



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**MARCELO VICTOR LIMA**

**PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE AMBUROSÍDIO DA CASCA DO CAULE DE  
CUMARU (*Amburana cearensis*)**

**FORTALEZA**

**2014**

MARCELO VICTOR LIMA

PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE AMBUROSÍDIO DA CASCA DO CAULE DE  
CUMARU (*Amburana cearensis*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos

Orientador: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito

FORTALEZA

2014

## RESUMO

Estudos com extrato de origem vegetal têm crescido muito nos últimos anos devido ao aumento da demanda mundial para fins medicinais. Dentre as matérias-primas utilizadas, a casca do caule de *Amburana cearensis* tem sido objeto de estudos devido sua utilização ao combate a doenças respiratórias. Compostos presentes na casca do caule, tais como, isocampferídio, campferol e amburosídio são responsáveis pela atividade broncodilatadora, analgésica e anti-inflamatória. Neste contexto, o objetivo deste trabalho consiste em otimizar o processo de extração de amburosídio A presente na casca do caule de *Amburana cearensis*. Inicialmente, conduziram-se experimentos para avaliar o efeito de diferentes processos (Soxhlet, Maceração Dinâmica e Extração Assistida por Ultrassom) na extração de amburosídio A. Diferentes solventes, (água, etanol e água + etanol 1:1) foram utilizados. Também foi realizado um planejamento experimental para avaliar a influência de algumas variáveis (Potência e Tempo) sobre a extração e analisado a remoção de açúcares do extrato por dois processos: adsorção e fermentação. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massa (CLAE-MS) foi utilizada para quantificar o teor de amburosídio A extraído. De acordo com os resultados, os extratos obtidos pelo processo de maceração dinâmica apresentaram maiores quantidades do composto. Extratos obtidos por Extração Assistida por Ultrassom apresentaram valores de concentração próximos ao obtido por maceração dinâmica. Extração realizada com água + etanol (1:1) apresentou teor de amburosídio A maiores em relação aos outros solventes. As variáveis potência e interação potência x tempo foram significativas no processo de Extração Assistida por Ultrassom. Analisando a relação das variáveis, a melhor condição encontrada para obter amburosídio A por Ultrassom foi: potência de 100% durante 6 minutos. O processo de adsorção mostrou-se mais eficiente, na remoção de açúcar, em relação ao processo de fermentação. Porém ambos os processos reduziram a concentração de amburosídio durante a remoção de açúcares.

**Palavras-chave:** Cumaru. Amburosídio. Soxhlet. Maceração Dinâmica. Ultrassom.

## ABSTRACT

Studies with extracts of vegetable origin have grown tremendously in recent years due to increased global demand for medicinal purposes. Among the raw materials used, the stem bark of *A. cearensis* A. Smith C has been studied because of its use to combat respiratory diseases. Compounds present in the bark, such as isocampferídio, kaempferol and amburosídeo are responsible for the bronchodilator, analgesic and anti - inflammatory activity. In this context, the aim of this work is to optimize the extraction process of the present amburosídeo A stem bark of *A. cearensis*. Initially, experiments were conducted to evaluate the effect of different processes ( Soxhlet , Maceration Dynamic and Ultrasound Assisted Extraction ) in extracting amburosídeo A. Different solvents (water, ethanol and water + ethanol 1:1) were used. An experimental design was also performed to evaluate the influence of some variables (power and time) on the extraction and removal of sugars analyzed the extract by two processes: adsorption and fermentation. High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HPLC -MS) was used to quantify the amount of the extracted amburosídeo. According to the results, the extracts obtained by dynamic steeping process showed higher amounts of the compound. Extracts obtained by extraction Assisted Ultrasound showed concentration values close to that obtained by dynamic steeping. Extraction made with water + ethanol (1:1) showed greater amburosídeo A content compared to other solvents. The variable power and power x time interaction were significant in Ultrasound Assisted Extraction process. Analyzing the relationship of the variables, the best condition found for amburosídeo A Ultrasonic was: 100% power for 6 minutes. The adsorption process was more efficient in the removal of sugar compared to the fermentation process. But both processes have reduced the concentration of amburosídeo during removal of sugars.

**Keywords:** Cumaru. Amburosídeo. Soxhlet. Maceration Dynamics. Ultrasound.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Evolução de publicações sobre substancias ativas de origem vegetal no período de 1960 a 2012 .....	10
Figura 02 -	Amburana cearensis na idade adulta .....	12
Figura 03 -	Principais compostos encontrados na casca do caule de <i>A. cearensis</i> .....	14
Figura 04 -	Quantidade de publicações por país sobre produtos naturais. ....	15
Figura 05 -	Áreas de publicação de artigos em produtos naturais até 2012 .....	16
Figura 06 -	Pó da casca do caule de cumaru .....	23
Figura 07 -	Processo de extração de amburosídio A em pó da casca de cumaru .....	24
Figura 08 -	Processo de fermentação do extrato aquoso obtido em ultrassom com 100% de potência durante 6 minutos de extração .....	28
Figura 09 -	Obtenção de amostra de amburosídio A.....	29
Figura 10 -	Cromatograma do espectro de massa do extrato de casca de cumaru obtido utilizando como solvente a mistura água + etanol (1:1) em diferentes processos de extração.....	35
Figura 11 -	Diagrama de Pareto para concentração de amburosídio A extraído em ultrassom utilizando água + etanol (1:1) solvente .....	39
Figura 12 -	Diagrama de Pareto para concentração de amburosídio A extraído em ultrassom utilizando etanol como solvente.....	39
Figura 13 -	Diagrama de Pareto para concentração de amburosídio A extraído em ultrassom utilizando água como solvente.....	40
Figura 14 -	Superfície de resposta para a concentração de amburosídio A utilizando água + etanol (1:1) como solvente.....	41
Figura 15 -	Superfície de resposta para a concentração de amburosídio A utilizando etanol como solvente .....	41
Figura 16 -	Superfície de resposta para a concentração de amburosídio A utilizando água como solvente .....	42
Figura 17 -	Isoterma de equilíbrio de adsorção de sacarose em extrato de cumaru .....	43
Figura 18 -	Isoterma de equilíbrio de adsorção de glicose em extrato de cumaru.....	43
Figura 19 -	Isoterma de equilíbrio de adsorção de frutose em extrato de cumaru .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Vantagens e limitações dos processos Soxhlet, Maceração Dinâmica e Ultrassom utilizados para extração. ....	19
Tabela 02 -	Resumo da pesquisa de técnicas de extração.....	20
Tabela 03 -	Percentual dos compostos identificados na casca do caule de <i>Amburana cearensis</i> na extração por diferentes solventes .....	21
Tabela 04 -	Valores numéricos e codificados das variáveis independentes .....	25
Tabela 05 -	Matriz do delineamento experimental para as diferentes condições de extração .	26
Tabela 06 -	Concentração de amburosídio A em extração por Soxhlet utilizando EtOH como solvente .....	31
Tabela 07 -	Concentração de amburosídio A (mg / 100 g) obtido pelo processo de Maceração Dinâmica em relação ao processo de Soxhlet.....	32
Tabela 08 -	Concentração de amburosídio A (mg / 100 g) pelo processo de Extração Assistida por Ultrassom.....	32
Tabela 09 -	Delineamento experimental e resposta em diferentes condições de extração assistida por ultrassom, usando água + etanol (1:1) como solvente .....	37
Tabela 10 -	Análise de Variância para extração com água + etanol (1:1) como solvente em ultrassom.....	38
Tabela 11 -	Concentração de sacarose e amburosídio A nos extratos não purificado e purificado de cumaru.....	45
Tabela 12 -	Concentração de sacarose e amburosídio A nos extratos concentrado não fermentado e fermentado de cumaru .....	45

## LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 01 - Média das concentrações de amburosídio A obtidas na variação da potência e do tempo em Extração Assistidas por Ultrassom.....	53
Apêndice 02 - Delineamento experimental e resposta em diferentes condições de extração assistida por ultrassom, usando água como solvente .....	54
Apêndice 03 - Delineamento experimental e resposta em diferentes condições de extração assistida por ultrassom, usando etanol como solvente .....	55
Apêndice 04 - Análise de Variância para extração com água como solvente em ultrassom.....	56
Apêndice 05 - Análise de Variância para extração com etanol como solvente em ultrassom...	56

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
<b>2.1 <i>Amburana cearensis</i></b> .....	12
2.1.1 Botânica .....	12
2.1.2 Aproveitamento .....	13
<b>2.2 Compostos isolados em <i>Amburana cearensis</i></b> .....	14
<b>2.3 Extração de produtos naturais</b> .....	15
<b>2.4 Técnicas de extração</b> .....	16
<b>2.5 Extração de compostos presentes em <i>Amburana cearensis</i></b> .....	21
<b>2.6 Adsorção</b> .....	22
<b>2.7 Fermentação</b> .....	22
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1 <i>Amburana cearensis</i></b> .....	23
<b>3.2 Processos de extração do amburosídio A</b> .....	23
3.2.1 Extração em Soxhlet .....	24
3.2.2 Extração em Maceração Dinâmica .....	24
3.2.3 Extração Assistida Por Ultrassom .....	25
<b>3.3 Processo de remoção de sacarose</b> .....	27
3.3.1 Remoção por adsorção .....	27



3.3.2 Remoção por fermentação .....	27
<b>3.4 Determinações analíticas .....</b>	<b>29</b>
3.4.1 Determinação da concentração de amburosídio A .....	29
3.4.2 Determinação da concentração de sacarose .....	30
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Extração em Soxhlet .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Concentração de amburosídio A nos diferentes processos de extração .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Avaliação da potência e do tempo na extração assistida por ultrassom .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Saturação da coluna .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5 Determinação da concentração de sacarose .....</b>	<b>44</b>
4.5.1 Adosrção .....	44
4.5.2 Fermentação .....	45
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>52</b>

