60 minutos).

Tabela 18. Rendimentos de compostos bioativos extraídos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) nos diferentes tempos de extração.

Minutos	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
60	33,29±0,27 ^A	198,06±9,16 ^A	653,08±22,32 ^A	302,87±1,40 ^B
180	32,99±0,58 ^A	222,34±21,33 ^A	659,56±24,56 ^A	296,17±8,84 ^B
360	34,75±1,20 ^A	197,41±3,89 ^A	682,84±29,85 ^A	320,29±14,85 ^{AB}
540	34,48±0,29 ^A	222,48±12,22 ^A	656,02±41,25 ^A	306,93±4,48 ^B
720	35,70±2,18 ^A	202,73±15,84 ^A	703,90±40,50 ^A	340,40±20,71 ^A

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); CFT: mg EAG g⁻¹; DPPH: $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$; ABTS: $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$; FRAP: $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{g}^{-1}$;

Um problema recorrente nos processos de extração de compostos antioxidantes é a preservação, pois são instáveis, e podem ser degradados com aumento da temperatura (FELIX *et al.*, 2018). A relação entre o tempo e a temperatura de extração é muito importante no que tange a extração de compostos bioativos, pois temperaturas muito altas e indefinidas ao tipo de matriz, podem degradar compostos importantes e sensíveis como fenólicos e flavonoides, por isto é importante limitá-los (POMPEU *et al.*, 2009).

Desta forma, é importante observar que o aumento do tempo de extração não provocou redução considerável nos resultados de CFT, DPPH, FRAP e ABTS (Tabela 18). Tal informação é relevante, pois aumenta as possibilidades de inclusão do produto liofilizado em algum processo produtivo, devido a estabilidade considerável ao calor de seus componentes bioativos, tendo-se assim, a possibilidade de se trabalhar com temperaturas de processamento relativamente altas, por um grande espaço de tempo, sem grandes prejuízos na inativação dos compostos bioativos presentes. De qualquer maneira, é imprescindível a realização de testes a este respeito das etapas do processamento, bem como do produto que se deseja produzir.

Então, para efeitos de segurança da efetividade da extração, já que embora trate-se de uma mesma planta, algumas condições, segundo Embuscado *et al.* (2015), podem fazer variar o rendimento de compostos bioativos em uma planta, tais como: cultivo, clima e localização geográfica do plantio. Sendo assim, optou-se por fixar 180 minutos de extração como parte da metodologia de preparo do produto liofilizado pensando-se que, em uma extrapolação para escala industrial, não haveria como controlar rigorosamente a composição química de diferentes coletas de Bd (amostragem coletada). Gullón *et al.* (2018) obtiveram o tempo de extração de 180 minutos como mais efetivo (testaram de 30 a 300 minutos) para extrair compostos fenólicos com atividade antioxidante, de amostras de resíduos de erva mate, em etanol 50%, e na concentração de 50 mg mL⁻¹, estando próximas a este trabalho, nas condições adequadas por eles.

O tempo de extração de 180 minutos pode ser considerado relativamente baixo, em vista da variabilidade encontrada na literatura, adequados aos mais diferentes tipos de matrizes, com objetivo de extrair compostos bioativos de materiais vegetais: extração em amostras do gênero *Baccharis* durante 15 dias (BRIGHENTE *et al.*, 2007), durante 3 h em amostra de *Baccharis trimera* (BESTEN *et al.*, 2013) e em amostra de laranja (MASKOVIC *et al.*, 2016), durante 7 dias em amostra de *Baccharis dentata* (SARTOR *et al.*, 2013), durante 42 h em amostras de Bd (MARTINEZ-CORREA *et al.*, 2012), durante 7 dias em amostras de própolis verde (MELLO e HUBINGER, 2012), durante 8 dias em amostras de própolis, alho e oregano (GUZMÁN e CRUZ, 2017), por exemplo. Os diferentes métodos de extração visam sempre algum propósito importante, como por exemplo, aumentar a extração de um componente de atividade biológica com importância em determinada área da ciência. Justificando sua importância, justifica-se o método de extração, pois para o produto final, a sua eficácia e importância dela, são os objetivos finais e determinarão o valor de mercado do então, produto.

Em produção de extratos, a quantidade de compostos fenólicos com atividade antioxidante extraídos, pode ser afetada pela relação entre a quantidade de massa da amostra que sofrerá extração, com aquela do solvente utilizado para a extração (CASTRO-LÓPEZ *et al.*, 2017). Sendo que, a relação amostra/solvente é uma variável importante do ponto de vista industrial, pois através da melhor relação, focada no maior rendimento daquilo que se deseja, é possível economizar no consumo de solvente (SPIGNO e De FAVERI, 2009).

Sendo assim, a saturação de 25 mL de solvente etanol 40%, sobre as variáveis respostas CFT, DPPH, ABTS e FRAP, foi expressa por mililitros (mL) de extrato (Tabela 19), e por grama de Bd (A2 – amostra liofilizada durante 24 h) (Tabela 20), ambos calculados em (b.s) de Bd. O cálculo por mL de extrato foi realizado com objetivo de demonstrar a concentração dos compostos a cada 1 mL de extrato, a fim de se conseguir maior rendimento de produto liofilizado a cada 25 mL de extrato produzido, reduzindo-se a quantidade de solvente utilizada, o volume de solvente a ser rota-evaporado, e o volume final de material a ser liofilizado. Já o cálculo por grama de Bd, objetivou-se apenas em mostrar os quantitativos das respostas em função da quantidade de amostra utilizada.

Tabela 19. Efeito da relação amostra Bd/solvente etanol (40%) no rendimento da extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) em um mililitro de solvente.

Relação Bd/solvente (mg mL ⁻¹)	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
40	70,30±0,63 ^C	97,48±2,33 ^C	1381,35±44,05 ^C	543,78±22,51 ^C
60	86,34±1,57 ^B	115,85±4,59 ^B	1699,95±49,46 ^B	662,66±28,20 ^B
80	94,18±4,65 ^A	133,72±4,36 ^A	1920,46±89,59 ^A	802,76±41,40 ^A
100	104,47±1,57 ^A	140,09±3,40 ^A	2040,88±53,00 ^A	821,07±22,24 ^A
120	101,70±6,42 ^A	134,88±7,78 ^A	2010,97±152,34 ^A	803,92±71,77 ^A

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); CFT: mg EAG mL⁻¹; DPPH: $\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$; ABTS: $\mu\text{mol TEAC mL}^{-1}$; FRAP: $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ mL}^{-1}$.

Tabela 20. Efeito da relação amostra Bd/solvente etanol (40%) no rendimento da extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) em um grama de Bd.

Relação Bd/solvente (mg mL ⁻¹)	CFT	DPPH	FRAP	ABTS
40	35,83±0,55 ^A	248,45±7,21 ^A	782,35±28,71 ^A	248,45±22,50 ^A
60	29,91±0,55 ^B	200,69±8,59 ^B	654,37±20,53 ^B	200,69±8,28 ^B
80	25,26±1,15 ^C	172,07±5,34 ^C	549,15±24,96 ^C	172,07±13,71 ^B
100	21,86±0,39 ^D	146,56±4,05 ^D	474,46±13,56 ^D	146,56±6,55 ^C
120	17,44±1,14 ^E	115,69±6,94 ^E	383,30±29,87 ^E	115,69±15,18 ^D

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); CFT: mg EAG g⁻¹; DPPH: $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$; ABTS: $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$; FRAP: $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$.

A saturação de 25 mL de solvente extrator etanol (40%) ocorreu nas concentrações de 80, 100 e 120 mg mL⁻¹, as quais diferiram das concentrações de 40 e 60 mg mL⁻¹. Considerando-se então, que a quantidade máxima de compostos bioativos extraídos por mL de solvente é atingida quando a relação massa de Bd/volume de etanol 40% está entre 2 e 3 gramas, em 25 mL (Tabela 19).

Por outro lado, quando verificou-se o rendimento por quantidade de massa de Bd utilizada, a concentração 40 mg mL⁻¹, de forma geral, diferiu das demais concentrações avaliadas para todas as variáveis respostas estudadas. Para economia de amostra de Bd utilizada, a relação mais eficiente seria atingida quando a relação massa de Bd/volume de etanol 40%, fosse de 1 grama em 25 mL (Tabela 20), estando próximos estes dados aos encontrados por Cujic *et al.* (2016) na extração de compostos fenólicos de *Aronia melanocarpa* (chokeberry) em extração etanólica (50%) por maceração e com a encontrada por Gullón *et al.* (2018), que estabeleceram etanol 50% para amostras de resíduos de erva mate tendo a concentração de maior rendimento de extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante de 50 mg mL⁻¹.

Considerou-se para efeitos de produção do PL-Bd, o custo do processo de liofilização, optando-se então, por padronizar a metodologia de produção em função do maior quantitativo de compostos bioativos presentes em 1 mL de etanol 40%. Em função de vários estudos nas

literaturas consultadas (NICOLAI *et al.*, 2016; MENEZES *et al.*, 2016; BESTEN *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012; MENG *et al.*, 2012; DEVATEKAL *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2004), os quais utilizam a relação 1:10 (massa/volume) na extração de compostos bioativos, fixou-se a concentração intermediária (100 mg mL^{-1}), como parte da metodologia de produção do PL-Bd. Unido a justificativa utilizada para a fixação do tempo de extração (EMBUSCADO *et al.*, 2015), na qual os compostos bioativos podem sofrer diferenças de rendimentos em função do cultivo, clima e localização geográfica de plantio. Pensando-se assim, na viabilidade industrial de produção, aonde o processo produtivo precisa adequar-se as variâncias que sofre sua matéria-prima durante seu estágio de cultivo.

Após todos os estudos demonstrados por este trabalho, o PL-Bd foi produzido conforme metodologia descrita pela Figura 14, com a pesagem de 2,5 gramas de A2, adicionados de 25 mL de solvente etanol 40%, submetidos ao banho-maria termostaticado com agitação periódica de 10 em 10 minutos, durante 180 minutos. Sendo posteriormente resfriado, filtrado qualitativamente, submetido a rota-evaporação, congelamento e liofilização. O produto obtido (PL-Bd) apresentou tom amarelado, constituído de pequenas e desuniformes partículas, e com aroma semelhante ao da própolis verde (Figura 22).



Figura 22. Produto liofilizado produzido a partir de extração de compostos bioativos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd).
Fonte: Da Autora, (2018).

Para se produzir o produto liofilizado (PL-Bd), construiu-se a seguinte relação, desde a coleta da planta Bd até a obtenção do PL-Bd:

- Primeira secagem (A1 – amostra seca em temperatura ambiente por aproximadamente 2 dias, ao abrigo da luz): houve o rendimento aproximado de 60%;

- Rendimento de A2 (amostra liofilizada durante 24 h): aproximadamente 4,62%;
- Rendimento do PL-Bd a partir de A2: 15,30%;
- Rendimento considerando todas as etapas para se chegar ao PL-Bd final: a cada 1000 gramas de folhas coletadas, houve rendimento de 600 gramas de folhas secas (A1), estas, por sua vez, possuíam 24,69% de umidade, que para chegar a A2 perderam ainda 20,07% de umidade, chegando a 4,62% de umidade. Então, de 600 gramas de A1 foi possível se chegar a 479,58 gramas de A2. Foi considerado A2 em (b.s), então na verdade tinha-se 457,18 gramas de amostra. Logo, 100 gramas de A2 geraram 15,30 gramas de PL-Bd, assim como 467,18 gramas geraram 71,48 gramas de PL-Bd. Finalmente: 1000 gramas de amostras coletadas estavam para 100% de amostra, assim como, 71,48 gramas de PL-Bd estariam para aproximadamente 7% de PL-Bd.

Desta maneira, foi possível se conhecer o rendimento total do processo para se chegar ao produto final. Foram necessários 1 Kg de folhas da planta *Baccharis dracunculifolia* (*in-natura*), para se produzir 70 gramas de PL-Bd pela metodologia estudada por este trabalho.

Um dos objetivos da produção do PL-Bd foi, naturalmente, concentrar e conservar as propriedades até então analisadas. Em comparação a corrida 7 do PFC, para o solvente ETANOL 40% (Tabela 8), o PL-Bd foi capaz de concentrar compostos bioativos, conforme evidenciam as determinações de CFT, DPPH, FRAP, ABTS e CE₅₀, em aproximadamente 355, 389, 322, 533 e 34 (%), respectivamente (Tabela 21).

Tabela 21. Concentração dos parâmetros bioativos CFT, DPPH, FRAP, ABTS e CE₅₀ no produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd) em comparação ao extrato etanólico de Bd.

Parâmetro bioativo	PL-Bd	ETANOL 40%	*Concentração
CFT	122,29±2,51	35,08	349
DPPH	675,35±29,73	185,23	365
FRAP	2271,87±79,36	675,25	336
ABTS	1217,96±138,13	341,24	357
CE ₅₀	122,78±1,79	164,41	34

*Percentual de aumento; CFT: mg EAG g⁻¹; DPPH: μmol Trolox g⁻¹; ABTS: μmol TEAC g⁻¹; FRAP: μmol Fe²⁺ g⁻¹; CE₅₀: μg mL⁻¹ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

A Tabela 22 foi construída com intuito de demonstrar os mais variados métodos de extração de compostos bioativos de plantas do gênero *Baccharis* e de amostras de própolis com seus respectivos rendimentos em compostos bioativos extraídos, bem como, as atividades já estudadas e comprovadas.

Tabela 22. Variação de compostos bioativos conforme as diferentes extrações realizadas em amostras de plantas do gênero *Baccharis* e de própolis em diferentes pesquisas realizadas.