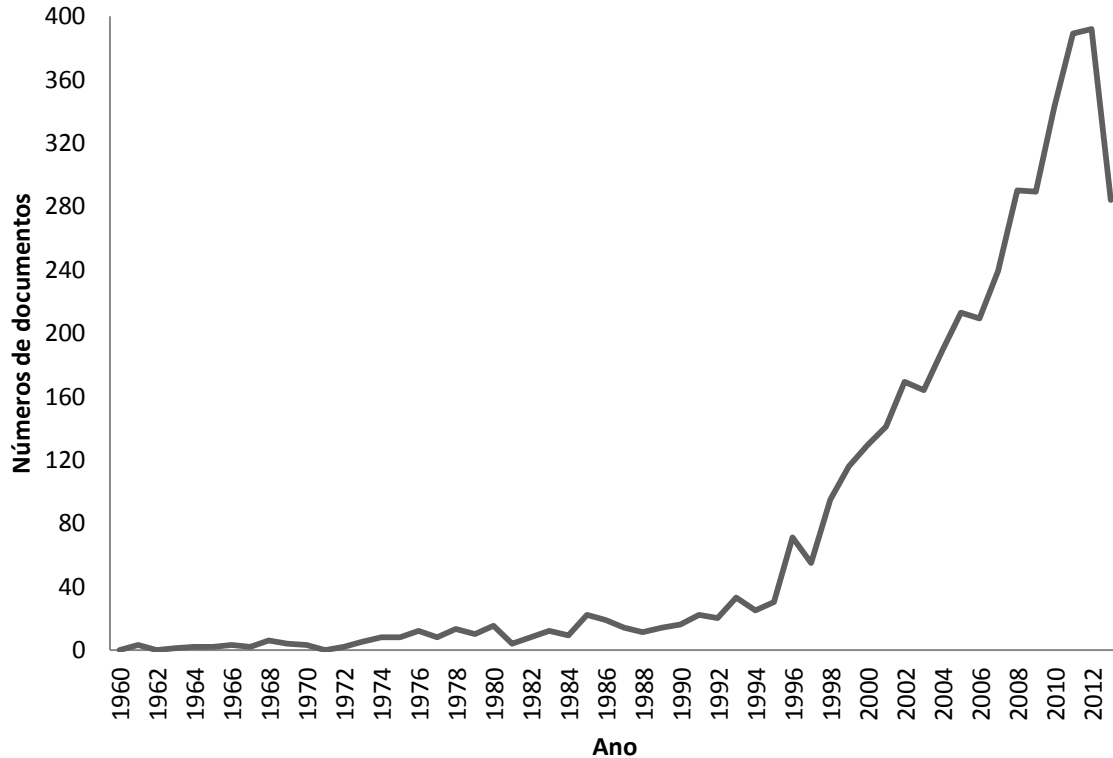
## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos obtidos de plantas para fins medicinais ocorre há milhares de anos. O chinês Shen Nung relata em sua obra *Pen Ts'* que por volta do ano 3000 a.C., já se utilizavam plantas como finalidades terapêuticas (KO, 1999). A 'Teoria das Assinaturas' desenvolvida pelo médico suíço Philippus Aureolus, conhecido como Paracelsus (1493-1541), propôs que "semelhante cura semelhante" fez com que acreditar-se que a forma, a cor, o sabor e o odor das plantas eram relacionados com suas propriedades terapêuticas. A partir desta teoria, muitas plantas passaram a fazer parte das farmacopeias alopáticas a partir do século XIX, quando teve início a investigação das bases terapêuticas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Em 1803 Friedrich Wilhelm Adam Sertürner isolou a morfina da *Papaver somniferum* marcando o início do processo de extração de bioativos em plantas, desde então outros compostos foram extraídos, como exemplo, a quinina e a quinidina em *Cinchona* spp e a atropina da *Atropa beladonna* que passaram a ser utilizados como substituintes de extratos vegetais (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2001).

Houve um desinteresse da indústria farmacêutica e dos institutos de pesquisa pela busca de novas substâncias de origem vegetal nos anos 60, uma vez que se acreditava já terem sido isoladas as principais substâncias ativas e realizadas todas as possíveis modificações químicas de interesse (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2000). A partir dos anos 80, com o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas de fontes naturais e com os avanços técnicos, houve uma maior rapidez na identificação de substâncias complexas em extratos vegetais, fazendo ressurgir um interesse pela pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006), Figura 1.

Figura 1 – Evolução de publicações sobre substâncias ativas de origem vegetal no período de 1960 a 2012.



Fonte: Scopus

Os desafios da busca de novas substâncias de origem vegetal estão sendo superados através de novas tecnologias no isolamento e elucidação estrutural de substâncias, no desenvolvimento de métodos *screening* e no uso de técnicas cromatográficas combinadas, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Ultra Violeta (CLAE/UV), criando possibilidades analíticas na padronização de amostras complexas (LEAL, 2006b).

Devido à biodiversidade, o Brasil avança no processo de desenvolvimento de programas e projetos com plantas medicinais visando o fortalecimento do país na área e o aproveitamento deste recurso de forma sustentável. O estudo de plantas medicinais chamou atenção dos pesquisadores no estado do Ceará, gerando projetos de pesquisa, patentes e publicações. Uma das espécies estudada é a *Amburana cearensis*, devido ao seu uso para fins terapêuticos (LEAL, 2006b).

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho consiste em otimizar o processo de extração de amburosídio A presente na casca do caule de *Amburana cearensis*. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito de diferentes processos de extração de amburosídio A;
- Avaliar o efeito de diferentes solventes sobre a extração de amburosídio A;
- Estudar a influência de algumas variáveis críticas (tempo e potência) e a utilização de Extração Assistida em Ultrassom sobre a extração de amburosídio A.
- Analisar os processos de adsorção e fermentação na eliminação ou redução do teor de sacarose presente no extrato de cumaru.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 *Amburana cearensis*

#### 2.1.1 Botânica

*Amburana cearensis* A. C. Smith (sin. *Torresea cearensis* Fr. All) pertence à família Leguminosae papilionoideae (Fabaceae), sendo ao lado da *Amburana acreana* os únicos representantes do gênero. Popularmente, são conhecidas diversos nomes, como imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru, sendo o último o mais utilizado, causando confusões com outra leguminosa homônima chamada *Dipteryx odorata*, ambas ricas em cumarina. Já o termo imburana costuma provocar iguais equívocos na identificação, por se referir também à *Commiphora leptophloeos* (Burseraceae), conhecida comumente como imburana-de-espinho (MAIA, 2004).

Figura 2 – *Amburana cearensis* na idade adulta.



Embora nativa do sertão nordestino e típica da caatinga, *Amburana cearensis* pode ser encontrado praticamente em toda América do Sul (do Peru à Argentina), juntamente com a outra representante do gênero, *Amburana acreana*, encontrada no sudoeste da Floresta Amazônica. Na idade adulta a árvore pode atingir até 15 m de altura e 50 cm de diâmetro, caracterizando-se por possuir flores brancas, vagem achatada e escura, além de casca

aromática com odor peculiar de cumarina (CARVALHO, 1994). Seu tronco é revestido por uma casca de cor castanha escura, com uma parte externa que se solta em camadas finas formando manchas vermelho-pardecentas e lisas. Atualmente esta espécie se encontra ameaçada de extinção devido ao uso predatório de sua madeira (ALMEIDA *et al*, 2010).

### **2.1.2 Aproveitamento**

Economicamente, *A. cearensis* apresenta importância comercial tendo suas aplicações em carpintaria e perfumaria. Comercializada com o nome de cerejeira-do-nordeste, sua madeira é utilizada na fabricação de móveis, portas e caixotaria devido à sua durabilidade, as sementes servem como aromatizantes e repelentes de insetos para roupas e estantes (MAIA, 2004).

A Farmácia-Escola/UFC, Programa Farmácias Vivas e algumas empresas privadas produzem industrialmente um xarope de cumaru a partir da casca do caule de cumaru, popularmente conhecido como “Lambedô”, o qual é aplicado no combate à gripe, resfriado, bronquite e asma (CANUTO, 2008a). Na região Nordeste, outra maneira de utilizar a casca do caule é na forma de chá ou na forma de banho para o tratamento de dores reumáticas. É comum, ainda sua utilização para o tratamento de doenças como dor de barriga, reumatismo, bronquite, tosse e asma. Segundo Almeida *et al.* (2000), a semente é utilizada no alívio de dor de dente.

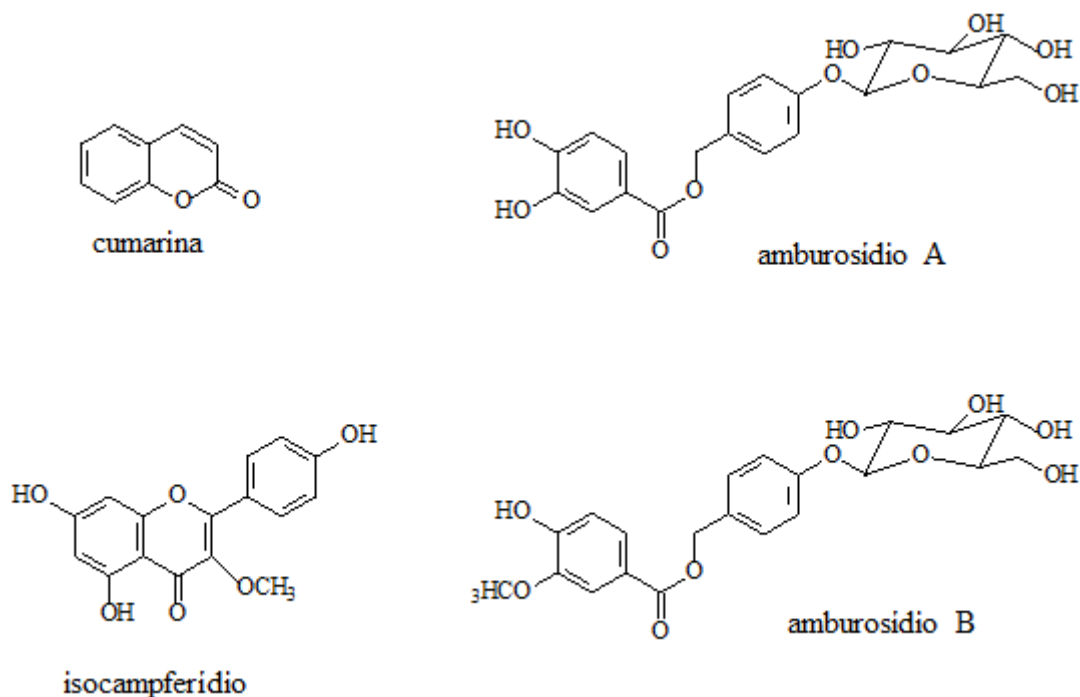
A diversificação em fins terapêuticos de *Amburana cearensis* revelou a necessidade da realização de estudos científicos que justificassem a sua indicação para o tratamento de afecções respiratórias. Assim, no início dos anos 90 foram realizados estudos químicos e testes farmacológicos com o objetivo de determinar as propriedades terapêuticas e os princípios ativos desta planta (CANUTO *et al.*, 2008b). Ensaios clínicos em extrato hidroalcoólico da casca do caule comprovaram as atividades broncodilatadora, analgésicas e anti-inflamatórias, uma vez que a eficiência e segurança foram demonstradas com a ausência de toxicidade em doses terapêuticas (CANUTO, 2008a).

Estudos de compostos isolados mostraram que o isocampferídio e o amburosídio também contribuem para atividade farmacológica da planta. O efeito de relaxante muscular em traqueias de cobaias evidenciou a ação broncodilatadora do isocampferídio (LEAL *et al.*, 2006a). Devido sua ação antioxidante, o amburosídio A possui atividade hepatoprotetora e neuroprotetora (LEAL, 2006b).

## 2.2 Compostos isolados em *Amburana cearensis*

Segundo Canuto *et al.* (2010a) os principais compostos encontrados na casca do caule de cumaru são: cumarina, responsável pelo odor peculiar, flavonóides isocampferídio, campferol e afromisina, pelos glicosídios fenólicos amburosídeo A e B, ácidos fenólicos vanílico e protocatecuico, além de quantidades abundantes de sacarose, conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3 – Principais compostos encontrados na casca do caule de *A. cearensis*.



Fonte: CANUTO; SILVEIRA, 2010a.

Compostos químicos em que um anel aromático está ligado pelo menos a um grupamento hidroxila, livre ou ligado a outras funções orgânicas, são chamados de compostos fenólicos. Uns dos grupos de compostos fenólicos são os ácidos fenólicos, caracterizados pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamento hidroxila e/ou metoxilas na molécula, adquirindo propriedades antioxidantes (BRAVO *et al.*, 1999). Chás, própolis, brócolis e outras fontes vegetais são ricos em flavonoide, chamado de campferol (YOSHIDA *et al.*, 2008).

Conhecido pelo seu largo espectro de atividades biológicas, o isocampferídio é um derivado flavônico do campferol encontrado em *Amburana cearensis*, *Cirsium rivulare*, *Centaurea bracteata* dentre outras espécies na forma livre ou glicosada (LEAL, 2006b).

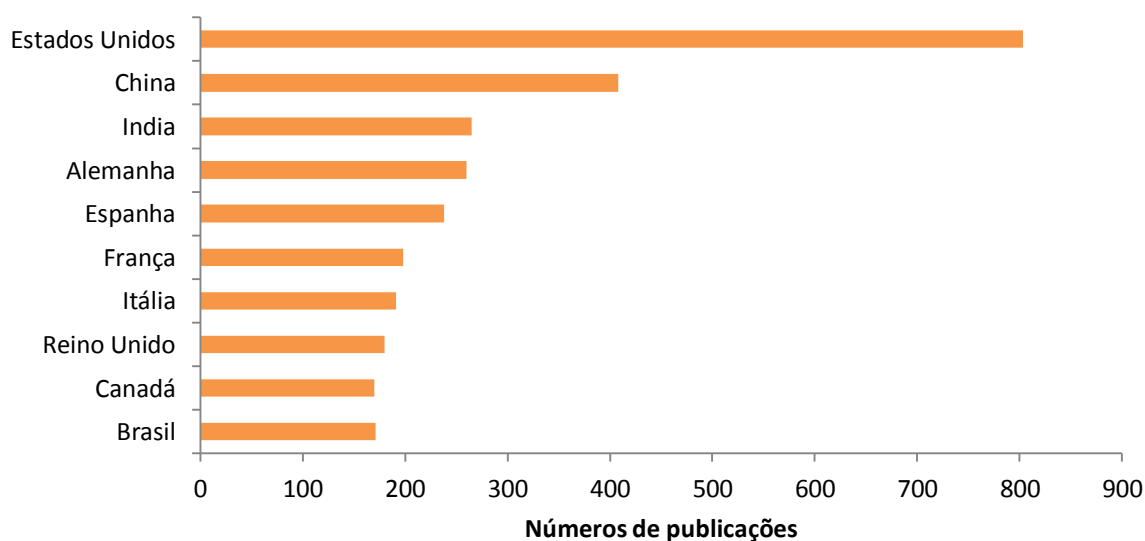
Pertencentes à família de glicosídeos fenólicos, os amburosídeos foram encontrados exclusivamente em *Amburana cearensis*. A redução do ácido *p*-hidroxi-benzóico a álcool *p*-hidroxi-bezílico leva a síntese do amburosídeo A por meio da glicosilação do éster com UDPglicose, porém, se o ácido *p*-hidroxi-benzílico for esterificado com ácido vanílico ocorrerá produção do amburosídeo B (CANUTO, 2008a).

Estudos realizados mostraram que o Amburosídeo A apresenta atividade neuroprotetora contra 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que é um derivado hidroxilado da dopamina (LEAL *et al.*, 2005). Pessoas portadoras de Doença de Parkinson provavelmente apresentam em seu organismo o 6-OHDA, uma vez que a formação endógena está relacionada com vários sinais da doença (BLUM *et al.*, 2001).

### 2.3 Extração de produtos naturais

Extração em produtos naturais tem chamado muita atenção dos pesquisadores desde o final da década de 90, constatando-se um aumento de 50% no número de artigos publicados nesta área. Os Estados Unidos é o país que mais realiza pesquisa em produtos naturais. O Brasil é o décimo país em publicações de artigos sobre extração em produtos naturais, devido a grande biodiversidade de sua flora, apresenta números muito próximos a países como Reino Unido, França, Itália e Canadá (Figura 4).

Figura 4 – Quantidade de publicações por país sobre produtos naturais.

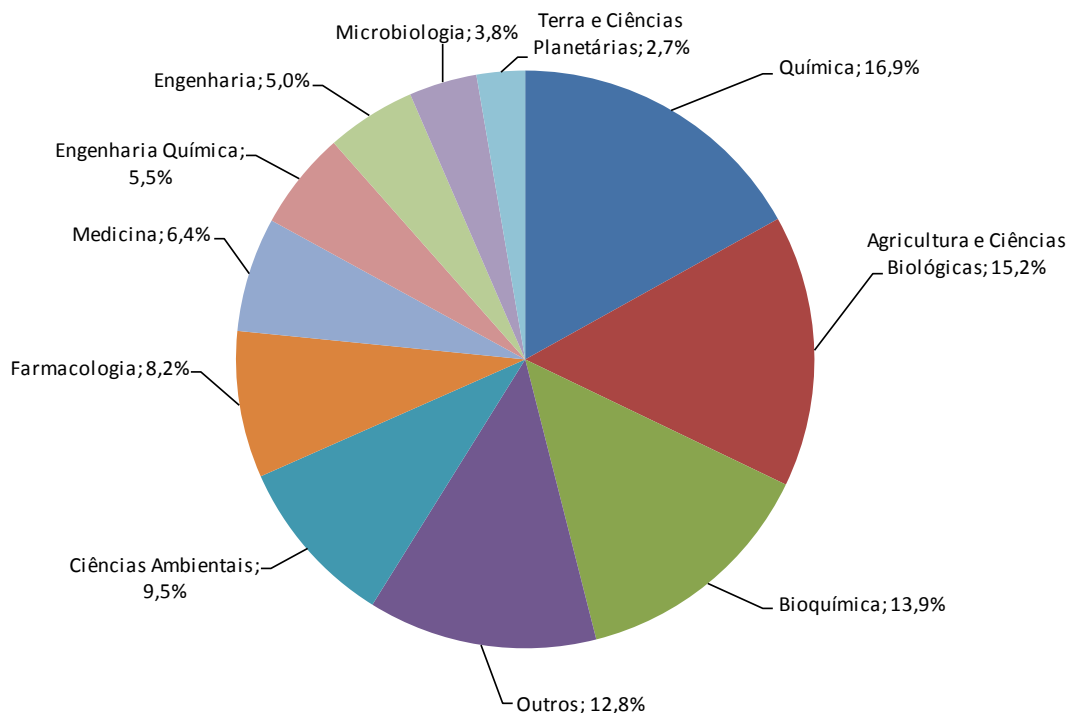


Fonte: Scopus (2013).



Química, Agricultura e Ciências Biológicas, Bioquímica, Genética e Biologia Molecular são as áreas nas quais estão mais direcionadas as pesquisas e publicações sobre produtos naturais. Apenas 5,5% dessas publicações são direcionadas a Engenharia Química (Figura 5). Desse percentual de publicações direcionado a Engenharia Química, apenas 9,2% são sobre extração de produtos naturais, sendo a utilização de ultrassom responsável por 14,5% dessas publicações, a de soxhlet com 2,7% e a maceração dinâmica com 0,1%.

Figura 5 – Áreas de publicação de artigos em produtos naturais até 2012.



Fonte: Scopus (2013).

## 2.4 Técnicas de Extração

Muitos estudos são realizados para extração de compostos fenólicos em plantas, frutas e sementes, sendo a extração por soxhlet a mais utilizada, porém, essa técnica conduz a perda de fenólicos devido à hidrólise, oxidação e ionização durante a extração. Nos últimos anos, novas técnicas têm sido desenvolvidas para extração de compostos fenólicos em plantas, tais como: extração assistida por ultrassom, extração por microondas, extração por maceração dinâmica, extração por solvente acelerado e extração com fluido supercrítico (BANJOO; NELSON, 2005). Dentre estas, a extração assistida por ultrassom é a mais barata, simples e

eficaz (WANG *et al.*, 2013), além de reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente utilizado, podendo ser realizada em temperaturas que não danifiquem o extrato (CHARPE; RATHOD, 2012). A eficiência da técnica ocorre devido à cavitação acústica no solvente pela passagem de uma onda ultrassônica, permitindo uma maior penetração do solvente na amostra, aumentando a superfície de contato entre o sólido e a fase líquida (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2003). A cavitação forma microbolhas, que aumentam e diminuem de tamanho, fazendo com que haja ciclos de expansão e compressão até que as bolhas implodem, liberando grandes quantidades de calor ocasionando o aumento da pressão na região próxima a implosão, gerando aumento da turbulência do líquido, ocasionando o rompimento das células vegetais e facilitando a difusão do solvente para o interior da matriz que junto ao calor liberado pela implosão aumenta a solubilidade dos analitos, aumentando a eficiência da extração (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE; PERALBO-MOLINA, 2011).

Skerget *et al.* (2005) aplicaram banho de ultrassom por 2 horas para extrair fenólicos e flavonóides em plantas de louro, oliveira e orégano. No estudo foram extraídos quercetina, miricetina e campferol obtendo concentrações semelhantes a encontrado na literatura. Wang e Helliwell (2001) estudaram a extração de quercetina, miricetina e campferol em chá verde e preto e afirmaram que se obtém rendimento mais elevado para quercetina e miricetina dentro de 2 horas e, para o campferol, em 3 horas.

Por sua vez, Wang *et al.* (2013) extraíram compostos fenólicos em jabuticaba em uma faixa de 20-40 min em ultrassom, obtendo a máxima extração em 40 min. Lima *et al.* (2004) utilizaram o processo de maceração dinâmica para comparar extrações de compostos fenólicos em broto de feijão-mungo, onde os extratos foram obtidos com água fervente, água a temperatura ambiente, metanol 80% e etanol 80%, com o tempo total de extração de 1 e 2 horas onde verificaram que não houve diferença estatisticamente significativa no teor de fenólicos extraídos.

Canuto *et al.* (2010b) obteve compostos fenólicos de polpa de frutos da Amazônia, tais como açaí, acerola, bacuri e murici, utilizando ultrassom durante 20 min e obtiveram resultados significativos, porém abaixo de seus valores de referência literários. Em buriti houve uma semelhança entre os teores de fenóis determinado e de referência. A maior discrepância entre os teores ocorre em bacuri e murici, com valores quatro vezes inferiores aos encontrados na literatura, podendo ter sido causada por fatores genéticos ou pela diferença do estágio de maturação dos frutos.

Outra variável levada em conta no processo de extração é o solvente utilizado. Canuto (2010b) e Skerget *et al.* (2005) utilizaram como solvente metanol. Wang *et al.* (2013) utilizaram etanol, afirmando que a extração de fenólicos depende da medida da polaridade do solvente, pois um único solvente pode não ser eficaz na extração de composto bioativos.

Outra técnica utilizada para extração de compostos fenólicos é a extração com líquido pressurizado, também conhecido por extração por solvente pressurizado ou extração por solvente acelerada. Substancialmente este processo permitiu rápida extração e redução no consumo de solvente, tem sido utilizado com sucesso na extração de compostos em uma variedade de plantas. Esta técnica permite a extração em ambiente fechado e inerte, submetido a pressões não superiores a 200 bar e temperaturas entre 25-200°C. Em comparação com as extrações realizadas a pressão atmosférica, a extração por solvente pressurizado permite que os solventes pressurizados permaneçam no estado líquido, mesmo em temperaturas acima do ponto de ebulição, permitindo a extração em altas temperaturas. Assim, solventes inertes na extração de alguns compostos fenólicos em baixas temperaturas, como etanol e água, podem ser muito eficientes à temperatura elevada comumente utilizada na extração de líquido pressurizado (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012).