Autores	Amostra e extração	Observações extras	CFT	DPPH	FRAP	ABTS	CE ₅₀	Propriedade identificada
Presente estudo (PL-Bd)	Bd: etanol 40%	Extrato liofilizado. Solúvel em água. Presente estudo.	122,29	675,35	2271,87	1217,96	122,78	Antioxidante e Antimicrobiana
Andrade <i>et al.</i> (2017)	Própolis verde	Etanol 70%, 2 g em 15 mL, 35 °C, durante 60 minutos, centrifugação, nova extração.	90,55	4554,35	-	2214,96	-	Antioxidante
	Própolis marron		55,74	4431,00	-	1868,45	-	
	Própolis vermelha		91,32	4663,80	-	2913,55	-	
Teixeira <i>et al.</i> (2017)	Bd	Extrato seco obtido pela técnica de secagem por pulverização por congelamento atmosférico em leite fluidizado.	-	-	-	-	250	Antioxidante e estabilidade de extração de compostos bioativos
Veiga <i>et al.</i> (2017)	Bd: ethanol	Maceração por 2 semanas para etanol. Para hexano, via Soxhlet, seguido de rota- <i>evaporação</i> e res-suspensão em etanol.	1,00	-	-	-	124,49	Antioxidante e Antimicrobiana
	Própolis verde: etanol		10,00	-	-	-	13,09	
	Bd: hexano		0,05	-	-	-	141,45	
	Própolis verde: hexano		<0,05	-	-	-	95,86	
Machado <i>et al.</i> (2016)	Própolis verde: Fluido supercrítico	Para etanol (80%): 2g em 15 mL, 70 °C, durante 15 minutos, shaker, constante agitação, 2ª extração.	De 111,33 a 137,52	-	-	-	De 97,74 a 85,34	Antioxidante, Antimicrobiana e Antitumoral
	Própolis verde: etanol		De 160,98 a 181,71	-	-	-	De 31,80 a 157,39	
Sobrinho <i>et al.</i> (2016)	<i>B. trivenis</i>	Hidrodestilação durante 2 horas.	-	-	-	-	49,00	Antifúngica
Simirgiotis <i>et al.</i> (2016)	<i>B. tola</i> : clorofórmio	Extração em clorofórmio (25 °C) durante um minuto, extração por 3 vezes. Seguido de rota- <i>evaporação</i> .	63,95	-	53,30	-	9,24	Antioxidante
Machado <i>et al.</i> (2015)	Própolis verde: Fluido supercrítico	Extração por fluido supercrítico com co-solvente etanol.	De 66,72 a 80,30	-	-	-	De 145,25 a 193,75	Antioxidante
Nina <i>et al.</i> (2015)	Diversas amostras de própolis: metanol	Três extrações, em metanol, rota- <i>evaporação</i> , liofilização.	-	-	-	De 225,43 a 2666,56	De 4,54 a 58,74	Antioxidante e Antimicrobiana
Sartor <i>et al.</i> (2013)	<i>B. dentata</i> : metanol	Extração em metanol 80% (0,1 grama de amostra), temperatura ambiente.	De 36,44 a 45,83	-	-	-	De 2,3 a 1,31	Antioxidante e Antimicrobiana
Figueiredo-Rinhel <i>et al.</i> (2013)	Bd: etanol	Amostragem: 5 g em 100 mL, em etanol (90%, 40 °C), durante 120 minutos, 2ª extração, rota- <i>evaporação</i> .	De 100 a 170	-	-	-	-	Antioxidante, Inibição de neutrófilos que geram ERO
Martinez-Correa <i>et al.</i> (2012)	Bd : água	Extração etanol (60 °C) ou água (25 °C): 3 g em 10 mL durante 42 horas, 2ª extração.	142,30	-	-	-	158,00	Antioxidante
	Bd: etanol		197,00	-	-	-	50,00	
	Bd: Fluido supercrítico		48,40	-	-	-	>200,00	
Mello e Hubinger (2012)	Própolis verde: água	Em água ou etanol (80%). Relação 2:8 (m/m) amostra/solvente, temperatura ambiente durante 7 dias, diferentes pH.	De 35,48 a 45,41	-	De 180,95 a 1038,09	-	-	Antioxidante
	Própolis verde: etanol		De 49,80 a 100,59	-	De 219,04 a 2078,57	-	-	

CFT: mg EAG g⁻¹; DPPH: μmol Trolox g⁻¹; ABTS: μmol TEAC g⁻¹; FRAP: μmol Fe²⁺ g⁻¹; CE₅₀: μg mL⁻¹ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl); *B. Baccharis*; PL-Bd: produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd); ERO: espécies reativas de oxigênio.

Em função dos autores citados (Tabela 22), foi possível observar que a elaboração do PL-Bd, permitiu extrair compostos com atividades bioativas em níveis próximos aos mais rentáveis que vem sendo relatados pela literatura, em amostras do mesmo gênero e nas de própolis. Importante destacar, que o PL-Bd foi elaborado a partir de um solvente verde (etanol), necessitando-se de baixa concentração (40%) para extrair compostos com atividade biológica relevante, com tempo de extração relativamente baixo (180 minutos), que passou por testes de adequação de saturação do solvente utilizado, visando redução do volume do solvente utilizado, e do volume de amostra a ser liofilizada, facilitando a rota-*evaporação*. Vale salientar que o PL-Bd é solúvel em água, resiste por tempo considerável a temperatura de 70 °C, a qual é relativamente alta. Isso permite um maior número de possibilidades de inclusão como ingrediente ativo em algum produto final. Porém mais propriedades podem ser testadas *in vitro* ou *in vivo* a partir do PL-Bd, ou a partir de produtos preparados contendo ele como ingrediente ativo.

A Instrução Normativa 3, do Ministério da Agricultura, de 19 de janeiro de 2001, em seu anexo VI, a qual regulamenta a identidade e qualidade da própolis no Brasil, destinada ao comércio nacional ou internacional, determina que o teor mínimo de 5% (m/m) em compostos fenólicos em amostra de própolis e de 0,5% (m/v) em extrato etanólico de própolis (BRASIL, 2001). Ao consultar a Tabela 21, após conversões das unidades, tanto para a amostra de PL-Bd (12,20%), quanto para a amostra de Bd em extrato etanólico (3,7%), haveria o cumprimento da legislação em termos de compostos fenólicos em um produto natural comparável a própolis, por exemplo.

É possível encontrar no mercado produtos adicionados de própolis, de ordem médica (xaropes), de ordem odontológica (cremes dentais, enxaguantes bucais), de ordem farmacêutica (produtos cosméticos e de higiene), e também de ordem alimentícia (como conservante alimentar) (SILVA *et al.*, 2016; LACERDA *et al.*, 2011), e sendo assim, o PL-Bd torna-se promissor a compor produtos de ordens semelhantes aos preparados com adição de própolis.

Com a elaboração do PL-Bd foi possível também concentrar os constituintes com propriedades antimicrobianas, já que as concentrações mínimas necessárias para obtenção dos efeitos bacteriostáticos (CIM) e bactericidas (CBM), foram menores (Tabela 23) que as concentrações mínimas necessárias para obtenção dos mesmos efeitos nas demais preparações de extratos em seus pontos ótimos de extração (Tabela 16).

Tabela 23. Atividade antimicrobiana e efeito bactericida do produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd) e do extrato etanólico de Bd.

Condições de Extração	Bactérias (n=2)				
	Gram-positivas		Gram-negativas		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis
CIM mg mL⁻¹ (n=2)					
ETANOL 40% ^a	12,75	3,19	6,37	51,00	25,50
PL-Bd ^b	1,49	0,37	1,49	-	0,74
Ampicilina	0,00019	R ^c	0,00156	R ^c	0,01250
Gentamicina	0,00039	0,00156	0,00019	0,00156	0,00312
CBM mg mL⁻¹ (n=2)*					
ETANOL 40% ^a	51,00	51,00	51,00	i.n	i.n
PL-Bd ^b	5,96	0,74	5,96	i.n	1,49

Extrato PFC: ^a80 °C, 90 minutos, etanol (40%); ^bMetodologia de produção do PL-Bd (Figura 14); Extratos preparados a partir de A2 (amostra liofilizada durante 24 horas); ^cResistência ao antibiótico; CIM (Concentração inibitória mínima); CBM (Concentração bactericida mínima); - Não houve efeito na concentração testada (CIM); *Menor concentração de extrato necessária para eliminar no mínimo 99% dos micro-organismos (CBM) para PL-Bd, para ETANOL 40% (eliminação de 90% dos micro-organismos); i.n (ineficiente para CBM); PL-Bd: produto liofilizado de Bd; Resultados expressos em (b.s).

O PL-Bd foi capaz de eliminar até 99% dos micro-organismos *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *S. enterica*. Vale salientar, que as preparações de extratos em seus pontos ótimos de extração, especificamente a preparação ETANOL 40%, tiveram efeito bactericida, no entanto, foram capazes de eliminar até 90% dos micro-organismos *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli*, enquanto que o PL-Bd foi mais letal, eliminando até 99%, e eliminando também *S. entérica* (Tabela 23). Tal fato deve-se a concentração e manutenção de compostos com atividades biológicas, desde o processo de otimização de extração de compostos bioativos de Bd até chegar a elaboração do PL-Bd.

Machado *et al.* (2016) realizaram extrações em amostras de própolis verde brasileira por fluido supercrítico (CO₂) e pelo método convencional. A extração convencional consistiu de 2 g de amostra em 15 mL de etanol (80%), a 70 °C, durante 15 minutos em shaker, em constante agitação, com nova extração do sobrenadante. Estes autores determinaram para *S. aureus*, valores de CIM na faixa de 0,05 a 1,6 mg mL⁻¹ e de CBM de 0,80 a 1,6 mg mL⁻¹. Para *E. coli* CIM na faixa de 0,40 a 1,6 mg mL⁻¹ e para CBM não houve efeito nas concentrações testadas, para extração convencional. Ainda conforme Machado *et al.* (2016) as maiores concentrações dos extratos preparados, por fluido supercrítico, foram necessárias para apresentar efeitos bactericidas e bacteriostáticos contra *S. aureus*, sendo que contra *E-coli* não foi detectado efeito bactericida.

Veiga *et al.* (2017) obtiveram valores de CIM (mg mL⁻¹), para diferentes cepas de *S. aureus* de 0,19 a 0,77 em amostras de Bd e 0,078 a 0,392 em amostras de própolis verde. Salazar *et al.* (2018) obtiveram CIM (mg mL⁻¹) para óleos essenciais da planta Bd, obtidos por

hidrodestilação, contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, de 0,102, $\geq 1,024$ e $\geq 1,024$, respectivamente.

Em função dos autores supracitados, é possível afirmar que o PL-Bd apresenta concentrações baixas e eficazes contra os micro-organismos patogênicos testados, sendo que elas também estão próximas as concentrações testadas pela literatura. O PL-Bd pode ser inserido em formulações farmacêuticas de ordem antimicrobiana, de acordo com os estudos realizados até agora. No entanto, carece de mais estudos sobre estabilidade de fórmula, atividade enquanto produto final, toxicidade, por exemplo. Mas, o fato de ser um produto liofilizado, com algumas propriedades já estudadas, agrega a vantagem de ser um material de metodologia de obtenção padronizada, facilitando os testes de aplicações subsequentes.

Dentre os doze (12) compostos avaliados via CLAE-UV foram identificadas e quantificadas seis substâncias fenólicas no PL-Bd, estando presentes ácidos fenólicos e flavonoides (Tabela 24). Foram identificados: ácido ferúlico (AF), apigenina (AP), catequina (CAT), canferol (CAN), epigallocatequina (EPG) e miricetina (MI) (Tabela 24) (Figura 23).

Tabela 24. Compostos fenólicos identificados no produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd).

Compostos Fenólicos	TR ¹	Curva de calibração ²	(R ²)*	PL-Bd
Acido Ferúlico	21,60	y = 113,6x – 12,98	0,9990	1,637±0,037
Apigenina	39,30	y = 85,62x + 16,16	0,9999	0,502±0,009
Catequina	9,70	y = 179,43x – 30,56	0,9982	6,618±0,064
Canferol	39,90	y = 63,95x – 21,68	0,9998	0,734±0,012
Epicatequina	14,90	y = 123,22x – 54,57	0,9995	nd
Epigallocatequina	7,50	y = 210,26x + 6,31	0,9999	0,208±0,0006
Epigallocatequina galato	15,30	y = 117,06x – 59,58	0,9955	nd
Hesperidina	26,70	y = 40,76x + 4,50	0,9993	nd
Miricetina	27,50	y = 105,83x – 64,59	0,9972	0,335±0,005
Quercetina	33,60	y = 64,11x – 0,68	0,9999	nd
Rutina	21,60	y = 29,71x + 1,19	0,9996	nd
Vitexina	21,60	y = 38,89x + 1,62	0,9972	nd
Rendimento em função de 1 g de Produto Liofilizado (b.s) (%)				1,003

Resultados expressos em mg g⁻¹ de PL-Bd (b.s); ¹Tempo de retenção; ²Equação de reta; Metodologia de produção do PL-Bd (Figura 14); Extratos preparados a partir de A2 (amostra liofilizada durante 24 horas); nd (não detectado); *Linearidade.

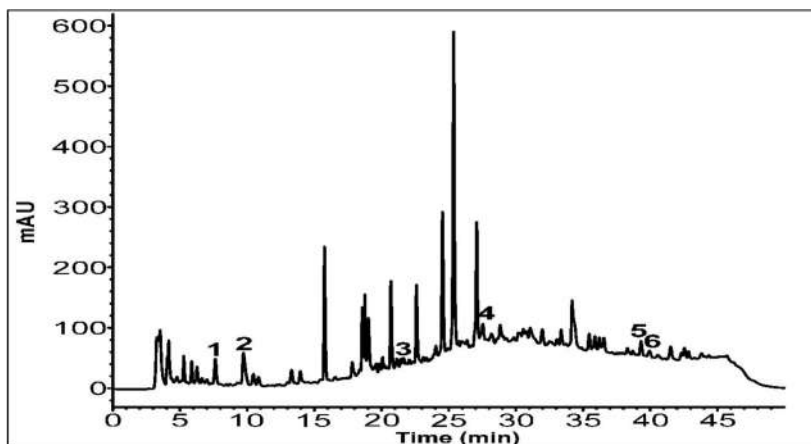


Figura 23. Perfil cromatográfico do produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd). Aonde: pico 1 (Epigallocatequina), 2 (Catequina), 3 (Ácido ferúlico), 4 (Miricetina), 5 (Apigenina) e 6 (Canferol).

Em comparação a concentração de compostos avaliados nos extratos otimizados (PFC's e PSL), de 0,086 a 0,266% (Tabela 17), foi possível maior concentração dos compostos identificados e quantificados (1,003%) no PL-Bd (Tabela 24).