Na Tabela 1 são apresentadas as vantagens e desvantagens dos processos Soxhlet, Maceração Dinâmica e Ultrassom e na Tabela 2 são apresentados exemplos das melhores condições encontradas em estudos de extração de compostos fenólicos em diferentes plantas, considerando métodos de extração, solvente e tempo.

Tabela1 – Vantagens e limitações dos processos Soxhlet, Maceração Dinâmica e Ultrassom utilizado para extração.

<b>Processo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
<b>Soxhlet</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração de altamente eficiente.</li> <li>- Amostra sempre em contato com o solvente, havendo sua renovação constante.</li> <li>- Processo simples.</li> <li>- Não há necessidade de filtração após o término da extração.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uso excessivo de solvente.</li> <li>- Utilização de solventes orgânicos.</li> <li>- Altas temperaturas.</li> <li>- Tempo longo de extração.</li> </ul>
<b>Maceração Dinâmica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Não leva ao esgotamento do composto extraído devido à saturação do líquido extrator e equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula vegetal.</li> <li>- Controle de temperatura.</li> <li>- Não leva a degradação da substância.</li> <li>- Processo simples e de baixo custo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tempo longo de extração.</li> </ul>
<b>Ultrassom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Efeito contra células vegetativas, esporos e enzimas.</li> <li>- Redução do tempo e da temperatura de processo.</li> <li>- Aumento da transferência de calor.</li> <li>- Operação por batelada ou contínua.</li> <li>- Efeito na atividade enzimática.</li> <li>- Utilizar pouco solvente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possível dano por radicais livres.</li> </ul>

Fonte: FELLOWS, 2009.

Tabela 2 – Resumo da pesquisa de técnicas de extração.

Referência	Matéria prima	Método de extração	Solvente	Tempo	Compostos extraídos
CANUTO; SILVEIRA (2010)	<i>Amburana cearensis</i>	Maceração	EtOH	24 h	Extração e isolamento de 10 compostos
CANUTO; SILVEIRA (2006)	<i>Amburana cearensis</i>	Soxhlet	EtOH	24 h	Extração e identificação de 12 compostos
NEGRI et al. (2004)	<i>Amburana cearensis</i>	Soxhlet	Hexano; clorofórmio; Acetona; MeOH	8 h	Cumarinas, Fenilpropanóides, Antraquinona, Triterpenóides, Esteróides, Alifáticos
SKWEGET et al. (2005)	Ervas (louro, orégano, oliveira)	Banho ultrassom	MeOH	2 h	Quercetina, miricetina e campferol
LIMA et al. (2004)	Broto de feijão-mungo	Agitação	Água; MeOH (80%); EtOH (80%)	método I: 2 h método II: 1 h	Fenólicos totais
CANUTO et al. (2010)	Frutas da Amazônia	Extração Assistida por Ultrassom	MeOH : água (8:2)	20 min	Compostos fenólicos
BRAVO et al. (1999)	<i>Amburana cearensis</i>	Soxhlet	Cloreto de metileno; Acetato de etila	3 h	Cumarina, Amburosídeo A e B
BANJOO; NELSON (2005)	Sedimentos	Soxhlet Extração Assistida por Ultrassom	NaOH em MeOH	12 h 6 a 30 min	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
KO; CHEIGH; CHUNG (2014)	Casca de limão; Casca de laranja; Casca de cebola	Extração Solvente Acelerado	Água	5 a 15 min	Flavonóides: Hesperidina (Limão e Laranja) Quercetina (Cebola)
CHEIGH; CHUNG; CHUNG (2012)	Casca de <i>Citrus unshiu</i>	Extração Solvente Acelerado	Água Mili-Q	10 min	Flavonóides: Hesperidina e Narirutin
KHAN et al. (2010)	Casca de laranja	Extração Assistida por Ultrassom	Água, Etanol	30 min	Hesperidina e Narigina

Fonte: Própria

## 2.5 Extração de compostos presentes em *Amburana cearensis*

A extração em soxhlet é a técnica mais utilizada para extração de compostos orgânicos, porém exige um longo tempo de extração e requer grande quantidade de solvente. Utilizando a técnica de extração e etanol como solvente, Canuto e Silveira (2006) identificaram e isolaram doze constituintes químicos da *Amburana cearensis*. Por sua vez, Bravo *et al.* (1999) utilizaram como solvente gasolina, cloreto de metileno e acetato de etila e extraíram cumarina, amburosídeo A e B.

Negri *et al.* 2004, utilizaram diferentes solventes para analisar e identificar constituintes da casca do caule de *A. cearensis*. Amostra seca de casca do caule foi submetida à extração em soxhlet na presença de hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol. O resíduo de cada extração foi submetido à purificação em coluna de sílica gel utilizando misturas de hexano, clorofórmio e metanol com aumento de polaridade. Foram identificados e isolados cumarina, diidrocumarina e o trans-3,4-dimetoxi-cinamato de metila, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Percentual dos compostos identificados na casca do caule de *Amburana cearensis* na extração por diferentes solventes.

Composto	Solventes					
	Hexano	Clorofórmio	Acetato de etila	Acetona	Metanol	Etanol
Cumarina	15	26	16	64	56	12
Diidrocumarina		17		32	9	
Trans-3,4-dimetoxi-cinamato de metila	9,5	26	6		5	

Fonte: NEGRI *et al.* 2004

Utilizando maceração dinâmica como processo de extração durante 24 horas e etanol como solvente, Canuto (2010a) obteve, além da cumarina e do isocampferídio, os ácidos vanílico e *p*-hidroxi-benzoico. Leal *et al.* (1997) obtiveram rendimento de 12% de cumarina ao realizar a extração com etanol 20% durante 24 horas.

## 2.6 Adsorção

É um processo que permite a separação de compostos (adsorbato) a partir de soluções diluídas, é um processo atraente por ser de operação simples e de facilidade na regeneração e de baixo custo (SOTO et al 2011).

Yang e Al-Duri (2005) estudaram e modelagem as isoterms de equilíbrio da adsorção por carvão ativado em fase líquida de corantes no tratamento de água residuais. Gong et al (2005) estudaram a utilização do pó da casca do amendoim como biossorvente para remoção de corantes aniônicos de soluções aquosa, onde foram removidos os corantes amaranço, amarelo-sol, rápido verde FCF. Kaya et al (2014) realizaram estudos isotérmicos de equilíbrio na utilização de farelo de trigo modificado para remoção de cromo (IV) a partir de soluções aquosas.

## 2.7 Fermentação

Durante um processo de fermentação, importantes alterações físico-químicas ocorrem. Substratos fermentáveis (glicose, frutose, sacarose) é a principal fonte de energia para microrganismos fermentativos (KIAI; HAFIDI, 2014).

O processo de fermentação pode ser dividido em dois sistemas: fermentação submersa e fermentação em estado sólido. A fermentação submersa consiste no cultivo de microrganismo em um meio líquido, onde estão presentes os nutrientes. A fermentação em estado sólido, por sua vez, consiste no crescimento microbiano e formação do produto em partículas sólidas, na ausência (ou quase ausência) da água, no entanto o substrato contém umidade suficiente para o crescimento de microrganismo. Nos últimos anos o processo de fermentação em estado sólido tem sido mais utilizado pelos pesquisadores, uma vez que possui baixo custo operacional e o baixo volume de água contribui economicamente para isso, por se usar fermentadores menores, reduzindo o custo de agitação e esterilização (MARTINS et al, 2011)..

A principal desvantagem da fermentação em estado sólido diz respeito ao aumento da escala de processo, em grande parte devido ao aumento de transferência de calor e problemas na homogeneidade de cultura. Porém, a atenção de sido dirigida para o desenvolvimento de biorreatores que superam essas dificuldades (DI LUCCIO et al, 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 *Amburana cearensis*

O pó da casca do caule de *Amburana cearensis* (Figura 6) utilizado neste estudo foi fornecido pelo Polo Moveleiro de Marco, Ceará.

Figura 6 – Pó da casca do caule de cumaru.



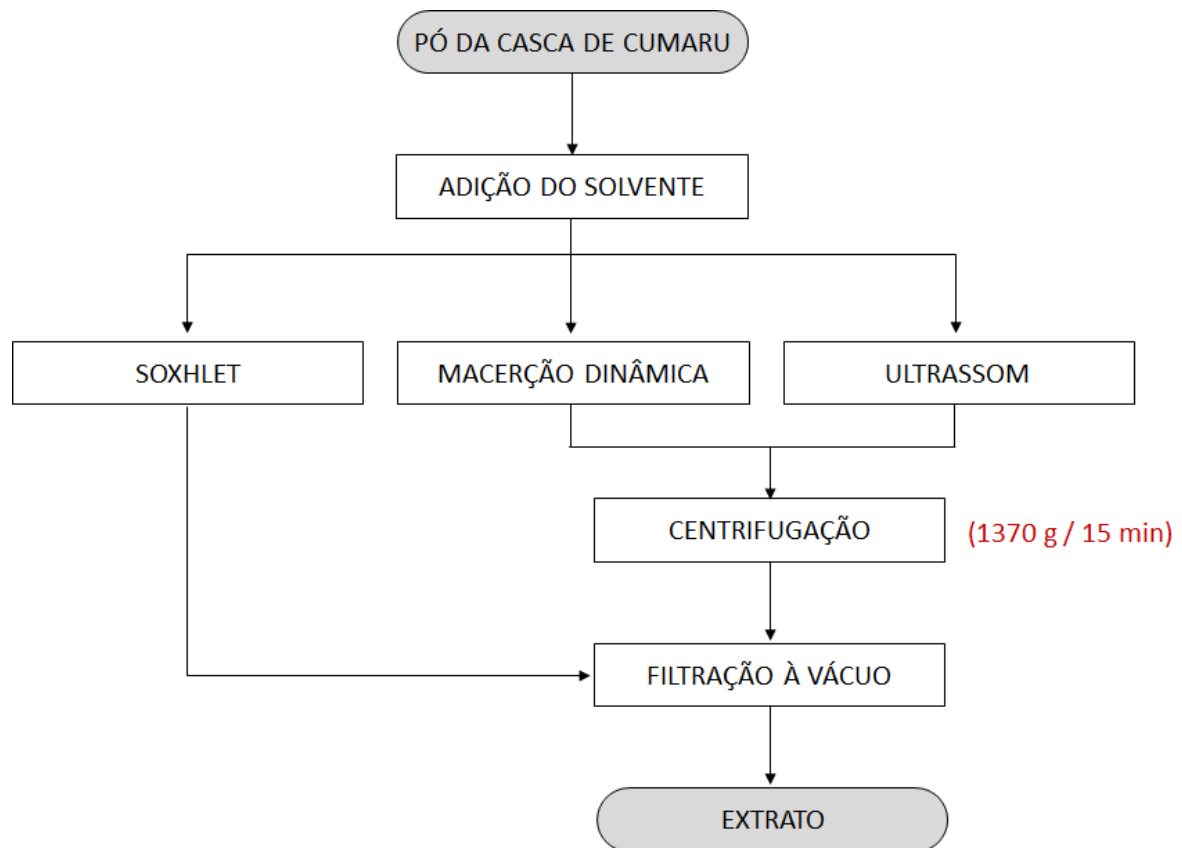
Fonte: Própria

#### 3.2 Processos de extração do amburosídeo A

O processo de extração foi realizado por meio de três métodos distintos (Figura 7): Soxhlet, Maceração Dinâmica e Ultrassom. Como solventes foram utilizados etanol 95% P.A. de marca Synth e água Mili-Q. As extrações foram realizadas em triplicata e, com exceção da extração em soxhlet que ocorreu somente com a utilização de etanol como solvente, os demais processos foram realizados com etanol, água e água + etanol (1:1, v/v), após a extração foi obtidas amostras de cada processo para análise de concentração de amburosídeo A presente no extrato. Com exceção do extrato obtido em soxhlet, uma vez que não havia partículas sólidas suspensas, o extrato foi centrifugado durante 15 min a 1370 g em centrífuga modelo KCS da marca Kindly. Após a centrifugação os extratos foram filtrados a vácuo e armazenados em garrafas PET de 330 mL e mantidos a  $-18^{\circ}\text{C}$ .