Andrade *et al.* (2017) identificaram e quantificaram 26 dos 28 compostos analisados, em própolis verde, chegando ao rendimento em compostos fenólicos identificados, baseados em 1 (um) grama de própolis verde, de 2,47%. Comparado aos compostos pelo presente estudo, identificados e quantificados, Andrade *et al.* (2017) quantificaram (mg g^{-1}) AP (0,01), CAT (0,01), CAN (1,48), epicatequina EPC (0,01) e RU (0,45), totalizando 0,196%, visto que EPC foi quantificado por estes autores, mas não encontrado no produto liofilizado pelo presente estudo, bem como AF, EPG e MI, que foram identificados e quantificados pelo presente estudo, e não por Andrade *et al.* (2017).

Com base nessas informações, sugere-se que conseguimos atingir uma concentração maior global e relevante dos compostos avaliados pelo presente estudo através do preparo do PL-Bd. É possível que o aumento da concentração de compostos fenólicos extraídos, presentes no PL-Bd, proporcionaram melhor resultado de CE_{50} (Tabela 21), sendo que o valor de $122,78 \mu\text{g mL}^{-1}$ encontrado para PL-Bd pode ser considerado relevante (REYNERTSON *et al.*, 2005), o qual pode estar atrelado a uma menor concentração necessária de extrato para obter efeitos bactericidas e bacteriostáticos contra os micro-organismos patogênicos *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *S. enterica* (Tabela 23), tal qual ocorreu neste estudo.

Com o aumento do tempo de extração de 90 minutos (PFC's) para 180 minutos (PSL), já era possível notar, de forma geral, um aumento na concentração de flavonoides, bem como uma redução na concentração de AF. Para o PL-Bd, o composto CAT foi majoritário dentre os quantificados, seguido por AF, CAN, AP, MI e EPG. Conforme Pauli *et al.* (2014) o processo

de extração mais utilizado para extrair CAT é água fervente. O PL-Bd foi produzido inicialmente por aquecimento a 90 °C, durante 180 minutos, com grande proporção de água (60%) em relação ao solvente orgânico empregado, e redissolvido em solvente aquoso para análise cromatográfica, sendo a afinidade da CAT pela condição de extração empregada para produção do PL-Bd justificativa para o aumento da concentração dela no PL-Bd, se comparado aos demais processos de extração anteriormente mencionados por este estudo.

Vale salientar que, no PL-Bd podem haver mais compostos bioativos, os quais não foram identificados e quantificados em função de não haver padrões para o estudo e que esta seria uma tarefa importante a se seguir em trabalhos futuros, para a identificação de maior espectro de compostos responsáveis pelas atividades testadas. Por fim, a CAT poderia ser um marcador de qualidade de produção, para controle de qualidade dos demais princípios ativos responsáveis pela ação deste produto, interferindo diretamente na qualidade do produto final, permitindo um controle mais efetivo de cada lote de produção. Pois, a CAT já é utilizada como substância de referência na avaliação da qualidade de chás (PAULI *et al.*, 2014), por exemplo.

5.5 PRODUÇÃO DE FILME ATIVO CONTENDO PRODUTO LIOFILIZADO DE *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd)

5.5.1 Opacidade aparente (Op) e diferença de cor (ΔE^*) dos filmes ativos

As formulações testadas permitiram a produção de filmes contínuos e coesos, apresentando ainda boa resistência durante seu manuseio. As amostras de filmes ativos sofreram alterações de opacidade, progressivas, tornando o filme mais opaco, conforme a adição de PL-Bd, havendo diferença significativa ($p < 0,05$), entre as três formulações (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%). Para a diferença de cor contra o padrão branco (ΔE^*), a adição de PL-Bd de 1 e 1,5%, aos filmes, diferiram ($p < 0,05$) da amostra controle (PL-Bd 0%), demonstrando que as amostras de filmes contendo PL-Bd são mais escuras que a amostra controle (LP-Bd 0%) (Figura 24) (Tabela 25).

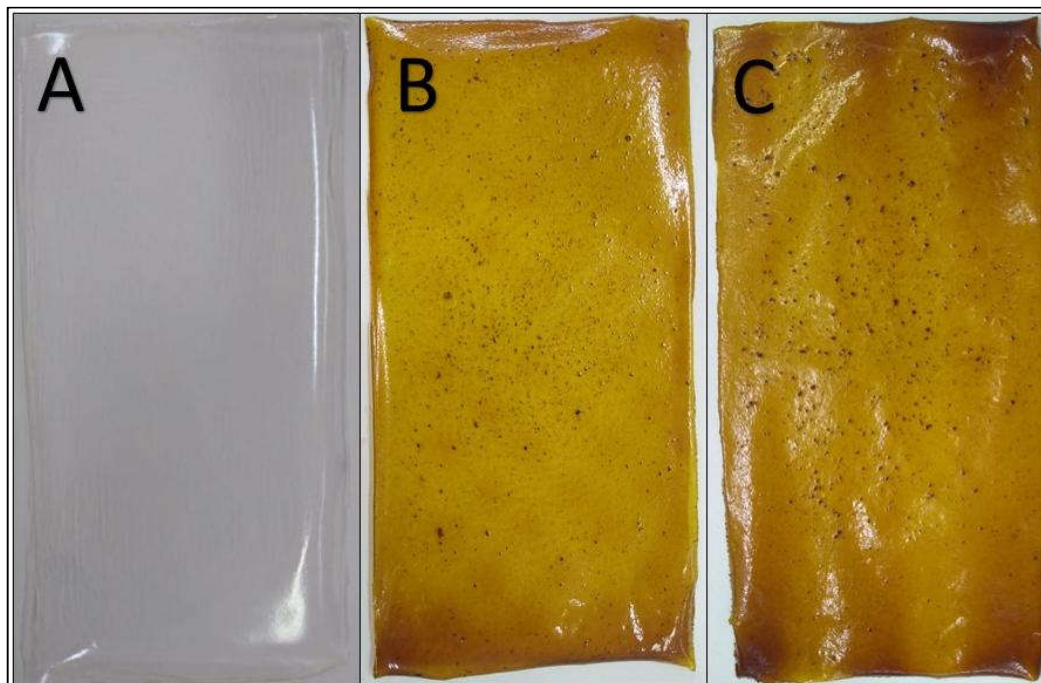


Figura 24. Filmes ativos contendo diferentes proporções de produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd). Aonde A: Controle, contendo 0% de PL-Bd (PL-Bd 0%); B: contendo 1,0% de PL-Bd (PL-Bd 1,5%); C: contendo 1,5% de PL-Bd (PL-Bd 1,5%).

Fonte: Da Autora, (2018).

Tabela 25. Opacidade aparente e diferença de cor dos filmes ativos incorporados de produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd).

Formulação	Opacidade Aparente (Op) (%)	Diferença de Cor (ΔE^*)
PL-Bd 0%	3,81±0,37 ^C	6,72±2,78 ^B
PL-Bd 1,0%	20,74±1,23 ^B	77,22±3,30 ^A
PL-Bd 1,5%	26,09±2,02 ^A	79,73±1,56 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); PL-Bd 0%: contendo 0% de PL-Bd; PL-Bd 1%: contendo 1% de PL-Bd; PL-Bd 1,5%: contendo 1,5% de PL-Bd.

A formulação controle do filme (PL-Bd 0%) apresentou-se transparente, mas a dispersão do PL-Bd pelo filme não se caracterizou como homogênea, já que é possível observar pequenas aglomerações de PL-Bd pela matriz (PL-Bd 1,0% e 1,5%) (Figura 24). Isto pode ser devido a solubilidade não completa do PL-Bd nos materiais que compõe o filme, devido a presença de pigmentos naturais contidos na planta de Bd, e/ou até mesmo devido a aglomeração de parte do PL-Bd, resultante da perda de umidade do filme após a secagem, visto que quando adicionado, em temperatura de aproximadamente 30 °C e em solução, era possível observar-se uma solução homogênea marron escura.

Araújo *et al.* (2015) também evidenciaram modificações na coloração de filmes com adição de própolis verde produzidos por *casting*, sendo semelhante a este estudo. Riaz *et al.*

(2018) também observaram diferenças significativas ($p < 0,05$), entre a amostra controle e demais amostras de filmes adicionados de extrato de cascas de maçãs liofilizadas, produzidos por *casting*, para os parâmetros de Op e ΔE^* , sendo que estes parâmetros aumentaram conforme a concentração do extrato liofilizado de maçã aumentava, também corroborando com este estudo.

É natural que os extratos de plantas adicionados a polímeros modifiquem a cor original deles (MIR *et al.*, 2018). Mas, a cor e a opacidade de um filme são parâmetros que podem afetar o grau de aceitação do consumidor (RIAZ *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018). Baixos valores de opacidade indicam uma alta transparência, que é interessante quando se deseja apresentar o produto dentro da embalagem ao consumidor, já para produtos que podem ser degradados pela presença de luz, uma alta opacidade pode ser interessante para a proteção do produto (PELISSARI *et al.*, 2012). Portanto, se o filme desenvolvido, adicionado de PL-Bd, fosse projetado para a produção de embalagens, poderia ser opção de aplicação a embalagens de produtos que necessitassem de fotoproteção, por exemplo.

5.5.2 Propriedades mecânicas e espessura dos filmes ativos

Os dados de tensão na ruptura (TS), módulo de Young (MY) e alongação na ruptura (E), dos filmes ativos contendo PL-Bd, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), se comparados a amostra controle (PL-Bd 0%), porém não se observaram diferenças significativas entre as formulações contendo PL-Bd. A espessura também sofreu variação com a adição de PL-Bd na matriz polimérica (Tabela 26). Como da formulação dos filmes ativos foram subtraídas quantidades de polímero para incorporação de PL-Bd, para se manter a concentração de sólidos na solução filmogênica em 4% (m/v), uma redução das propriedades mecânicas era esperada.

Tabela 26. Características mecânicas dos filmes ativos incorporados de produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd).

Formulação	Espessura ¹	Tensão na Ruptura (TR) ²	Módulo de Young (MY) ²	Elongação na Ruptura (E) ³
PL-Bd 0%	0,11±0,02	6,21±1,85 ^A	15,63±4,12 ^A	353,41±48,99 ^A
PL-Bd 1,0%	0,16±0,04	3,03±1,97 ^B	11,61±3,44 ^B	223,25±86,46 ^B
PL-Bd 1,5%	0,16±0,02	1,45±0,52 ^B	9,55±3,01 ^B	143,35±22,91 ^B

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); PL-Bd 0%: contendo 0% de PL-Bd; PL-Bd 1%: contendo 1% de PL-Bd; PL-Bd 1,5%: contendo 1,5% de PL-Bd; ¹milímetros; ²MPa (mega Pascal); ³Percentual.

Filmes ativos biodegradáveis (quitosana-glicerol-óleo essencial de *Perilla frutescens* L. Britt.), produzidos por *casting*, apresentaram comportamento semelhante ao presente estudo, demonstrando maior TR e E, pela amostra controle, se comparado aquelas de filme contendo óleo essencial, corroborando com este estudo (ZHANG *et al.*, 2018). Filmes ativos biodegradáveis (amido-carragena-glicerol-extrato etanólico de própolis vermelha), produzidos por *casting*, também apresentaram comportamento semelhante ao presente estudo, demonstrando maior TR e MY, pela amostra controle, se comparada a amostra de filme contendo própolis vermelha, mas diferiu do presente estudo quanto ao comportamento da elongação, que foi acentuada (5,6 vezes) pela adição da própolis (CHANG-BRAVO *et al.*, 2014).

Araújo *et al.* (2015) obtiveram valores, para filmes adicionados de extrato etanólico de própolis, obtidos por *casting* (amido-glicerol-extrato etanólico de própolis), comparados a este estudo, próximos (de 5,5 a 6,7 MPa), maiores (de 145 a 265 MPa) e menores (de 12,6 a 27,4%), para TR, MY e E, respectivamente. Sendo que, para MY e TR, houve comportamento semelhante, com amostra controle apresentando maiores valores se comparado às adicionadas de produto natural, demonstrando que a adição de própolis assim como de PL-Bd, podem reduzir a rigidez (MY) de um material. Ocorre que para Araújo *et al.* (2015) e Chang-Bravo *et al.* (2014) houve um comportamento diferente quanto a elongação, devido ao fato de a própolis adicionada possuir propriedades plastificantes, o que não ocorreu pela adição de PL-Bd.

De qualquer modo, os filmes ativos adicionados de PL-Bd demonstraram elasticidade relativamente boa, que pode ser observado pelo considerável valor de E (2,23 e 1,43 vezes de aumento em relação ao tamanho original, para PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%, respectivamente). Quando há adição de algum composto a um polímero, por exemplo, um composto antioxidante, fatores como natureza do produto adicionado ao polímero, natureza do polímero, tipo e concentração do aditivo adicionado, podem modificar as propriedades mecânicas do polímero gerado (ASSIS *et al.*, 2017; GANIARI *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2015).

Segundo Pelissari *et al.* (2012), as embalagens precisam ser produzidas focadas no objetivo principal que é a proteção, resistindo a quebra e a abrasão, apresentando-se também flexíveis para adaptar-se a possíveis deformações da embalagem durante o manuseio do produto. Ocorre que, mesmo que o filme produzido por este estudo não desempenhe este papel fielmente, havendo outras características importantes, tais como funcionalidade na liberação de moléculas antioxidantes com atividade antimicrobiana, por exemplo, há de se estudar aplicações específicas nas quais a característica funcional do filme seja mais importante que a resistência mecânica do mesmo. Podendo inclusive, ser direcionado para as indústrias

alimentícia e/ou farmacêutica, conforme a funcionalidade e viabilidade econômica de produção do filme.

5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes ativos

As microestruturas dos filmes ativos não sofreram modificações perceptíveis devido a incorporação do PL-Bd. Todas as formulações apresentaram as áreas de fratura similares, sem a presença de domínios, poros ou rachaduras, sugerindo que a formação natural do polímero na composição estudada não foi interferida pela adição de PL-Bd (Figura 25).