Figura 7 – Processo de extração de amburosídio A em pó da casca de cumaru.



Fonte: Própria

### 3.2.1 Extração em Soxhlet

A extração em soxhlet é o método recomendado para extração de compostos fenólicos em matrizes sólidas, por se tratar de um método eficiente. A extração foi realizada utilizando 5 g da amostra em cartucho de extração colocados em soxhlet adicionado 100 mL de etanol na proporção de 1:20 (m/v), sendo realizada em três tempos diferentes: 4, 6 e 8 horas.

### 3.2.2 Extração em Maceração Dinâmica

O processo de extração em maceração dinâmica ocorreu em evaporador rotativo modelo 801 de marca Fisatom, a temperatura de 90°C durante 2 h com rotação constante em 120 rpm, sem a utilização do vácuo, para que não ocorresse a evaporação do solvente. A relação amostra solvente foi de 1:20 (m/v) adicionada em balão volumétrico de 250 mL. O

etanol, por ser mais volátil em relação à água, foi recuperado e adicionado novamente ao balão contendo a amostra mantendo a relação massa/volume constante durante todo o processo de extração.

### 3.2.3 Extração Assistida Por Ultrassom

#### Etapa I

Os extratos foram obtidos em Ultrassom de modelo DESRUPTOR da marca Unique, de 500 W de potência. As extrações ocorreram com variação da potência do equipamento, onde para cada tempo de extração foram realizadas extrações com 50 %, 75 % e 100 % da potência do equipamento. Utilizando-se 5 g da amostra em um béquer de 200 mL e adicionando 100 mL de solvente (água, etanol, água + etanol 1:1) na relação de 1:20 (m/v). As extrações foram realizadas utilizando o tempo total de extração de 2, 4 e 6 minutos, onde para cada tempo foi realizada extrações durante 1 minuto com intervalo de mesmo período até se chegar ao tempo total de extração, evitando assim aquecimento da amostra e perda do composto.

#### Etapa II

Nesta etapa foi adotado o fatorial completo, o experimento completo consistiu de 15 experimentos sendo doze pontos fatoriais e três repetições no ponto central sendo a concentração de amburosídeo A a resposta analisada. Na Tabela 4 estão reunidos os valores numéricos e codificados das variáveis independentes adotadas neste trabalho e na Tabela 5 encontra-se a matriz do delineamento experimental.

Tabela 4 - Valores numéricos e codificados das variáveis independentes.

Variáveis	Codificação		
	-1	0	1
Potência (%)	50	75	100
Tempo (min)	2	4	6

Fonte: Própria

Tabela 5 - Matriz do delineamento experimental para as diferentes condições de extração.

<b>Ensaio</b>	<b>Potência</b>	<b>Tempo</b>
1	-1,0	-1,0
2	-1,0	-1,0
3	-1,0	-1,0
4	1,0	-1,0
5	1,0	-1,0
6	1,0	-1,0
7	-1,0	1,0
8	-1,0	1,0
9	-1,0	1,0
10	1,0	1,0
11	1,0	1,0
12	1,0	1,0
13 (C)	0	0
14 (C)	0	0
15 (C)	0	0

Fonte: Própria

O efeito das duas variáveis selecionadas foi analisado em relação à concentração de amburosídio A utilizando o Software *Statistica*, versão 7.0.

### **3.3 Processo de remoção de sacarose**

#### ***3.3.1 Remoção por adsorção***

Para a análise de saturação da coluna e de remoção da sacarose por adsorção, foi utilizado extrato de cumaru obtido por ultrassom utilizando 100 % de potência durante 6 minutos de extração, o solvente utilizado foi uma mistura de água + etanol (1:1). Foi utilizado um sistema de leito fixo equipamento da marca Buchi com sistema de bomba Buchi C-605 e controle C-615, para o empacotamento da coluna foi utilizada uma resina Dowex.

#### **Etapa I**

Na análise de saturação da coluna, inicialmente foi realizado uma limpeza na coluna com água deionizada durante aproximadamente 25 minutos a uma vazão de 3 mL/min. Em seguida, no instante convencionado como  $t = 0$ , passou-se a bombear o extrato de cumaru através da coluna com a mesma vazão. Após o preenchimento da coluna pelo extrato, a cada 2 minutos foram realizados coleta de amostra em tubo de ensaio até todo volume de extrato passar pela coluna.

#### **Etapa II**

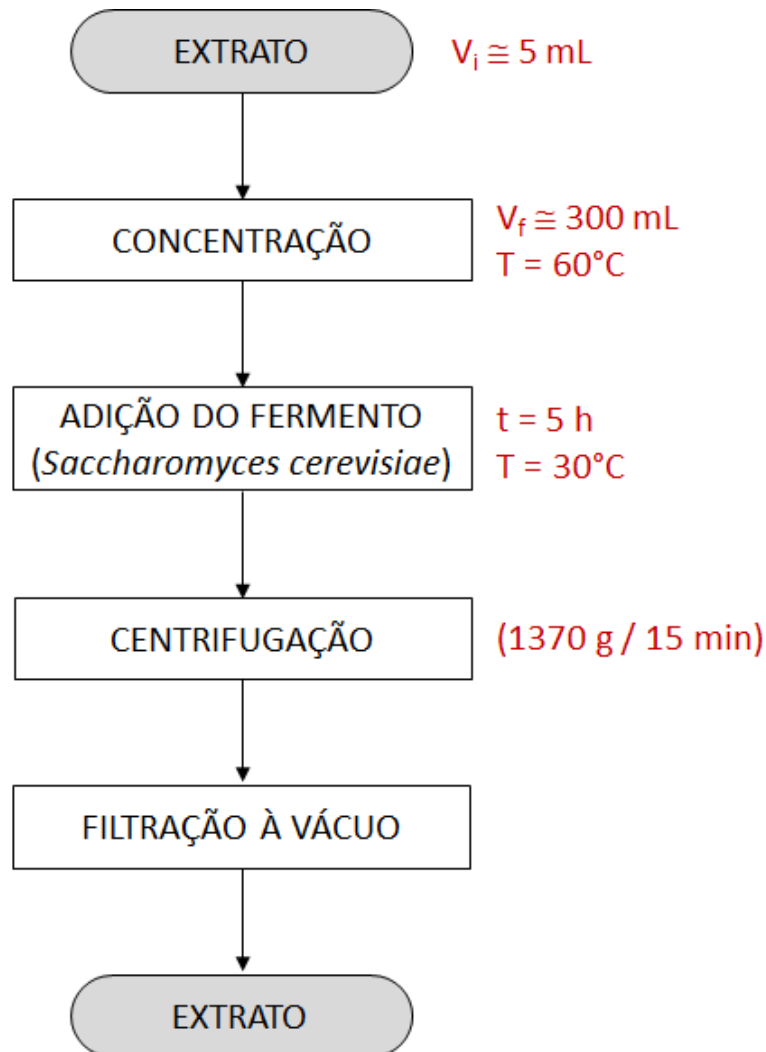
Para remoção de açúcar do extrato foi utilizado 1 litro de extrato de cumaru, onde inicialmente foi realizado o mesmo processo de limpeza da coluna da etapa I. Em seguida, passou-se a bombear o extrato através da coluna a uma vazão de 3 mL/min, e a cada 25 minutos o processo foi interrompido para limpeza da coluna com água deionizada durante 10 minutos. Após a limpeza o extrato era novamente bombeado através da coluna. O processo foi repetido até todo volume do extrato ter sido bombeado através da coluna. Após o bombeamento através da coluna, extrato foi coletado em um béquer e denominado de extrato purificado.

#### ***3.3.2 Remoção por fermentação***

Inicialmente, foi utilizado um volume de 5 L do extrato obtido em ultrassom (6 min e potência de 100%), esse extrato foi denominado de extrato não fermentado de cumaru.

Após a obtenção o extrato foi concentrado em evaporador rotativo modelo R-215 da marca Buchi, a temperatura de 60°C até atingir um volume de 300 mL obtendo a denominação de extrato concentrado de cumaru. Ao extrato concentrado de cumaru foi adicionada uma massa de fermento *Saccharomyces cerevisiae* relativo a 5% do seu volume deixando-o agir por 5 horas a temperatura de 30°C. Em seguida o extrato foi centrifugado durante 15 min a 1370 g em centrífuga modelo KCS da marca Kindly em seguida filtrado a vácuo e armazenado em garrafa PET de 330 mL. Na figura 8 apresenta-se o fluxograma do processo de fermentação do extrato aquoso.

Figura 8 – Processo de fermentação do extrato aquoso obtido em ultrassom com 100% de potência durante 6 minutos de extração.



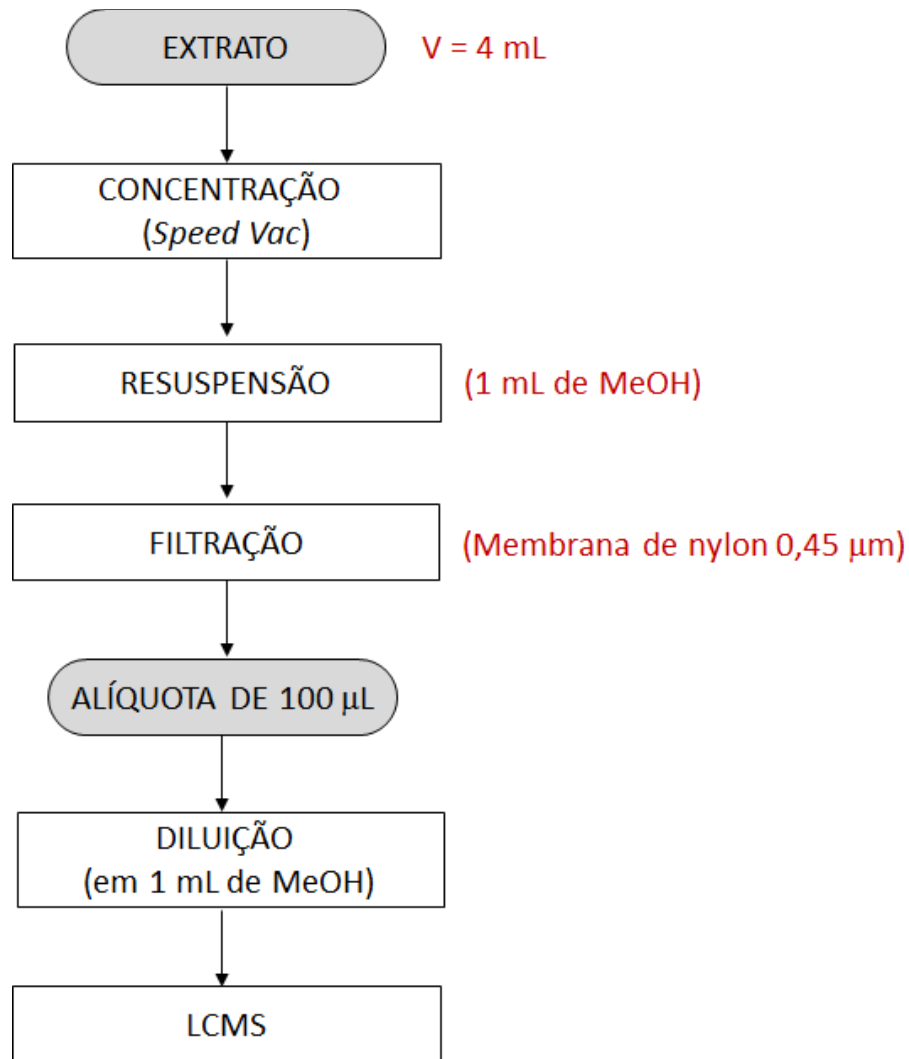
Fonte: Própria

### 3.4 Determinações analíticas

#### 3.4.1 Determinação da concentração de amburosídio A

Para determinação da concentração do amburosídio A foram utilizados metanol HPLC/Spectro da marca Tedia. Uma alíquota de 4 mL de cada extrato foi concentrada em Speed Vac modelo SPD111V-115 da marca Thermo Fisher Scientific, resuspendido em 1 mL de metanol, filtrados em membranas de nylon com poros de 0,45 $\mu$ m, retirado uma alíquota de 100  $\mu$ L, diluído em 1 mL de metanol e armazenado em vial para análise cromatográfica (Figura 9).