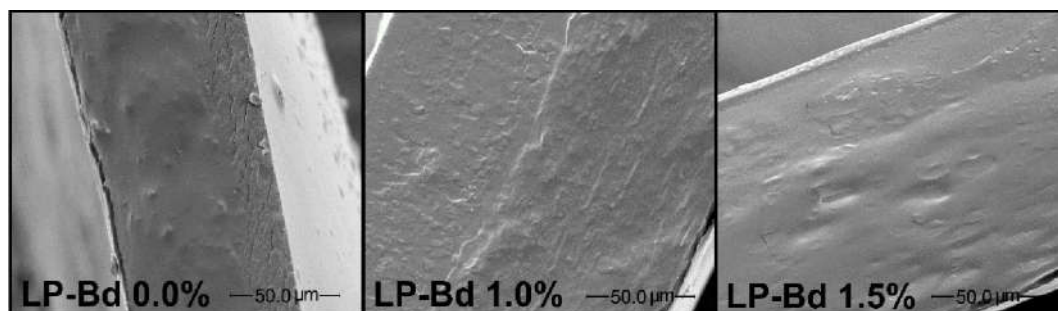


Figura 25. Micrografias das secções transversais das superfícies de fratura das diferentes formulações dos filmes ativos contendo produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd). Aonde PL-Bd 0%: contendo 0% de PL-Bd; PL-Bd 1,0%: contendo 1,0% de PL-Bd; PL-Bd 1,5%: contendo 1,5% de PL-Bd.

Corroborando com este estudo, a adição de própolis verde em diferentes proporções aos filmes ativos biodegradáveis (amido-glicerol-extrato etanólico de própolis), produzidos por *casting*, não modificou a estrutura dos filmes produzidos (ARAÚJO *et al.*, 2015). Já a adição de extratos de própolis vermelha a filmes ativos biodegradáveis (amido-carragena-glicerol-extrato etanólico de própolis vermelha), produzidos por *casting*, causaram modificações nas microestruturas das amostras contendo os extratos naturais, promovendo irregularidades estruturais, se comparadas a amostra controle (CHANG-BRAVO *et al.*, 2014). A adição de óleo essencial de *Perilla frutescens* L. Britt., ao filme biodegradável de quitosana e glicerol, produzidos por *casting*, também causou modificação na estrutura do polímero se comparado a amostra controle (ZHANG *et al.*, 2018). Em vista disso, foi possível inferir que a adição de PL-Bd não influencia na estrutura do polímero nas concentrações formuladas, mas que adição de materiais a fórmula podem vir a causar modificações naturalmente, conforme sua característica e interação com a matriz polimérica.

4.9.1 Migração do PL-Bd para diferentes simulantes de bases alimentícias, atividade antioxidante, e atividade antimicrobiana, dos filmes ativos

Com as formulações dos filmes contendo substâncias bioativas do PL-Bd, foi possível notar que houve a incorporação e manutenção de um percentual alto dessas substâncias, já que liberaram praticamente a totalidade dos compostos incorporados nas matrizes dos filmes (T5), exceto para o teste de migração em solvente ácido acético, caracterizando as formulações dos filmes PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%, como filmes ativos (Tabela 27) (Figura 26). Tal fato sugere que as aglomerações de PL-Bd pelo polímero (Figura 24) não foram prejudiciais à migração das substâncias bioativas, já que migraram da matriz polimérica para os solventes de teste nos quais estavam em contato.

Tabela 27. Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e migração de compostos bioativos, dos filmes ativos incorporados de produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd).

Solvente	T1	T2	T3	T4	T5	DPPH*	Rnd*	CFT*	Rnd*
Água PL-Bd 1,0%	26,11 ^C	29,42 ^{BC}	29,93 ^{BC}	34,28 ^{AB}	37,87 ^A	126,02±6,47 ^{cd}	86	25,23±0,25 ^d	95
Água PL-Bd 1,5%	38,66 ^C	46,67 ^B	48,80 ^{AB}	50,30 ^{AB}	53,81 ^A	173,27±8,04 ^b	77	37,42±0,54 ^b	92
Ácido acético (3%) PL-Bd 1,0%	15,05 ^B	15,54 ^B	15,04 ^B	17,86 ^{AB}	20,07 ^A	71,64±4,76 ^e	49	14,57±0,85 ^f	55
Ácido acético (3%) PL-Bd 1,5%	22,69 ^C	25,62 ^{BC}	25,91 ^B	28,37 ^B	33,05 ^A	110,68±5,81 ^d	49	21,06±0,18 ^e	52
Etanol (10%) PL-Bd 1,0%	32,22 ^C	35,23 ^{BC}	33,84 ^{BC}	36,86 ^B	40,96 ^A	136,08±5,72 ^c	93	27,85±0,29 ^{cd}	105
Etanol (10%) PL-Bd 1,5%	43,94 ^B	49,81 ^{AB}	50,34 ^{AB}	52,43 ^A	54,66 ^A	176,07±10,10 ^b	78	38,75±1,76 ^{ab}	95
Etanol (50%) PL-Bd 1,0%	33,70 ^C	40,26 ^B	41,67 ^{AB}	43,40 ^{AB}	48,09 ^A	157,33±2,31 ^b	107	28,79±0,47 ^c	108
Etanol (50%) PL-Bd 1,5%	49,26 ^C	55,85 ^B	57,90 ^B	59,52 ^B	67,16 ^A	215,06±9,11 ^a	95	40,95±0,79 ^a	101

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); T1-T5: 90, 180, 360, 540 e 1500, minutos, expressos em % de atividade antioxidante (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl); CFT: mg EAG g⁻¹ de filme; DPPH: µmol Trolox g⁻¹ de filme; Rnd: Rendimento da migração de PL-Bd (%), por grama de PL-Bd adicionado; * Após 25 horas de experimento.

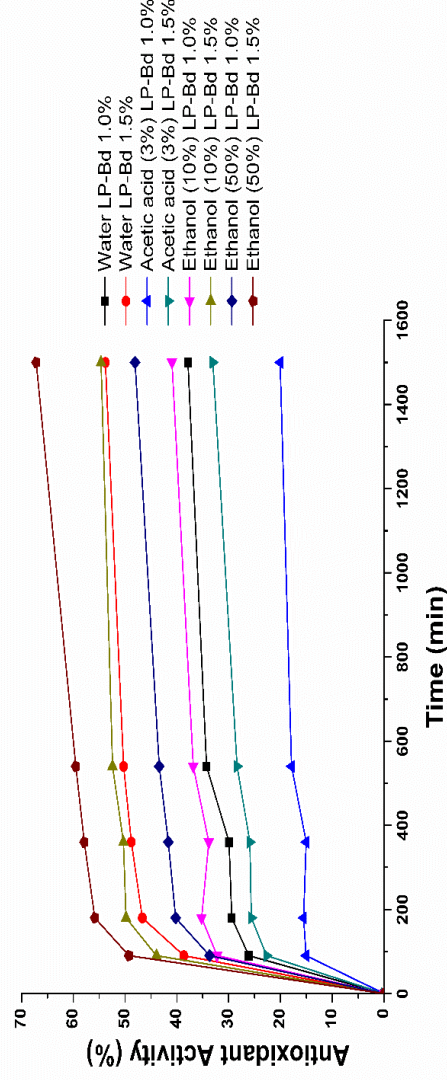


Figura 26. Migração de compostos bioativos pelos filmes ativos adicionados de produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd) em função do tempo de contato com diferentes solventes.

Com exceção do solvente ácido acético, também é importante notar que em 90 minutos de contato com os solventes (T1), mais de 50% dos compostos bioativos adicionados, encontravam-se solubilizados nos solventes avaliados, e em 25 h (T5) quase 100% dos compostos fenólicos adicionados em forma de PL-Bd estavam em solução (Tabela 27), semelhante ao que ocorreu nos estudos de Chang-Bravo *et al.* (2014), que tiveram aproximadamente 52% dos compostos polifenólicos liberados em meia hora, com a migração de até 85% deles após 6 h de contato.

Caso avaliarmos pontualmente T5, numericamente, ocorre a seguinte relação de migração de moléculas bioativas em função do solvente avaliado: Etanol (50%) PL-Bd 1,5% > Etanol (10%) PL-Bd 1,5% > Água PL-Bd 1,5% > Etanol (50%) PL-Bd 1,0% > Etanol (10%) PL-Bd 1,0% > Água PL-Bd 1,0% > Ácido acético PL-Bd 1,5% > Ácido acético PL-Bd 1,0%. Sendo assim, podemos notar que, mesmo contendo 1,5% de PL-Bd, o solvente ácido acético não apresenta, relativamente, uma alta solubilização de moléculas bioativas, pois esta solubilização é inferior às demais testadas, e praticamente iguala-se a solubilização das moléculas do PL-Bd 1,0% no mesmo solvente de teste.

O regulamento da União Europeia (EU 10/2011), o qual dispõe sobre assuntos que envolvem o contato de alimentos com materiais plásticos, prevê a simulação de migração de componentes dos plásticos para matrizes alimentares de diferentes características químicas, aonde solventes são utilizados como simulantes alimentares. De acordo com esta norma, o ácido acético a (3%) (m/v), é um simulante de migração de substâncias com caráter hidrofílico para o alimento, que engloba matrizes alimentícias com pH inferior a 4,5, simulando alimentos ácidos. O etanol (10%), simula migração de substâncias de caráter hidrofílico com pequeno caráter alcoólico. O etanol (50%), é um simulante para matrizes lipofílicas e para matrizes com teor alcoólico superior a 20%, os quais são capazes de extrair matrizes lipofílicas. E a água é um simulante de migração de substâncias com caráter hidrofílico.

Tais informações expõe a afinidade das moléculas presentes no PL-Bd, e então incorporadas aos filmes ativos, por matrizes de caráter lipofílico. Desta forma, o PL-Bd, pode vir a ser candidato a ingrediente de formulação de produtos gordurosos, como cremes e pomadas, por exemplo, pois se solubilizaria melhor nesta matriz. Ou, de embalagens com migração intencional dos compostos para produtos cárneos ou oleosos, podendo ser um candidato a preservação da rancidez oxidativa desses produtos, mas não sendo indicado a aplicação em produtos para migração intencional para meios ou produtos ácidos, como iogurtes, por exemplo.

Do ponto de vista farmacológico, conforme Lopes *et al.* (2005), o sucesso da liberação de fármacos (moléculas) por uma matriz polimérica é dependente da tecnologia de fabricação e das características físicas e físico-químicas do polímero formado. No caso dos polímeros que compõe os materiais produzidos pelo presente estudo, em função de que, tanto o amido quanto o PVA são polímeros de caráter hidrofílico, a liberação rápida das moléculas imobilizadas no polímero ocorre devido a afinidade da matriz polimérica por solventes aquosos, sendo assim, a água das soluções também atua entumescendo o polímero, e propiciando a migração das moléculas antioxidantes do PL-Bd inicialmente imobilizadas, para os diferentes solventes que foram postas em contato. Sendo que, o PL-Bd migra proporcionalmente a sua afinidade pelos solventes em contato, e no caso a maior migração ocorreu em solvente etanólico 50%, sendo esta condição muito próxima ao protocolo de extração inicial de extração de compostos bioativos da Bd para produção do PL-Bd.

Assim como para a indústria farmacêutica (LOPES *et al.*, 2005), estudos de migração de compostos imobilizados intencionalmente, em matrizes poliméricas, também são importantes para a indústria alimentícia (GANIARI *et al.*, 2017; RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2017a), pois em ambas áreas, a migração de moléculas ativas pelos polímeros (liberação controlada de medicamentos, efeito antioxidante de embalagens, por exemplo) possuem grande importância funcional para o objetivo de ação do produto final (efeito do medicamento, embalagem ativa, por exemplo).

A atividade antioxidante (DPPH) e os CFT, variaram de 71,64 a 215,06 μmol Trolox e de 14,57 a 40,95 mg GAE, ambos expressos por g de filme, entre os solventes e os filmes ativos adicionados de PL-Bd avaliados em T5, respectivamente (Tabela 27). Conforme os resultados de migração de compostos bioativos nos solventes avaliados, a atividade antioxidante e CFT, foram maiores em etanol (50%) contendo 1,5% de PL-Bd, demonstrando que há proporcionalidade entre os dados obtidos ao longo deste estudo de aplicação. Os testes contendo formulações de filme controle (PL-Bd 0%) não exibiram atividade antioxidante (DPPH) e CFT, nos solventes avaliados. Como já mencionado, exceto para o estudo de migração das moléculas bioativas no solvente ácido acético, a recuperação destas moléculas foi alta.

Araújo *et al.* (2015) produziram filmes ativos biodegradáveis, por *casting*, contendo própolis verde nas concentrações de 0,5, 0,75 e 1,0%, e obtiveram valores aproximados de CFT de 3 a 7 mg GAE e de atividade antioxidante (DPPH) de 10 a 13 μmol Trolox, ambos expressos por g de filme. Os autores prepararam os filmes ativos com adição de extratos de própolis. O fato do presente estudo incorporar à matriz polimérica um produto de extração padronizada (PL-Bd), com maior purificação e concentração dos compostos bioativos extraídos, pode ter

permitido resultados um pouco mais rentáveis de CFT e atividade antioxidante identificadas nos filmes produzidos, em comparação aos de Araújo *et al.* (2015).

A atividade dos filmes ativos (PL-Bd 0%, PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), contra os micro-organismos patogênicos *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* e *P. aeruginosa* foi determinada e expressa em zona de inibição (mm – milímetros). As amostras controle (PL-Bd 0%) não demonstraram inibição contra os micro-organismos testados. Houve zonas de inibição pelos filmes ativos contra os micro-organismos *E. coli* e *S. Enterica*, havendo intensificação da atividade quando a concentração de PL-Bd passava de 1% para 1,5% na matriz polimérica. O micro-organismo *S. enterica* foi melhor inibido (18,88 e 19,87, mm) que o *E. coli* (16,25 e 17,23, mm), para as duas concentrações de PL-Bd adicionadas aos filmes ativos (PL-Bd 1,0% e PL-Bd 1,5%), respectivamente (Tabela 28) (Figura 27).

Tabela 28. Zonas de inibição de micro-organismos pelos filmes ativos incorporados de produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) (PL-Bd).