Figura 9 – Obtenção de amostra de amburosídio A.



Fonte: Própria

As análises cromatográficas foram realizadas no instrumento LC-DAD-ESI/MS que consiste de um sistema de bombas 250 Varian (Varian, CA) acoplado com detector de arranjo de diodos 335 (DAD) e um espectrômetro de massas 500-MS IT (Varian). Uma coluna Symmetry C18 (5  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm) foi usada com um fluxo de 400  $\mu$ L/min a uma temperatura de 30 °C. Os reagentes utilizados na fase móvel consistiram de água Mili-Q, acetonitrila HPLC/Spectro da marca Tedia e ácido fórmico da marca Vetec, com a combinação de A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila). O gradiente foi variado linearmente a partir de 30% a 50% B (v/v) em 10 min, para 80% B a 15 min e, finalmente, para 100% B a 16 min e mantido a 100% B até 20 min. O comprimento de onda do DAD foi de 270 nm. O espectro de massas foi simultaneamente adquirido usando ionização por eletrospray nos modos positivo e negativo (PI e NI) a voltagem de fragmentação de 80 V para uma faixa de massas de 100 – 2000 u.m.a. A pressão do gás de secagem foi de 35 psi, a pressão do nebulizador de 40 psi, a temperatura do gás de secagem de 370 °C, voltagens de 3500 V para PI e 3500 V para NI, e a voltagem de campo do spray de 600 V foram utilizados. O sistema LC foi diretamente acoplado ao MSD e a identificação dos compostos foi primariamente baseada nos espectro de UV, espectro de massas e injeção de padrão. Os resultados da concentração de amburosidio A foram expressos em mg / 100g de casca de caule de cumaru.

### ***3.4.2 Determinação da concentração de sacarose***

A determinação de sacarose foi obtida nos extratos por ultrassom, nos extratos submetidos aos processos de fermentação e adsorção. Uma alíquota de 2 mL de cada extrato foi filtrado a vácuo em cartucho C18 da marca Supelclean, previamente condicionado e, em seguida, armazenado em vial. A concentração de sacarose foi determinada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Varian 3380, equipado com duas bombas modelo ProStar 210, coluna analítica Hipler Pb (8  $\mu$ m, 300 x 7,7 mm ID) e pré-coluna Hipler Pb (50 x 7,7 mm ID). A temperatura da coluna foi de 65°C e foi utilizada água grau HPLC com um fluxo isocrático de 0,6 mL / min, o tempo de análise foi de 35 minutos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração em Soxhlet

Na Tabela 6 verificam-se as concentrações de amburosídeo A na casca do caule de cumaru obtido por soxhlet nos três tempos de extração utilizando etanol como solvente. Como o aumento de temperatura tende a favorecer a solubilização das substâncias, foi observado que a concentração máxima de amburosídeo A ocorreu com 6 horas de extração, uma vez que 4 horas não foi suficiente para extrair todo composto e com 8 horas ocorre uma diminuição da concentração, logo se supõe que os fenômenos difusivos passam a ser maiores em um período situado entre 4 e 8 horas. Segundo Muñiz-Márquez *et al* (2013) o tempo de extração em elevada temperatura pode ocasionar na degradação de compostos biotivos. As concentrações de amburosídeo A obtido em soxhlet foi cerca de 41% inferior ao obtido no processo de maceração dinâmica e cerca de duas vezes maior ao extraído em ultrassom utilizando etanol como solvente, porém foi bastante superior ao extraído por Canuto (2008) que obteve 5 mg / 100 g de casca.

Tabela 6 – Concentração de amburosídeo A em extração por Soxhlet utilizando EtOH como solvente.

Tempo de extração (h)	Concentração de amburosídeo A (mg/100g de casca)
4	421,92 ± 68,57
6	522,15 ± 24,26
8	503,97 ± 34,94

Fonte: Própria

### 4.2 Concentração de amburosídeo A nos diferentes processos de extração

Os resultados obtidos da concentração de amburosídeo A na casca do caule de cumaru pelo processo de Maceração Dinâmica e Extração Assistida por Ultrassom, utilizando como solvente etanol, água e água + etanol (1:1), são mostrados na Tabela 7 e Tabela 8, respectivamente. Pode-se observar que no processo de extração em Maceração Dinâmica, o extrato obtido com água + etanol (1:1) apresentou quantidade de amburosídeo A superior em relação à extração em Soxhlet, que utilizou apenas etanol como solvente. O melhor



desempenho na extração do composto realizado utilizando água + etanol (1:1) ocorre devido à mistura de água e etanol proporcionar uma elevação de polaridade e de viscosidade do solvente, ocorrendo uma melhor interação com o composto em estudo, aumentando a eficiência de extração. Conforme estudado por Hussain *et al.* (2011) e Wijekoon *et al.* (2011), em extração de fenólicos em casca de amendoim e rosas de porcelana, respectivamente, observaram que o aumento dessas propriedades em solventes contendo mistura água e etanol mostraram uma melhor eficiência em extração de compostos fenólicos de origem vegetal. Esse efeito também foi observado por Gironi & Piemonte (2011) em extração de polifenóis em madeira de castanheira.

Tabela 7 – Concentração de amburosídio A (mg / 100 g) obtido pelo processo de Maceração Dinâmica em relação ao processo de Soxhlet.

Processo	Concentração amburosídio A (mg / 100g)		
	Etanol	Água+Etanol (1:1)	Água
Soxhlet (6h)	522,15 ± 24,26	—	—
Maceração dinâmica	878,0 ± 31,0	931,6 ± 65,0	666,0 ± 61,9

Fonte: Própria

Tabela 8 – Concentração de amburosídio A (mg / 100 g) pelo processo de Extração Assistida por Ultrassom.

Potências	Ultrassom	Tempo		
		2 min	4 min	6 min
Potência 50%	Etanol	248,5 ± 24,4	248,4 ± 23,9	239,7 ± 1,7
	Água + Etanol (1:1)	236,1 ± 15,6	232,6 ± 7,1	236,6 ± 17,8
	Água	34,3 ± 3,6	28,8 ± 8,3	18,4 ± 3,2
Potência 75%	Etanol	153,1 ± 13,2	162,0 ± 2,4	156,9 ± 11,6
	Água + Etanol (1:1)	138,2 ± 5,6	154,3 ± 8,2	127,5 ± 0,8
	Água	23,7 ± 5,8	39,0 ± 11,0	41,4 ± 2,9
Potência 100%	Etanol	170,6 ± 13,9	160,4 ± 17,6	176,2 ± 0,15
	Água + Etanol (1:1)	431,8 ± 7,1	434,4 ± 43,1	515,9 ± 28,8
	Água	53,3 ± 13,8	35,3 ± 2,5	24,9 ± 6,5

Fonte: Própria

Nos extratos obtidos no processo de Extração Assistida em Ultrassom (Tabela 8), pode-se verificar que a variação da potência fornece como melhor resultado, de concentração de amburosídio A, extração realizada com a mistura água + etanol (1:1). Porém, na potência de 50%, os extratos contendo etanol e mistura água + etanol tiveram valores muito próximos, tendo no extrato etanólico uma concentração de amburosídio A extraído pouco superior. Os cálculos de comparação entre as concentrações obtidas com a variação da potência e do tempo foram baseados na média da concentração do composto extraída em um mesmo solvente, a tabela contendo as médias das concentrações encontra-se apresentado no Apêndice 01. Ao aumentar a potência de extração para 75%, novamente a extração em etanol apresentou os melhores resultados em torno de aproximadamente 11% a mais em relação ao extrato da mistura água + etanol (1:1) e de 88% em relação ao extrato aquoso. Ao realizar as extrações com uma potência de 100%, os melhores resultados de extração de amburosídio A também foram obtidos com a mistura água + etanol (1:1), sendo estes resultados os melhores em relação às demais potências utilizadas. O extrato com a mistura água + etanol (1:1) apresentou nesta potência, um resultado de extração de aproximadamente 64% e 92% superiores em relação aos extratos etanólico e aquoso, respectivamente. Quanto maior a potência maior será a amplitude da onda viajando através do meio líquido, gerando um aumento no colapso das bolhas sobre as estruturas da amostra (HEMWIMOL *et al.* 2006). Quando as ondas batem na superfície do material gera uma força, que paralela à superfície, produz uma onda de cisalhamento e cavitação rompendo a estrutura do material melhorando a eficiência de extração (FELLOWS, 2009). Independente da potência, o extrato aquoso apresentou as menores concentrações de amburosídio A em relação aos demais solventes.