Formulações	Bactérias (n=3)			
	Gram-positiva (mm)	Gram-negativas (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis
PL-Bd 0%	0	0	0	0
PL-Bd 1,0%	0	16,25	0	18,88
PL-Bd 1,5%	0	17,23	0	19,87
Gentamicina*	24,01	23,40	18,76	nd

PL-Bd 0%: contendo 0% de PL-Bd; PL-Bd 1%: contendo 1% de PL-Bd; PL-Bd 1,5%: contendo 1,5% de PL-Bd; *Controles positivos (10 µg de antibiótico por disco); Expressão dos resultados: (mm - milímetros); nd: não realizado.

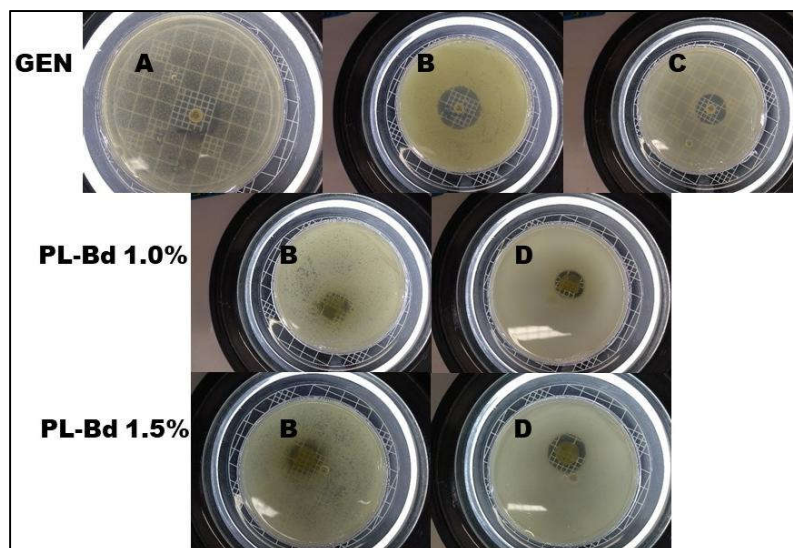


Figura 27. Zonas de inibição de micro-organismos pelos filmes ativos contendo produto liofilizado de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) PL-Bd. Aonde: GEN (Gentamicina – 10 µg de antibiótico por disco); PL-Bd 1.0% (contendo 1% de PL-Bd); PL-Bd 1.5% (contendo 1,5% de PL-Bd); A (*S. aureus*); B (*E. coli*); C (*P. aeruginosa*); D (*S. enterica*).

Fonte: Da Autora, (2019).

Zonas de inibições de 0,1 a 6,0 mm foram exibidas por filmes biodegradáveis contendo proteína de soja e ácidos orgânicos, produzidos *casting*, conforme a ordem decrescente de maior zona de inibição, contra os micro-organismos: *Listeria monocytogenes* > *E. coli* O157:H7 > *Salmonella gaminara* (ESWARANANDAM *et al.*, 2004). Filmes biodegradáveis contendo extrato etanólico de própolis verde expressaram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*, variando de 18,85 a 78,54 mm², havendo maiores efeitos contra *E. coli* (ARAÚJO *et al.*, 2015). Filmes biodegradáveis contendo óleo essencial de *Perilla frutescens* L. Britt, exibiram atividade antimicrobiana, em ordem decrescente de maior zona de inibição, contra *Bacillus subtilis* > *E. coli* > *S. aureus* (6,351, 6,324 e 6,127, mm de inibição, respectivamente) (ZHANG *et al.*, 2018). As zonas de inibições citadas foram próximas as obtidas pelos filmes ativos de Bd, e demonstraram a possibilidade de produção desses materiais como carreadores de propriedades antimicrobianas, podendo chegar em aplicações industriais de ordem farmacêutica e/ou alimentícia.

É de conhecimento tradicional, que extratos, raízes, e hastes de plantas, por exemplo, possuem efeitos contra micro-organismos patogênicos, e tais efeitos devem-se as substâncias encontradas nestes materiais vegetais, com novas substâncias podendo auxiliar na eliminação de micro-organismos resistentes às drogas existentes atualmente (GUZMÁN e CRUZ, 2017). Então, é possível que efeitos antimicrobianos de produtos naturais estejam ligados a presença de compostos fenólicos, pois essas moléculas podem alterar membranas celulares de bactérias, inibindo assim a multiplicação desses micro-organismos (CASAGRANDE *et al.*, 2018; CALDERÓN-OLIVER *et al.*, 2016).

Conforme Sung *et al.* (2013) é uma inovação produzir embalagens que incorporem agentes antimicrobianos para inibir micro-organismos alvo, não havendo muitos produtos comercializados no mercado. Visto que, é previsto crescimento contínuo para o mercado produtor de polímeros ativos, com função antimicrobiana, por exemplo (REALINI e MARCOS, 2014). Sendo assim, é importante salientar que efeitos antimicrobianos e antioxidantes de um polímero estão ligados a composição do extrato vegetal adicionado a ele e da interação dele com a matriz polimérica, e que propriedades mecânicas e visuais precisam ser melhor estudadas para que sejam aprimoradas, focadas na viabilidade de aplicação (MIR *et al.*, 2018).

Com isso, pode-se afirmar que o polímero produzido por este estudo seja chamado de “ativo”, pois devido a incorporação do PL-Bd exibiu características antioxidantes e antimicrobinas (MEXIS e KONTOMINAS, 2014).

6 CONCLUSÃO

Com a utilização dos PFC's, foi possível determinar os pontos ótimos de extração dos compostos bioativos da planta Bd para os solventes água, etanol e acetona. Essas condições apresentaram capacidade de extrair até 50% a mais CFT, com incremento de até 100% na atividade antioxidante, dentre as condições experimentais testadas.

A temperatura de extração (80 °C) foi a variável independente que mais influenciou na extração dos compostos bioativos naturais da planta Bd, demonstrando que para esta amostra (Bd), temperaturas maiores (até 80 °C) foram mais eficientes na extração de compostos bioativos.

A mistura de pequeno percentual de solvente orgânico (40%) a água, o pequeno tempo necessário para extração (90 minutos) e a baixa variação entre os dados dos preparos das amostras (A1, A2 e A3), permitem a escolha de um protocolo de extração mais econômico, dentre os protocolos testados, com menores etapas de processamento, com efeitos otimizados, e com maior aproveitamento dos compostos de interesse.

O solvente etanol provou ser o solvente mais eficiente para a extração de compostos fenólicos oriundos da Bd com atividade biológica, dentre os testados. A baixa toxicidade do etanol o torna um solvente promissor para a extração de compostos de Bd, que poderiam ser incluídos na composição de fórmulas alimentares, farmacêuticas e/ou cosméticas.

Os compostos extraídos pelo PSL e PFC's demonstraram-se efetivos contra os micro-organismos patogênicos testados, mas a preparação em etanol 40%, ponto ótimo identificado pelo PFC (2³), teve espectro maior de ação antimicrobiana, com efeito bactericida.

Com as avaliações de CFT e atividades antioxidantes de Bd, foi possível notar que estes métodos podem ser bons selecionadores de extratos com atividade biológica em função das atividades antioxidantes exibidas, porém é muito importante evidenciar, que nem sempre a extração de maior rendimento propicia a atividade biológica mais efetiva, e isto é devido a qualidade e quantidade antioxidante das moléculas extraídas pelo protocolo de extração utilizado.

A partir da condição ótima de extração obtida com base nas análises de dados dos PFC's e PSL, bem como, pelos efeitos bacteriostáticos e bactericidas, pela cinética de captura do radical DPPH (CE₅₀), pelos estudos de maiores tempos de extração de componentes bioativos, e de saturação do solvente etanol 40%, produziu-se o PL-Bd, com o objetivo de avaliar sua aplicação como possível matéria-prima, fonte de atividade biológica. O PL-Bd apresentou tom amarelado, constituído de pequenas e desuniformes partículas, tendo aroma semelhante ao da

própolis verde, tornando-o promissor para compor fórmulas alimentícias, cosméticas e/ou farmacêuticas.

A partir da produção do PL-Bd foi possível com menores concentrações de extrato, eliminar com maior eficiência (99%) alguns micro-organismos patogênicos, bem como concentrar maior percentual de componentes fenólicos, quantificados por CLAE-UV, se comparado a extratos etanólicos de Bd.

As características antioxidantes do PL-Bd, o tornam promissor candidato a ser testado pela indústria alimentícia como antioxidante de origem natural, para inclusão em produtos gordurosos alimentícios, por exemplo, prevenindo o ranço oxidativo, e aumentando a vida de prateleira destes.

A imobilização do PL-Bd em matriz polimérica, permitiu a migração dos compostos do PL-Bd para solventes de diferentes características químicas, demonstrando maior afinidade dessas moléculas em se solubilizarem em meios mais lipofílicos.

O fato de as moléculas antioxidantes, presentes no PL-Bd, previamente imobilizadas aos filmes, possuírem percentual alto de migração do filme para os solventes testados e apresentarem atividades antimicrobianas, torna esses filmes interessantes para a partir de mais estudos, ser inclusos em algum produto de interesse farmacêutico.

Dessa forma, foi possível demonstrar que a *Baccharis dracunculifolia* (Bd) apresentou potencialidades como planta fonte de compostos biológicos de interesse, carecendo de maiores estudos, mas demonstrando potencialidade como substituta alternativa da própolis verde, que é derivada da Bd, permitindo a produção de princípios ativos com atividades biológicas similares, mas com menor valor, e maior padronização dos compostos de interesse, quando comparados a própolis verde, através da extração diretamente da biomassa de Bd.

7 REFERÊNCIAS

AIRES, Carolina P.; SASSAKI, Guilherme L.; SANTANA-FILHO, Arquimedes P.; SPADARO, Augusto C. C.; CURY, Jaime A. *Baccharis dracunculifolia*-based mouthrinse alters the exopolysaccharide structure in cariogenic biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.84, p.301-307, 2016.

ALBERTI, Aline; ZIELINSKI, Acácio A. F.; ZARDO, Danianni M.; DEMIATE, Ivo M.; NOGUEIRA, Alessandro; MAFRA, Luciana I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**. v.149, p.151-158, 2014.

ALVES, Clayton Q.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.; BAHIA, Marcus V.; AGUIAR, Rosane M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**. v.33, p.2202-2210, 2010.

AMAKURA, Y.; UMINO, Y.; TSUJI, S.; ITO, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TONOGAI, Y. Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. **Food Chemistry**. v.77, p.47-56, 2002.

ANDERSON-COOK, Christiane M.; BARROR, Connie M.; MONTGOMERY, Douglas C. Response surface design evaluation and comparison. **Journal of Statistical Planning and Inference**. v.139, p.629-641, 2009.

ANDRADE, Julianna K. S.; DENADAI, Mariana; OLIVEIRA, Christean S. de; NUNES, Maria L.; NARAIN, Narendra. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidante activity of brown, green and red própolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**. v.101, p.129-138, 2017.

ARAÚJO, Grace K. P.; SOUZA, Silvio J. de S.; SILVA, Marcos V. de; YAMASHITA, Fabio; GONÇALVES, Odinei H.; LEIMANN, Fernanda V.; SHIRAI, Marianne A. Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. **International Journal of Food Science and Technology**. v.50, p.2080-2087, 2015.

ARTS, Ilja C. W.; PUTTE, Betty V. de; HOLLMAN, Peter C. H. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. **Journal of Agricultural Food Chemical**. v.48, p.1746-1751, 2000.

ASTM, 2002. American Standard Testing Methods. **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**. Document D-882-02, Philadelphia.

ASSIS, Renato Q.; LOPES, Stefani M.; COSTA, Tania M. H.; FLÔRES, Simone H.; RIOS, Alessandro de O. Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. **Industrial Crops and Products**. v.109, p.818-827, 2017.

ATHIRA, Geetha K.; JYOTHI, Alummoottil N. Cassava starch-poly(vinyl alcohol) nanocomposites for the controlled delivery of curcumin in cancer prevention and treatment. **Starch/Stärke**. v.67, p.549-558, 2015.

BACHIEGA, T. F.; SOUSA, J. P. B. de; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Natural Products Research: Formerly Natural Product Letters**. v.27(18), p.1646-1650, 2013.

BAJ, Tomasz; BARYLUK, Andrew; SIENIAWSKA, Elwira. Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L. and *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**. v.115, p.52-61, 2018.

BANKOVA, Vassya; POPOVA, Milena; TRUSHEVA, Boryana. The phytochemistry of the honeybee. **Phytochemistry**. v.155, p.1-11, 2018.

BARROS, Muriel P. de; LEMOS, Marivane; MAISTRO, Edson L.; LEITE, Mateus F.; SOUSA, João P. B.; BASTOS, Jairo K.; ANDRADE, Sérgio F de. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. v.120, p.372-377, 2008.

BESTEN, Michele A.; NUNES, Domingos S.; WISNIEWSKI, Alberto J.; SENS, Sávio L.; GRANATO, Daniel; SIMIONATTO, Edésio L.; SCHARF, Dilmara R.; DALMARCO, Juliana B.; MATZENBACHER, Nelson I. Chemical composition of volatiles from male and female specimens of *Baccharis trimera* collected in two distant regions of Southern Brazil: a comparative study using chemometrics. **Química Nova**. v.36, p.1096-1100, 2013.

BITTENCOURT, Mara L. F.; RIBEIRO, Paulo R.; FRANCO, Rosana L. P.; HILHORST, Henk W. M.; CASTRO, Renato D. de; FERNANDEZ, Luzimar G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**. v.76, p.449-457, 2015.

BOEING, Joana S.; BARIZÃO, Érica O.; SILVA, Beatriz C. e; MONTANHER, Paula F.; ALMEIDA, Vitor de C.; VISENTAINER, Jesuí V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**. v.48, p.1-9, 2014.

BOROSKI, Marcela; VISENTAINER, Jesuí V.; COTTICA, Solange M.; MORAIS, Damila R. **Antioxidantes: Princípios e Métodos Analíticos**. 1ed. Curitiba: Appris, 2015, 141p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und-technologie**. v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965. Normas Regulamentadoras do Emprego de Aditivos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 de abril de 1965.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997. Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definição, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 outubro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria nº 1004 de 11 de dezembro de 1998. Atribuição de Funções de Aditivos, 109 Aditivos e seus limites máximos de uso para a Categoria 8 – Carnes e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de dezembro de 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de janeiro de 2001.

BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI L. M.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidant Activity and total phenolic of some Brazilian Species. **Pharmaceutical Biology**. v.45, n.2, p.156-161, 2007.