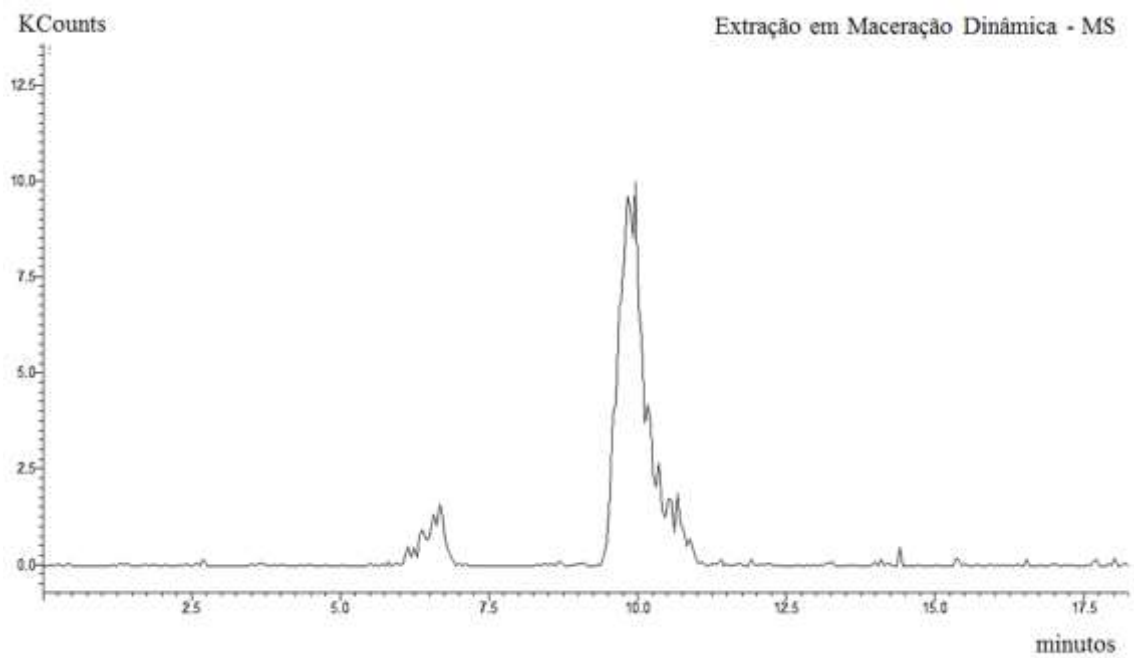
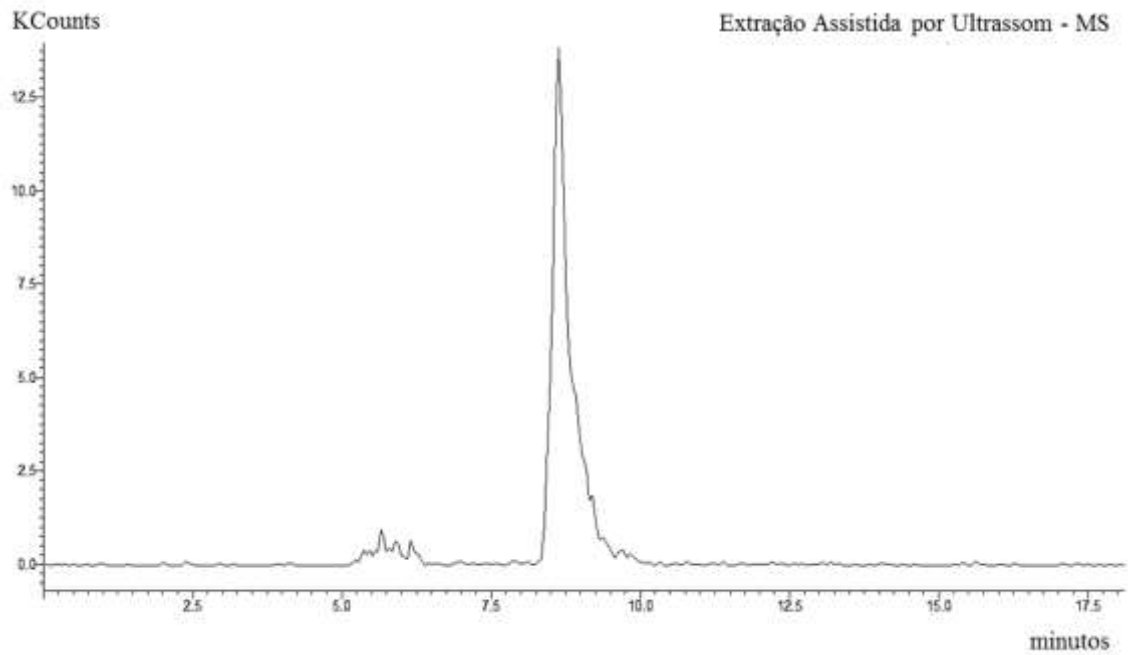
Ao analisar a variável tempo no processo de Extração Assistida por Ultrassom, pode-se verificar que o aumento do tempo de extração não influenciou nas extrações com etanol e na mistura água + etanol (1:1) na potência de 50%, ocorrendo um decréscimo na extração em meio aquoso. Ao fixar a potência em 75% e variar o tempo de extração, foi observada uma redução na concentração de amburosídio A extraído em relação às concentrações extraídas na potência de 50%. Segundo Maran *et al.* (2013), o colapso de micro-bolhas produzido pela cavitação próximo a amostra pode provocar uma redução na concentração do composto. O mesmo efeito foi observado por Sun *et al.* (2011), na extração de  $\beta$ -caroteno em casca de frutas cítricas utilizando extração assistida por ultrassom, onde os autores afirmam que a redução de concentração ocorre devido a combinação de cavitação e efeitos térmicos, no qual muitas bolhas podem dificultar a propagação de ondas e o seguido aumento do rendimento ocorre devido a combinação de absorção de calor e redução do efeito

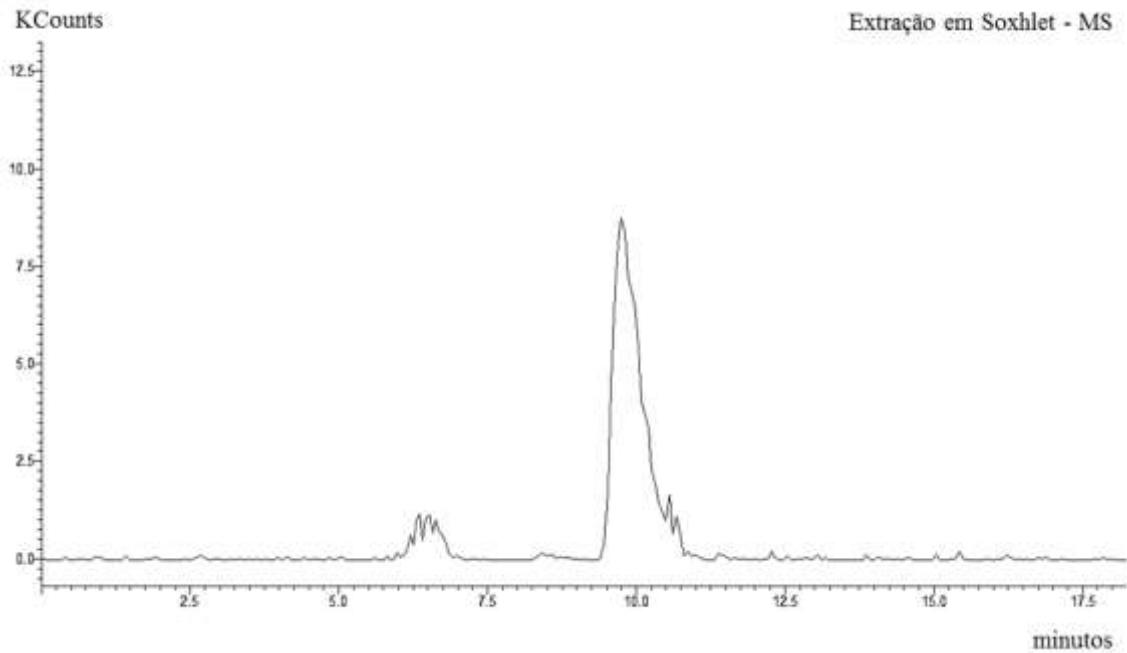
da cavitação. Nos extratos contendo a mistura água + etanol (1:1), o aumento do tempo de extração proporcionou um aumento na extração do composto na potência de 100%, obtendo nesta condição de extração concentrações aproximadamente 49% e 70% superiores em relação às potências de 50% e 75%, respectivamente. Para Ko, Cheigh & Chung (2014) tempo de extração inferior a 20 minutos, para ingredientes ativos, pode ser apropriado uma vez que o processo de ultrassom aumenta os poros das paredes celulares das plantas resultando numa melhor transferência de massa do soluto para o solvente, reduzindo o tempo de extração. Chen *et al.* (2007) relataram em seu estudo de extração de antocianinas em framboesa vermelha utilizando a Extração Assistida por Ultrassom, que o tempo de extração prolongado pode levar a degradação do composto. Para os extratos aquosos, houve uma redução da concentração extraída com o aumento do tempo de extração, e a utilização da água como solvente apresentou as menores concentrações de amburosídio A extraído.

Dos solventes utilizados para extração de amburosídio A em Extração Assistida por Ultrassom, a mistura água + etanol (1:1) apresentou as maiores quantidades do bioativo extraído em relação aos outros solventes. O melhor desempenho utilizando a mistura água + etanol (1:1) ocorre, segundo Sahin & Samli (2013), devido à baixa viscosidade apresentada pela mistura alterando assim a estrutura da matriz permitindo uma boa penetração do solvente, melhorando o intumescimento do material vegetal. Segundo o mesmo autor, a água pura mesmo sendo mais polar, possui uma alta viscosidade em relação à mistura em etanol. O etanol por sua vez, interrompe a ligação entre o soluto e a matriz vegetal. D'Alessandro *et al* (2012) menciona que altas concentrações de etanol desnatura as proteínas impedindo a dissolução dos fenólicos, influenciando no processo de extração. Essas características contribuem para a mistura água + etanol (1:1) ter um melhor desempenho na extração de fenólicos em planta.

As amostras de amburosídio A obtidas do extrato da mistura água + etanol (1:1) da casca de cumaru pelos diferentes processos de extração foram injetadas em CLAE-EM resultando na separação do pico com tempo de retenção entre 7,85 e 10 minutos. Na Figura 10 podemos observar os cromatogramas do espectro de massa do extrato de casca do caule de cumaru nos diferentes processos de extração, utilizando água + etanol (1:1) nas extrações em ultrassom e maceração dinâmica e somente etanol na extração em soxhlet, onde o pico referente a extração do amburosídio A teve uma maior intensidade nas extrações realizada com a mistura água + etanol (1:1), demonstrando um melhor desempenho deste solvente em relação aos outros.

Figura 10 – Cromatograma do espectro de massa do extrato de casca de cumaru obtido utilizando como solvente a mistura água + etanol (1:1) em diferentes processos de extração.





Fonte: Própria

#### 4.3 Avaliação da potência e do tempo na extração assistida por ultrassom

Devido ao bom desempenho do ultrassom na extração do amburosídeo A, foram realizados experimentos para avaliar o efeito da potência e do tempo de extração. Os resultados experimentais para as diferentes condições de extração do amburosídeo A da casca do caule de cumaru obtido pelo delineamento fatorial completo, usando água + etanol (1:1) como solvente são mostrados na Tabela 9. No Apêndice 2 e Apêndice 3 encontram-se os resultados experimentais para extrações realizadas utilizando como solvente somente água e etanol, respectivamente.

Tabela 9 – Delineamento experimental e resposta em diferentes condições de extração assistida por ultrassom, usando água + etanol (1:1) como solvente.