BURIN, Maria V.; FERREIRA-LIMA, Nayla E.; PANCERI, Carolina P.; BORDIGNON-LUIZ, Marilde T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**. v.114, p.155-163, 2014.

CALADO, Verônica; MONTGOMERY, Douglas. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2003. 259 p.

CALDERÓN-OLIVER, Mariel; ESCALONA-BUENDÍA, Héctor B.; MEDINA-CAMPOS, Omar N.; PEDRAZA-CHAVERRI, José; PEDROZA-ISLAS, Ruth; PONCE-ALQUICIRA, Edith. Optimisation of the antioxidante and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. **Food Science and Technology**. v.65, p.46-52, 2016.

CALLISTER, Willian D. Jr.; RETHWISCH, David G. **Ciência e Engenharia de Materiais uma Introdução**. 8ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015, 817p.

CAREY, FRANCIS A. **Química Orgânica**. Porto Alegre: Bookman AMG, 2011. 7.ed, V.2, 592 p.

CASAGRANDE, Maira. **Avaliação do potencial antioxidante de coprodutos de indústrias de suco de uva e de vinho visando sua aplicação em linguça de frango**. 121 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, PR, 2014.

CASAGRANDE, Maira; ZANELA, Juliano; PEREIRA, Daiane; LIMA, Vanderlei A. de; OLDONI, Tatiane L. C.; CARPES, Solange T. Optimization of the extraction of antioxidant phenolic compounds from grape pomace using response surface methodology. **Journal of Food Measurement and Characterization**. v.13, p.1-10, 2019.

CASAGRANDE, Maira; ZANELA, Juliano; WAGNER-JÚNIOR, Américo; BUSSO, Cleverson; WOUK, Jéssica; IURCKEVICZ, Genice; MONTANHER, Paula F.; YAMASHITA, Fabio; MALFATTI, Carlos R. M. M. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: *In vitro* antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops and Products**. v.125, p.207-219, 2018.

CASTRO-LÓPEZ, Cecilia; VENTURA-SOBREVILLA, Janeth M.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, María D.; ROJAS, Romeo; ASCACIO-VALDÉS, Juan A.; AGUILAR, Cristóbal N.; MARTÍNEZ-ÁVILA, Guillermo C. G. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. **Food Chemistry**. v.237, p.1139-1148, 2017.

CHANG-BRAVO, Liliam; LÓPEZ-CÓRDOBA, Alex; MARTINO, Miriam. Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. **Reactive e Functional Polymers**. v.85, p.11-19, 2014.

CHAVES, Thiago P.; PINHEIRO, Raizza E.E.; MELO, Eveny S.; SOARES, Maria J.S.S.; SOUZA, João S.N.; ANDRADE, Tiago B.; LEMOS, Telma L.G. de; COUTINHO, Henrique D.M. Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates β -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. **Industrial Crops and Products**. v.112, p.70-74, 2018.

CHIRINOS, Rosana; ROGEZ, Hervé; CAMPOS, David; PEDRESCHI, Romina; LARONDELLE, Yvan. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz e Pavón) tubers. **Separation Purification Technology**. v.55, p.217-225, 2007.

CHITARRA, Maria I. F.; CHITARRA, Adimilson B. **Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças**. 2ed. Lavras: UFLA, 2005, 785p.

CIRILLO, Marcelo A. **Otimização na experimentação**. Lavras, 2015. 226 p.

CLSI, 2015. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Tenth Edition. Approved Standard, Document M07-A10, Pennsylvania pp. 1987-1898.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística (software)**. Viçosa: Imprensa Universitária, 2013. 442 p.

CUJIC, N.; SAVIKIN, K.; JANKOVIC, T.; PLJEVLJAKUSIC, D.; ZDUNIC, G.; IBRIC, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration traditional technique. **Food Chemistry**. v.194, p.135-142, 2016.

CVETANOVIC, Aleksandra; SVARC-GAJI, Jaroslava; MASKOVI, Pavle; SAVIC, Sasa; NIKOLIC, Ljubisa. Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. **Industrial Crops and Products**. v.65, p.582-591, 2015.

DANIELS, Paul H. A brief overview of theories of PVC plasticization and methods used to evaluate PVC-Plasticizer interaction. **Journal of Vinyl and Additive Technology**. v.15, p.219-223, 2009.

DEVATEKAL, Suresh K.; NAVEENA, B. M. Effect of salt, kinnow and pomegranate fruit by-product powders on color and oxidative stability of raw ground goat meat during refrigerated storage. **Meat Science**. v.85, p.306-311, 2010.

DEVATEKAL, Suresh K.; NARSAIAH, K.; BORAH, A. Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. **Meat Science**. v.85, p.155-159, 2010.

DICIAULA, Maria C.; LOPES, Gisely C.; SCARMINIO, Ieda S.; MELLO, João C. P. de. Optimisation of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a uv-vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química Nova**. v.37(1), p.158-163, 2014.

DO, Quy D.; ANGKAWIJAYA, Artik E.; TRAN-NGUYEN, Phuong L.; HUYNH, Lien H.; SOETAREDJO, Felycia E.; ISMADJI, Suryadi.; JU, Yi-Hsu. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food Drug Analysis**. v.22, p.296-302, 2014.

EFSA, 2011. Scientific opinion on the evaluation of the substances currently on the list in the Annex to Commission Directive 96/3/EC as acceptable previous cargoes for edible fats and oils-Part I of III. EFSA J. 9, 2482. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2482>.

EMBUSCADO, Milda E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**. p.1-9, 2015.

ESWARANANDAM, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*. **Journal Food Microbiology and Safety**. v.69(3), p.79-84, 2004.

EU 10/2011. Official Journal of the European Union. Commission Regulation, of 14 January 2011. On plastic materials and articles intended to come into contact with food.

FELIX, Antonio C.S.; NOVAES, Cleber G.; ROCHA, Máisla P.; BARRETO, George E.; NASCIMENTO-Jr, Baraquizio do; ALVAREZ, Lisandro D.G. Mixture design and doehlert matrix for the optimization of the extraction of phenolic compounds from Spondias mombin L apple bagasse agroindustrial residues. **Frontiers in Chemistry**. v.5, p.1-8, 2018.

FIGUEIREDO-RINHEL, Andréa S. G.; KABEYA, Luciana M.; BUENO, Paula C. P.; JORGE-TIOSSI, Renata F.; AZZOLINI, Ana E. C. S.; BASTOS, Jairo K.; VALIM-LUCISANO, Yara M. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**. v.150, p.655-664, 2013.

FRANKEL, Edwin N. Lipid Oxidation. **Progress in Lipid Research**. v.19, n.1-2, p.1- 22, 1980.

FUKUDA, Mamoru; OHKOSHI, Emika; MAKINO, Mitsuko; FUGIMOTO, Yasuo. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Pharmaceutical Society of Japan**. v.54, p.1465-1468, 2006.

FUNARI, Cristiano S.; FERRO, Vicente O. Análise de própolis. **Ciência e tecnologia de alimentos**. v.26, p.171-178, 2006.

FUNARI, Cristiano S. de; FERRO, Vicente de O.; MATHOR, Monica B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**. v.111, p.206-212, 2007.

GAN, Chee-Yuen; LATIFF, Aishah A. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. **Food Chemistry**. v.124, p.1277-1283, 2011.

GANIARI, Sophie; CHOULITOU, Evanthia; OREOPOULOU, Vassiliki. Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. **Trends in Food Science and Technology**. v.68, p.70-82, 2017.

GARCIA, Livia M. Z.; OLIVEIRA, Talita F. de; SOARES, Patricia K.; BRUNS, Roy E.; SCARMINIO, Ieda S. Statistical mixture design – Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v.103, p.1-7, 2010.

GARMUS, Tábata T.; PAVIANI, Losiane C.; QUEIROGA, Carmen L.; CABRAL, Fernando A. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.99, p.68-75, 2015.

GOMES, Vania; FERNANDES, Wilson G. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D.C (Asteraceae). **Acta Botânica Brasileira**. v.16(4), 421-427, 2002.

GRAF, Ernest. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free radicals in biology and medicine**. v.13, p.435-448, 1992.

GUIMARÃES, Natalia S. S.; MELLO, Joyce C.; PAIVA, Juliana S.; BUENO, Paula C. P.; BERRETTA, Andressa A.; TORQUATO, Ricardo J.; NANTES, Iseli L.; RODRIGUES, Tiago. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potente antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**. v.50, p.1091-1097, 2012.

GULLÓN, Beatriz; EIBES, Gemma; MOREIRA, María T.; HERRERA, René; LABIDI, Jalel; GULLÓN, Patricia. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops and Products**. v.113, p.398-405, 2018.

GULLÓN, Beatriz; GULLÓN, Patricia; LÚ-CHAU, Thelmo A.; MOREIRA, Maria T.; LEMA, Juan M.; EIBES, Gemma. Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. **Industrial Crops and Products**. v.108, p.649-659, 2017.

GUZMÁN, E. L.; CRUZ, F. J. M. **Combinations of extracts of propolis and other compounds against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. In: El-Shemy, H. (Eds.), **Active ingredients from aromatic and medicinal plants**. London: Intechopen, 2017, p. 143-158.

HALLIWEL, Barry. Antioxidants and human disease: A general introduction. **Nutrition Reviews**. v.55, n.1, p.(II)S44-S52, 1997.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, Oxford, 2015. 823 p.

HOCAYEN, Palloma de A. S.; GRASSIOLLI, Sabrina; LEITE, Nayara C.; POCHAPSKI, Márcia T.; PEREIRA, Ricardo A.; SILVA, Luiz A. da; SNACK, Andre L.; MICHEL, Garcia R.; KAGIMURA, Francini Y.; CUNHA, Mário A. A.; MALFATTI, Carlos R. M. *Baccharis dracunculifolia* methanol extract enhances glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets of monosodium glutamate induced-obesity model rats. **Pharmaceutical Biology**. v.54(7), p.1263-1271, 2016.

HOSSEINI, Seyed F.; REZAEI, Masoud; ZANDI, Mojgan; FARAHMANDGHAVI, Farhid. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. **Industrial Crops and Products**. v.67, p.403-413, 2015.

HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p.1841-1856, 2005.

INFANTE, Juliana; ROSALEN, Pedro L.; LAZARINI, Josy G.; FRANCHIN, Marcelo; ALENCAR, Severino M. de. Antioxidant and Anti-Inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **Biological Properties of Unexplored Native Fruits**. v.11, p.1-13, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, Versão eletrônica, 4. ed. São Paulo: IAL, 2008, 1000p.

JERÓNIMO, Eliana; ALFAIA, Cristina M. M.; ALVES, Susana P.; DENTINHO, Maria T. P.; PRATES, José A. M.; VASTA, Valentina; SANTOS-SILVA, José; BESSA, Rui J. B. Effect of dietary grape seed extract and *Cistus ladanifer* L. in combination with vegetable oil supplementation on lamb meat quality. **Meat Science**. v.92, p.841-847, 2012.

KAHKONEN, Marja P.; HOPIA, Anu I.; VUORELA, Heikki, J.; RAUHA, Kalevi Pihlaja; KUJALA, Tytti S.; HEINONEN Marina. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.47, p.3954-3962, 1999.

KAM, Wai-Yee J.; MIRHOSSEINI, Hamed; ABAS, Faridah; HUSSAIN, Norhayati; HEDAYATNIA, Simin; CHONG, Huey-Lin F. Antioxidant activity enhancement of biodegradable film as active packaging utilizing crude extract from durian leaf waste. **Food Control**. v.90, p.66-72, 2018.

KARACABEY, Erkan; MAZZA, Giuseppe. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. **Food Chemistry**. v.119, p.343-348, 2010.

KARAMAN, I., SAHIN, F., GÜLLÜCE, M., OGUTÇU, H., SENGÜL, M., ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v.85, p.231-235, 2003.

KOLEVA, I.I.; NIEDERLANDER, H.A.G.; BEEK, T. A. An on-line HPLC method detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. **Analytical Chemistry**. v.72, p.2323-2328, 2000.

KUBILIENE, Loreta; LAUGALIENE, Virginija; PAVILONIS, Alvydas; MARUSKA, Audrius; MAJIENE, Daiva; BARCAUSKAITE, Karolina; KUBILIUS, Raimondas; KASPARAVICIENE, Giedre; SAVICKAS, Arunas. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **Complementary and Alternative Medicine**. v.156, p.1-7, 2015.

KUKIC, Jelena.; POPOVIC, Visnja.; PETROVIC, Silvana.; MUCAJI, Pavel.; CIRIC, Ana.; STOJKOVIC, Dejan.; SOKOVIC, Marina. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**. v.107(2), p. 861-868, 2008.

KUMAZAWA, Shigenori; HAMASAKA, Tomoko; NAKAYAMA, Tsutomu. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**. v.84, p.329-339, 2004.

KUMAZAWA, Shigenori; YONEDA, Masahiro; SHIBATA, Ikoi; KANAEDA, Jun; HAMASAKA, Tomoko; NAKAYAMA, Tsutomu. Direct evidence for the plant origin of brasilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.51, p.740-742, 2003.

KUN, Eva; MAROSSY, Kalman. Evaluation methods of antimicrobial activity of plastics. **Material Science Forum**. v.729, p.430-435, 2013.

LACERDA, Risia C. C.; TIVERON, Ana P.; ALENCAR, Severino M. de. Própolis e segurança alimentar. **Segurança alimentar e nutricional**. v.18(2), p.99-106, 2011.

LÍVERO, Francislaine A. dos R.; MARTINS, Gracianny G.; TELLES, José E. Q.; BELTRAME, Olair C.; BISCAIA, Stellee M. P.; FRANCO, Célia R. C.; ELFERINK, Ronald P. J. O.; ACCO, Alexandra. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* ameliorates alcoholic fatty liver disease in mice. **Chemico-Biological Interactions**. v.260, p.22-32, 2016.

LLACUNA, Laura; MACH, Nuria. Papel de los antioxidantes em la prevención del câncer. **Nutrition Humana y Dietética**. v.16(1), p.16-24, 2012.

LOPES, Carla M.; LOBO, José M. S.; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.41(2), p.143-154, 2005.

MACHADO, Bruna A. S.; BARRETO, Gabriele de A.; COSTA, Aline S.; COSTA, Samantha S.; SILVA, Rejane P. P. D.; SILVA, Danielle F. da; BRANDÃO, Hugo N.; ROCHA, José L. C da.; NUNES, Silmar B.; UMSZA-GUES, Andres; PADILHA, Francine F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **Plos One**. v.11, p.1-26, 2016.

MACHADO, Bruna A. S.; BARRETO, Gabriele de A.; COSTA, Aline S.; COSTA, Samantha S.; SILVA, Rejane P. P. D.; SILVA, Danielle F. da; BRANDÃO, Hugo N.; ROCHA, José L. C da.; NUNES, Silmar B.; UMSZA-GUES, Andres; PADILHA, Francine F. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **Plos One**. v.10, p.1-26, 2015.

MAJID, Ishrat; NAYIK, Gulzar A.; DAR, Shuaib M.; NANDA, Vikas. Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. v.17, p.454-462, 2018.

MAO, Lijun; IMAM, Syed; GORDON, Sherald; CINELLI, Patrizia; CHIELLINI, Emo. Extruded Cornstarch-Glycerol-Polyvinyl alcohol blends: mechanical properties, morphology, and biodegradability. **Journal of Polymers and the Environment**. v.8(4), p.205-211, 2002.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. de; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. v.74, p.105-112, 2001.

MARIA, Thaís M. C.; CARVALHO, Rosemary A. de; SOBRAL, Paulo J. A.; HABITANTE, Ana Mônica B. Q.; SOLORZA-FERIA, Javier. The effect of the degree of hydrolysis of the PVA and the plasticizer concentration on the color, opacity, and thermal and mechanical properties of films based on PVA and gelatin blends. **Journal of Food Engineering**. v.87, p.191-199, 2008.

MARTINEZ-CORREA, Hugo A.; CABRAL, Fernando A.; MAGALHÃES, Pedro M.; QUEIROGA, Carmen L.; GODOY, Adriana T.; SÁNCHEZ-CAMARGO, Andrea P.; PAVIANI, Losiane C. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.63, p.31-39, 2012.

MASKOVIC, Pavle Z.; DIAMANTO, Lazari D.; CVETANOVIC, Aleksandra; RADOJKOVIC, Marija; SPASOJEVIC, Miroslav B.; ZENGIN, Gokhan. Optimization of the extraction process of antioxidants from orange usin response surface methodology. **Food Analytical Methods**. v.9, p.1436-1443, 2016.

MELLO, Beatriz C. B. S.; HUBINGER, Miriam D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **Food Science and Technology**. v.47, p.2510-2518, 2012.

MELO, Enaide de A.; MACIEL, Maria Inês S.; LIMA, Vera Lúcia A. G.; SANTANA, Ana Paula M de. Capacidade antioxidante de hortaliças submetidas a tratamento térmico. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. v.34, n.1, p.85-95, 2009.

MELO, Priscilla S.; BERGAMASCHI, Keityane B.; TIVERON, Ana P.; MASSARIOLI, Adna P.; OLDONI, Tatiane L. C.; ZANUS, Mauro C.; PEREIRA, Giuliano E.; ALENCAR, Severino M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**. v.41(6), p.1088-1093, 2011.

MENEZES, Ana P. S.; SILVA, Juliana da; FISHER, Camila; SILVA, Fernanda R. da; REYES, Juliana M.; PICADA, Jaqueline N.; FERRAZ, Alice G.; CORRÊA, Dione S.; PREMOLI, Suziane M.; DIAS, Johnny F.; SOUZA, Claudia T. de; FERRAZ, Alexandre de B. F. Chemical and toxicological effects of medicinal *Baccharis trimera* extract from coal burning area. **Chemosphere**. v.146, p.396-404, 2016.

MENESES, Nuno G. T.; MARTINS, Silvia; TEIXEIRA, José A.; MUSSATTO, Solage I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. **Separation and Purification Technology**. v.108, p.152-158, 2013.

MENG, Jiang-Fei; FANG, Yu-Lin; QUIN, Min-Yang; ZHUANG, Xi-Fu; ZHANG, Zhen-Wen. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China). **Food Chemistry**. v.134, p.2049-2056, 2012.

MENSOR, Luciana L.; MENEZES, Fábio S.; LEITÃO, Gilda G.; REIS, Alexandre S.; SANTOS, Tereza C. dos.; COUBE, Cintia S.; LEITÃO, Suzana G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v.15, p.127-130, 2001.

MEXIS, S. F.; KONTOMINAS, M. G. **Active food packaging**. In: BATT, Carl; BATT, Carl A. **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed., Madison: Academic Press, 2014, p.999-1005.

MIR, Shabir A.; DAR, B. N.; WANI, Ali A.; SHAH, Manzoor A. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. **Trends in Food Science and Technology**. v.80, p.141-154, 2018.

MOKRANI, Abderrahmane.; MADANI, Khodir. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus pérsica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**. v.162, p.68-76, 2016.

MONROY, Yaneth M.; RODRIGUES, Rodney A. F.; SARTORATTO, Adilson; CABRAL, Fernando A. Influence of ethanol, water, and their mixtures as co-solvents of the supercritical carbon dioxide in the extraction of phenolics from purple corn cob (*Zea mays* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**. v.118, p.11-18, 2016.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**. v.1054, p.95-111, 2004.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Database**; CID=996, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/996> (accessed July 24, 2017).

NAVEENA, B. M.; SEN, A. R.; VAITHIYANATHAN, S.; BABJI, Y.; KONDAIAH, N. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. **Meat Science**. v.80, p.1304-1308, 2008.

NICOLAI, Marisa; PEREIRA, Paula; VITOR, Rute F.; REIS, Catarina P.; ROBERTO, Amilcar; RIJO, Patrícia. Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. **Measurement**. v.89, p.328-332, 2016.

NINA, Nélica; QUISPE, Cristina; JIMÉNEZ-ASPEE, Felipe; THEODULOZ, Cristina; GIMÉNEZ, Alberto; SCHMEDA-HIRSCHMANN, Guillermo. Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. **Journal Science Food Agricultural**. v.96, p.2142-2153, 2015.

OLIVEIRA, Cristiane B. de; COMUNELLO, Lucimara N.; LUNARDELLI, Adroaldo.; AMARAL, Robson H.; PIRES, Melissa G. S.; SILVA, Gabriela L. da; MANFREDINI, Vanusa; VARGAS, Carmen R.; GNOATTO, Simone C. B.; OLIVEIRA, Jarbas R. de; GOSMANN, Grace. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. **Molecules**. v.17, p. 1113-1123, 2012.

OLIVEIRA, Sandro de. **Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis**. 93 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Paulo – Instituto de Química, São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, S. Q.; DAL-PIZZOL, F.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J. C. F.; SCHENKEL, E. F. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free Radical Research**. v.37, p. 555-559, 2003.

PÁDUA, Bruno da C.; SILVA, Lucas D.; ROSSONI JÚNIOR, Joamyr V.; HUMBERTO, Jorge L.; CHAVES, Míriam M.; SILVA, Marcelo E.; PEDROSA, Maria L.; COSTA, Daniela C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 129, p. 381-386, 2010.

PARK, Yong K.; PAREDES-GUZMAN, Julio F.; AGUIAR, Claudio L.; ALENCAR, Severino M.; FUJIWARA, Fred Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, p.1100-1103, 2004.

PAULA, Julia T.; AGUIAR, Ana C.; SOUSA, Ilza M. O.; MAGALHÃES, Pedro M.; FOGGIO, Mary A.; CABRAL, Fernando A. Scale-up study of supercritical fluid extraction process for *Baccharis dracunculifolia*. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.107, p.219-225, 2016.

PAULA, Julia T.; SOUSA, Ilza M. O.; FOGGIO, Mary A.; CABRAL, Fernando A. Selective fractionation of supercritical extracts from leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.127, p.62-70, 2017.

PAULI, Elis D.; MALTA, Galileu B.; SANCHEZ, Patrícia M.; MOREIRA, Isabel C.; SCARMINIO, Ieda S. Mixture design analysis of solvent extractor effects on epicatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin and antioxidant activities of the *Camellia sinensis* L. leaves. **Analytical Chemistry Research**. v.2, p.23-29, 2014.

PAZ, Mário; GULLÓN, Patricia; BARROSO, M. Fátima; CARVALHO, Ana P.; DOMINGUES, Valentina F.; GOMES, Ana M.; BECKER, Helena; LONGHINOTTI, Elisane; DELERUE-MATOS, Cristina. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**. v.172, p.462-468, 2015.

PELISSARI, Franciele M.; YAMASHITA, Fabio; GARCIA, María A.; MARTINO, Miriam N.; ZARITZKY, Noemi E.; GROSSMANN, Maria V. E. Constrained mixture design applied to the development of cassava starch-chitosan blown films. **Journal of Food Engineering**. v.108, p.262-267, 2012.

PEREIRA, Cristiane A.; COSTA, Anna C. B. P.; LIPORONI, Priscila C. S.; REGO, Marcos A.; JORGE, Antonio O. C. Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Journal of Infection and Public Health**. v.9, p.324-330, 2016.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; ARRANZ, Sara; TABERBERO, Maria; DÍAZ-RUBIO, M. Helena; SERRANO, José; GOÑI, Isabel; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**. v.41, p.274-285, 2008.

PLASTICS EUROPE. Association of Plastics Manufacturers. Plastics - the facts 2017: An Analysis of European Plastics Production, demand and waste data. Disponível em: <https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf>. Acesso em: 08 de janeiro de 2019.

POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. optimization of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresource Technology**. v.100, p.6076-6082, 2009.

POVEDA, J. M.; LOARCE, L.; ALARCÓN, M.; DÍAZ-MAROTO, M. C.; ALAÑÓN, M. E. Revalorization of winery by-products as source of natural preservatives obtained by means of green extraction techniques. **Industrial Crops and Products**. v.112, p.617-625, 2018.

PRASAD, Nagendra K.; HASSAN, Fouad A.; YANG, Bao; KONG, Kin W.; RAMANAN, Ramakrishnan N.; AZLAN, Azrina; ISMAIL, Amin. Response surface optimization for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of under utilized *Mangifera pajang* Kosterm. peels. **Food Chemistry**. v.128, p.1121-1127, 2011.

PRION, Susan; HAERLING, Katie A. Making Sense of Methods and Measurement: Pearson Product Moment Correlation Coefficient. **Clinical Simulation in Nursing**. v.10, p.587-588, 2014.

RAJHA, Hiba N.; EL DARRA, Nada; HOBAlKA, Zeina; BOUSSETTA, Nadia; VOROBIEV, Eugene; MAROUN, Richard G.; LOUKA, Nicolas. Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. **Food and Nutrition Sciences**. v.5, p.397-409, 2014.

RAMALHO, Valéria C.; JORGE, Neuza. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Química Nova**. v.29, n.4, 2006.

RAMIREZ, Javier E.; ZAMBRANO, Ricardo; SEPÚLVEDA, Beatriz; KENNELLY, Edward J.; SIMIRGIOTIS, Mario J. Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC-HR-ESI-ToF-MS. **Food Chemistry**. v.176, p.106-114, 2015.

RAMOS, L., KRISTENSON, E.M., BRINKMAN, U.A.T. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. **Journal of Chromatography**. v.975, p.3-29, 2002.

REALINI, Carolina E.; MARCOS, Begonya. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**. v.98, p.404-419, 2014.

REYNERTSON, K.A.; BASILE, M.J.; KANNELLY, E.J. Antioxidant potential of seven Myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research and Applications**. v.3, p.25-35, 2005.

RE, Roberta; PELLEGRINI, Nicoletta; PROTEGGENTE, Anna; PANNALA, Ananth; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals Biology and Medicinal**. v.26, n.9/10, p.1231-1237, 1999.

RESENDE, Flávia A.; ALVES, Jaqueline M.; MUNARI, Carla C.; SENEDESE, Juliana M.; SOUSA, João P. B.; BASTOS, Jairo K.; TAVARES, Denise C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**. v.634, p.112-118, 2007.

RIBEIRO-SANTOS, Regiane; ANDRADE, Mariana; MELO, Nathália R. de.; SANCHES-SILVA, Ana. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science and Technology**. v.61, p.132-140, 2017a.

RIBEIRO-SANTOS, Regiane; ANDRADE, Mariana; SANCHES-SILVA, Ana. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. **Current Opinion of Food Science**. v.14, p.17-84, 2017b.

RODRIGUES, Vanessa de C.; SILVA, Marcos V. da; SANTOS, Adriele R. dos; ZIELINSKI, Acácio A. F.; HAMINIUK, Charles W. I. Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. **Food Science and Technology**. v.50, p.2038-2045, 2015.

RIAZ, Asad; LEI, Shicheng; AKHTAR, Hafiz M. S.; WAN, Peng; CHEN, Dan; JABBAR, Saqib; ABID, Muhammad; HASHIM, Malik M.; ZENG, Xiaoxiong. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging incorporated with apple peel polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.114, p.547-555, 2018.

RUFINO, Maria do S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S. de.; MORAIS, Selene M. de.; SAMPAIO, Caroline de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara.; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Comunicado Técnico 128**. Embrapa - Fortaleza, CE, 2007a.

RUFINO, Maria do S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S. de.; MORAIS, Selene M. de.; SAMPAIO, Caroline de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara.; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico 127**. Embrapa - Fortaleza, CE, 2007b.

RUFINO, Maria do S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S. de.; MORAIS, Selene M. de.; SAMPAIO, Caroline de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara.; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico 125**. Embrapa - Fortaleza, CE, 2006.

SALAZAR, Gerson J. T.; SOUSA, Jéssica P. de S.; LIMA, Cicera N. F.; LEMOS, Izabel C. S.; SILVA, Ana R. P. da; FREITAS, Thiago S. de; COUTINHO Henrique D. M.; SILVA, Luiz E. da; AMARAL, Wanderlei do; DESCHAMPS, Cícero. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial Crops and Products**. v.122, p.591-595, 2018.

SALGUEIRO, Fernanda B.; CASTRO, Rosane N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**. v.39(10), p.1192-1199, 2016.

SANTOS, Diogo A. dos; FUKUI, Murilo de J.; NANAYAKKARA, Dhammika N. P.; KHAN, Shabana I.; SOUSA, João P. B.; BASTOS, Jairo K.; ANDRADE, Sérgio F.; SILVA FILHO Ademar A. da; QUINTÃO, Nara L. M. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**. v.127, p.543-550, 2010.

SANTOS, R. F.; ISOBE, M. T. C.; LALLA, J. G.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v.14, p.224-234, 2012.

SARTOR, T.; XAVIER, V. B.; FALCÃO, M. A.; MONDIN, C. A.; SANTOS, M. A. D.; CASSEL, E.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Season changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. **Industrial Crops and Products**. v.51, p.355-359, 2013.

SEKISUI SPECIALTY CHEMICAL. Selvol™ Polyvinyl alcohol: A Versatile High Performance Polymer. Disponível em: < https://www.sekisui-sc.com/wp-content/uploads/SelvolPVOH_Brochure_EN.pdf >. Acesso em: 09 de janeiro de 2019.

SELANI, M. M.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; SHIRAHIGUE, L. D.; GALLO, C. R.; PLATA-OVIEDO, M.; MONTES-VILLANUEVA, N. D. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. **Meat Science**. v.88, p.397-403, 2011.

SEVGI, Kemal; TEPE, Bektas; SARIKURKCU, Cengiz. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**. v.77, p.12-21, 2015.

SFORCIN, José M.; BANKOVA, Vassya. Própolis: Is there a potential for the development of new drugs?. **Journal of Ethnopharmacology**. v.133, p.253-260, 2011.

SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **Journal Lipid Science and Technology**. v.112, p. 930-940, 2010.

SILVA, R.P.D., MACHADO, B.A.S., COSTA, S.S., BARRETO, G.A., PADILHA, F.F., UMSZA-GUEZ, M.A. Aplicação de extrato de própolis em produtos alimentícios: Uma prospecção baseada em documentos e patentes. **Revista Virtual de Química**. 8(5), 1251-1261, 2016.

SILVA FILHO, A. A. da; RESENDE, D. O.; FUKUI, M. J.; SANTOS, F. F.; PAULETTI, P. M.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; GREGÓRIO, L. E.; BASTOS, J. K.; NANAYAKKARA, N. P. D. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Fitoterapia**. v.80, p.478-482, 2009.

SIMIRGIOTIS, Mario J.; QUISPE, Cristina; BÓRQUEZ, Jorge; MOCAN, Andrei; SEPÚLVEDA, Beatriz. High resolution metabolite finger printing of the resin of *Baccharis tola* Phil. from the Atacama Desert and its antioxidant capacities. **Industrial Crops and Products**. v.94, p.368-375, 2016.

SIMÕES-AMBRÓSIO, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; SOUSA, J. P. B.; FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**. v.81, p.1102-1108, 2010.

SINGH, Jyotsana; SINGH, Vinti; SHUKLA, Surabhi; RAI, Awadhesh K. Phenolic content and antioxidant capacity of selected cucurbit fruits extracted with different solvents. **Journal of Nutrition and Food Sciences**. v.6, p.1-8, 2016.

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

SKOTTI, Efstathia; ANASTASAKI, Eirini; KANELLOU, Georgia; POLISSIOU, Moschos. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. **Industrial Crops and Products**. v.53, p.46-54, 2014.

SKROZA, Danijela; MEKINIC, Ivana G.; SVILOVIC, Sandra; SIMAT, Vida; KATALINIC, Visnja. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.38, p.13-18, 2015.

SOBRINHO, Antonio C.; SOUZA, Elnaten B de; ROCHA, Marcos F.G.; ALBUQUERQUE, Maria R.J.R.; BANDEIRA, Paulo N.; SANTOS, Hélcio S. dos; CAVALVANTE, Carolina S. de P.; OLIVEIRA, Samuel S.; ARAGÃO, Priscila R.; MORAIS, Selene M, de; FONTENELLE, Raquel O. dos S. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**. v.84, p.108-115, 2016.

SOLIMAN, Emad A.; EL-MOGHAZY, Ahmed Y.; EL-DIN, Mohammed S. M.; MASSOUND, Magdy A. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and *in Vitro* Evaluation of Antifungal Activity. **Journal of Encapsulation and Adsorption Science**. v.3, p.48-55, 2013.

SOLOMONS, T.W. Graham; FRYHLE, Craig B. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, 2011, 9. ed., v.1, 675p.

SOUZA, João P.B. **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida.** 164p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, SP, 2007.

SOUZA, João P.B.; SILVA Filho, Ademar A.; BUENO, Paula C.P.; GREGÓRIO, Luiz E.; FURTADO, Niede A.J.C.; JORGE, R.F.; BASTOS, Jairo K. A Validated Reverse-phase HPLC Analytical Method for the Quantification of Phenolic Compounds in *Baccharis dracunculifolia*. **Phytochemical Analysis.** v.20, p.24-32, 2008.

SPIGNO, G.; De FAVERI, D. M. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. **Journal of Food Engineering.** 93, p.210-217, 2009.

SUN, Chunli; WU, Zhengshuang; WANG, Ziyang; ZHANG, Hongcheng. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** p.1-9, 2015.

SUN, Liping; LIAO, Lei; WANG, Bei. Potential antinociceptive effects of Chinese propolis and identification on its active compounds. **Journal of Immunology Research.** p.1-6, 2018.

SUNG, Suet-Yen; SIN, Lee T.; TEE, Tiam-Ting; BEE, Soo-Tuen; RAHMAT, A. R.; RAHMAN, W. A. W. A.; TAN, Ann-Chen; VIKHRAMAN, M. Antimicrobial agents for food packaging applications. **Food Science and Technology.** v.33, p.110-123, 2013.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal.** 4. ed. São Paulo: Artmed, 2009. 819p.

TÁLON, Emma; TRIFKOVIC, Kata T.; VARGAS, María; CHIRALT, Amparo; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Chelo. Release of polyphenols from starch-chitosan based films containing thyme extract. **Carbohydrate Polymers.** v.175, p.122-130, 2017.

TANG, Xiaozhi; ALAVI, Sajid. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. **Carbohydrate Polymers.** v.85, p.07-16, 2011.

TAYLOR, Richard. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. **Journal of Diagnostic Medical Sonography.** v.6, p.35-39, 1990.

TEIXEIRA, Cristiane C. C.; CABRAL, Tatiana P. de F.; TACON, Luciana A.; VILLARDI, Isabel L.; LANCHOTE, Aurea D.; FREITAS, Luis A. P. de. Solid state stability of polyphenols from a plant extract after fluid bed atmospheric spray-freeze-drying. **Powder Technology.** v.319, p.494-504, 2017.

WIJNGAARD, Hilde H.; BRUNTON, Nigel. The optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. **Journal of Food Engineering.** v.96, p.134-140, 2010.

VADIVEL, Vellingiri; BRINDHA, Pemiah. Antioxidant property of solvent extract and acid/alkali hydrolysates from rice hulls. **Food Bioscience.** v.11, p.85-91, 2015.

VAITHIYANATHAN, S.; NAVEENA, B. M.; MUTHUKUMAR, M.; GIRISH, P. S.; KONDAIAH, N. Effect of dipping in pomegranate (*Punica granatum*) fruit juice phenolic solution on the shelf life of chicken meat under refrigerated storage (4 °C). **Meat Science**. v.88, p.409-414, 2011.

VALKO, Marian; LEIBFRITZ, Dieter; MONCOL, Jan; CRONIN, Mark T.D.; MAZUR, Milan; TELSER, Joshua. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal biochemistry and cell biology**. v.39, 4p.44-84, 2007.

VARGAS, Rubem M. F.; BARROSO, Máurean S. T.; NETO, Roberto G.; SCOPEL, Rodrigo; FALCÃO, Manuel A.; SILVA, Caroline F. da; CASSEL, Eduardo. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. using CO₂. **Industrial Crops and Products**. v.50, p.430-435, 2013.

VEIGA, R. S.; MENDONÇA, S. de; MENDES, P. B.; PAULINO, N.; MIMICA, M. J.; NETTO, L. A. A.; LIRA, I. S.; LÓPEZ, B. G. -C.; NEGRÃO, V.; MARCUCCI, M. C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* D.C. **Journal of Applied Microbiology**. v.122, p.911-920, 2017.

VERDI, Luiz G.; BRIGHENTE, Inês M. C.; PIZZOLATTI, Moacir G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**. v.28, p.85-94, 2005.

VROMAN, Isabelle; TIGHZERT, Lan. **Biodegradable Polymers**. Materials. v.2, p.307-344, 2009.

YANG, L.; YIN, P.; FAN, H.; XUE, Q.; LI, K.; LI, X.; SUN, L.; LIU, Y. Response surface methodology optimization of ultrasonic-assisted extraction of *Acer Truncatum* leaves for maximal phenolic yield and antioxidant activity. **Molecules**. v.22 (232), p.2-21, 2017.

ZABAIU, Nada; FOUACHE, Allan; TROUSSON, Amalia; BARON, Silvère; ZELLAGUI, Amar; LAHOUEL, Mesbah; LOBACCARO, Jean-Marc A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**. v.207, p.214-222, 2017.

ZANELA, Juliano; SHIRAI, Marianne A.; REIS, Mônica O.; MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria V. E.; YAMASHITA, Fabio. Mixture design to develop biodegradable sheets with high levels of starch and polyvinyl alcohol. **Starch/Starke**. v.67, p.1011-1019, 2015.

ZHANG, Ying-lao; KONG, Li-chun; YIN, Cai-ping; JIANG, Jian-quan; HE, Jing; XIAO, Wei-xuan. Extraction optimization by response surface methodology, purification and principal antioxidant metabolites of red pigments extracted from bayberry (*Myrica rubra*) pomace. **Food Science and Technology**. v.51, p.343-347, 2013.

ZHANG, Zhi-Jun; LI, Na; LI, Hui-Zhen; LI, Xiao-Jun; CAO, Jian-Ming; ZHANG, Gui-Ping; HE, Dong-Liang. Preparation and characterization of biocomposite chitosan film containing *Perilla frutescens* (L.) Britt. essential oil. **Industrial Crops and Products**. v.112, p.660-667, 2018.

ZIELINSKI, Acácio A.F.; HAMINIUK, Charles W.I.; ABERTI, Aline; NOGUEIRA, Alessandro; DEMIATE, Ivo M.; GRANATO, Daniel. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**. v.60, p.246-254, 2014.



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: *In vitro* antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification



Maira Casagrande^{a,b,*}, Juliano Zanela^a, Américo Wagner Júnior^b, Cleverson Busso^b, Jéssica Wouk^d, Genice Iurkevitz^a, Paula Fernandes Montanher^b, Fabio Yamashita^c, Carlos Ricardo Maneck Malfatti^d

^a Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 85040-080, Guarapuava, PR, Brazil

^b Universidade Tecnológica Federal do Paraná, P O Box 157, 85660-000, Dois Vizinhos, PR, Brazil

^c Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, P O Box 10011, 86057-970, Londrina, PR, Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacéuticas, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 85040-080, Guarapuava, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Full factorial design
Antimicrobial activity
Extraction process
Phenolic compounds
Antioxidant activity

ABSTRACT

The suitability of a protocol for the extraction of antioxidant compounds from plant biomass is of extreme importance for the standardization of extraction of compounds of industrial interest. The objective of this work was to study the best conditions for the extraction of phenolic compounds with antioxidant activity (AA) of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Bd) plant using response surface methodology (RSM). A full factorial design (FFD) 2^3 was conducted to analyze the effects of time, temperature, and solvent concentration for ethanol and acetone solvents and an FFD 2^2 for time and temperature, using water as a solvent. The total phenolic compounds (TPC) and antioxidant capacity (DPPH, ABTS, and FRAP) were the dependent variables analyzed for all FFD. There was a variation for TPC from 19.81 to 37.22 mg (GAE) g^{-1} (Gallic acid equivalent), for DPPH from 64.68 to 222.07 ($\mu\text{mol Trolox } g^{-1}$), for ABTS from 140.26 to 399.67 ($\mu\text{mol TEAC } g^{-1}$), and for FRAP from 308.62 to 704.56 ($\mu\text{mol Fe}^{2+} g^{-1}$). The optimal extraction conditions determined by FFD were: 90 min at 80 °C in water, 90 min at 80 °C in 40% ethanol, and 90 min at 80 °C in 40% acetone. The extracts with a greater quantity of TPC presented higher AA, and there was a strong and positive correlation between TPC and the AA assays (DPPH, ABTS, and FRAP). The EC_{50} value, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) of the extracts at their optimal points were determined. The compounds extracted with 40% ethanol demonstrated higher inhibitory activity against the tested bacteria (MIC and MBC) and better values of EC_{50} . The HPLC analysis showed that among all phenolic acids identified and quantified, ferulic acid was the major component. Therefore, the compounds extracted from the Bd plant, through the optimum extraction points determined by the FFD, present potential for industrial application.

1. Introduction

The genus *Baccharis* is composed of more than 500 species, the occurrence of 120 of them are observed in Brazil (Verdi et al., 2005). In Brazil, *Baccharis dracunculifolia* DC (Bd) is popularly called “vassouraa” or “Alecrim-do-campo”, being characterized as a shrub, perennial and woody, with an average height of 2–3 m, of semiferous propagation, with a very branched stem and densely covered by trichomes (Santos et al., 2012). *Apis mellifera*, a species of Africanized bee, usually collects resins from shoots or leaves of the Bd plant, using the resin to produce

green propolis (Sforzin and Bankova, 2011; Park et al., 2004). In Brazil, this plant is the main botanical source for the production of green propolis, enabling the realization of many biological studies (Guimaraes et al., 2012; Sforzin and Bankova, 2011; Silva Filho et al., 2009; Funari et al., 2007).

The literature confirms the importance of *Baccharis* specie for pharmaceutical and food industries, since they present activities such as: anti-mutagenic (Resende et al., 2007), anti-inflammatory (Livero et al., 2016; Bachiaga et al., 2013; Santos et al., 2010), antimicrobial (Salazar et al., 2018; Veiga et al., 2017), antifungal (Sobrinho et al.,

* Corresponding author at: Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 85040-080, Guarapuava, PR, Brazil.
E-mail address: maircasagrande@utfpr.edu.br (M. Casagrande).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.088>

Received 12 April 2018; Received in revised form 14 August 2018; Accepted 30 August 2018

0926-6690/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.