Ensaio	Potência (%)	Tempo (min)	Amburosídio A (mg / 100 g)
1	50	2	251,1
2	50	2	219,9
3	50	2	237,3
4	100	2	495,7
5	100	2	436,9
6	100	2	426,8
7	50	6	224,0
8	50	6	249,1
9	50	6	186,0
10	100	6	495,5
11	100	6	536,2
12	100	6	621,5
13 (C)	75	4	160,8
14 (C)	75	4	157,0
15 (C)	75	4	145,1

Fonte: Própria

Foram realizados 15 experimentos para se avaliar o efeito de diferentes variáveis na quantidade de amburosídio A. Na Tabela 10 podemos observar os valores da análise de variância do modelo para extrações em ultrassom utilizando como solvente a mistura água + etanol (1:1), a ANOVA para os demais solventes encontram-se no Apêndice 4 e 5. De acordo com a tabela ANOVA, o coeficiente de correlação obtido foi satisfatório ( $R^2 = 0,73$ ). O coeficiente de correlação quantifica a qualidade do ajustamento, pois, fornece uma medida de proporção da variação explicada pela equação em relação à variação total das respostas (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Tabela 10 – Análise de Variância para extração com água + etanol (1:1) como solvente em ultrassom.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Valor F</b>
<b>Potência (L)</b>	225556,92	1	225556,92	25,35
<b>Tempo (L)</b>	4985,76	1	4985,76	
<b>Potência x Tempo</b>	9804,08	1	9804,08	
<b>Resíduo</b>	106546,77	1	106546,77	
<b>Erro Puro</b>	13680,01	10	1368,0	
<b>Total</b>	360573,55	14		

Fonte: Própria

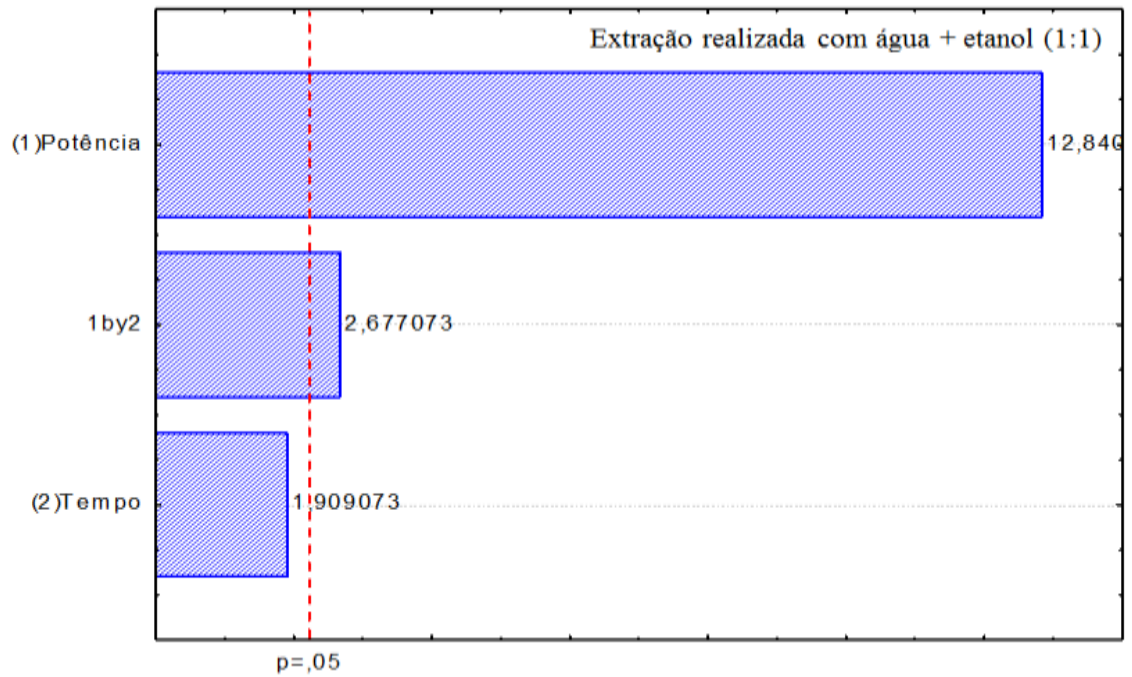
A equação 1 onde representa o modelo fatorial completo para as variáveis, considerando 95% de confiança e  $F = 25,35$ , representando a validação do modelo uma vez que o  $F_{cal}$  foi superior ao  $F_{tab} = 3,40$ .

$$y = 322,86 + 274,20x_1 + 40,76x_2 + 57,16x_1x_2 \quad (1)$$

Onde: y: Concentração de amburosídio A (mg / 100g de casca),  $x_1$ : potência e  $x_2$ : tempo

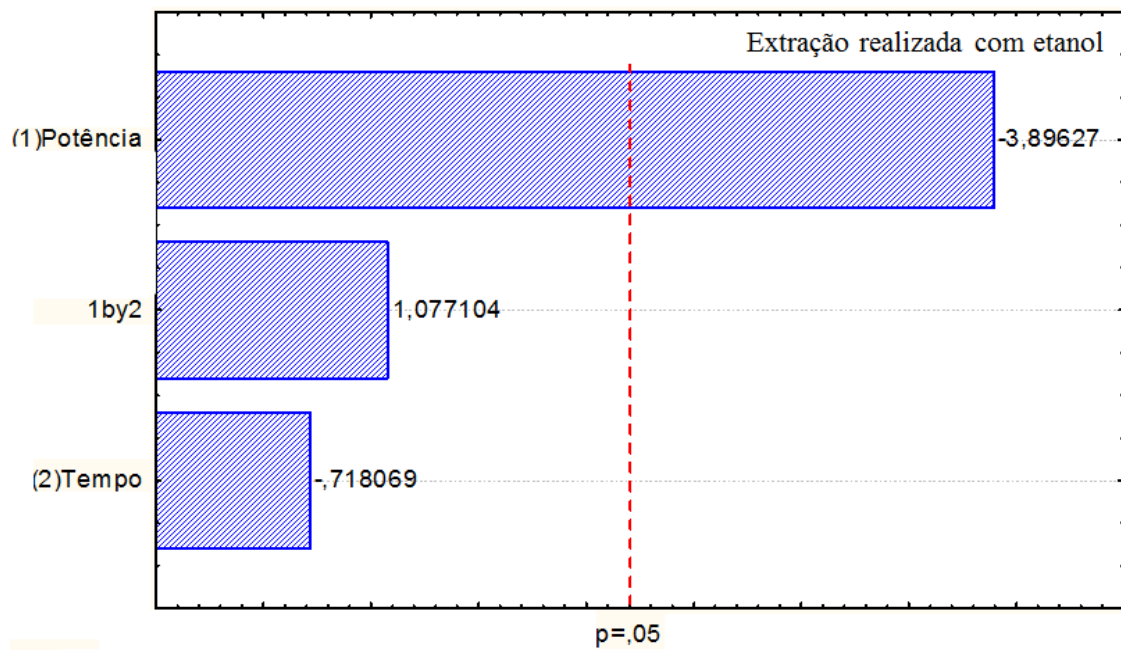
O diagrama de pareto, onde os valores absolutos de  $t_{cal}$ , também denominados efeitos padronizados, fornecem as alturas das barras e o valor de  $t_{tab}$  fornece o limite a partir do qual os efeitos são significativos. Na Figura 11 podemos observar o diagrama de pareto na extração realizada com água + etanol (1:1) a variável Potência (1) e a interação Potência x Tempo (1by2) foram significativas, já a variável Tempo (2) não foi significativa ao nível de 95% de confiança. A Potência e a interação Potência x Tempo apresentaram efeito positivo, ou seja, a elevação destas variáveis promove um aumento no teor de amburosídio A. O mesmo não aconteceu no pareto (Figura 12) da extração realizada com etanol, uma vez que somente a Potência foi significativa. Nas extrações realizadas com água, o pareto (Figura 13) dessa extração mostra que as alterações das variáveis Potência e Tempo, e a interação entre elas, não forneceu nenhum efeito significativo no processo de extração do amburosídio A.

Figura 11 – Diagrama de Pareto para concentração de amburosídio A extraído em ultrassom utilizando água + etanol (1:1) solvente.



Fonte: Própria

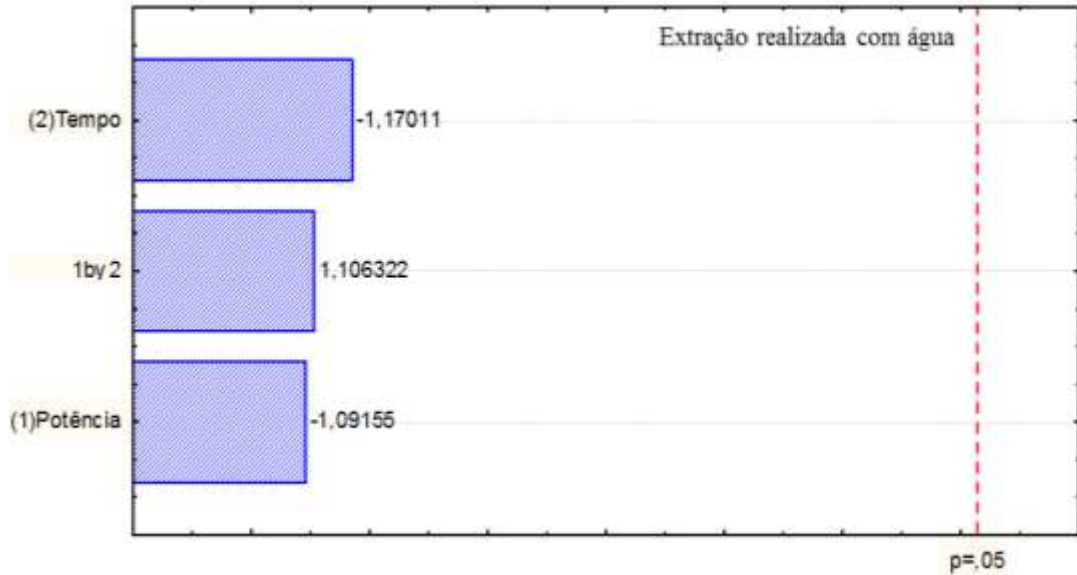
Figura 12 – Diagrama de Pareto para concentração de amburosídio A extraído em ultrassom utilizando etanol como solvente.



Fonte: Própria



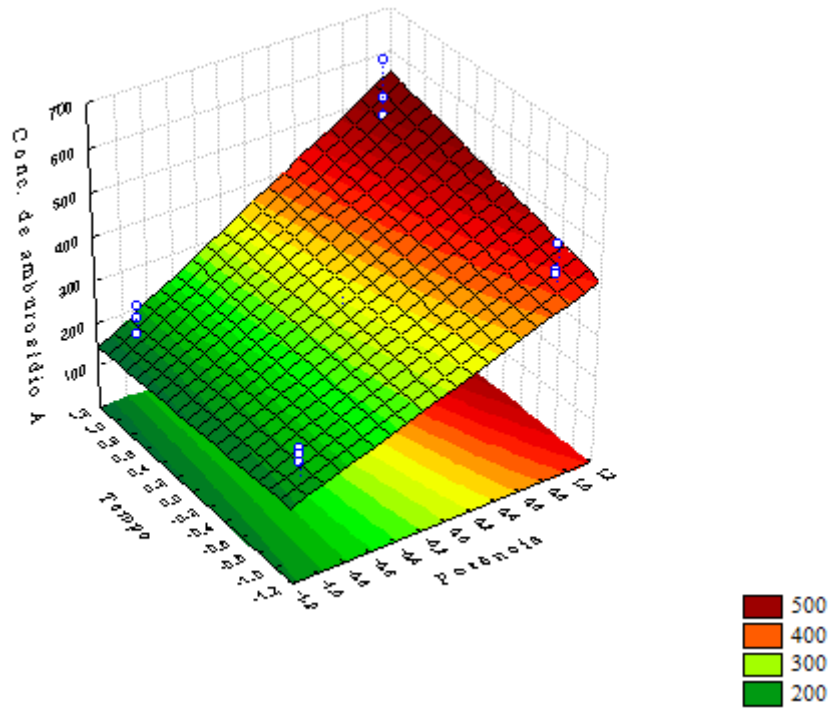
Figura 13 – Diagrama de Pareto para concentração de amburosídio A extraído em ultrassom utilizando água como solvente.



Fonte: Própria

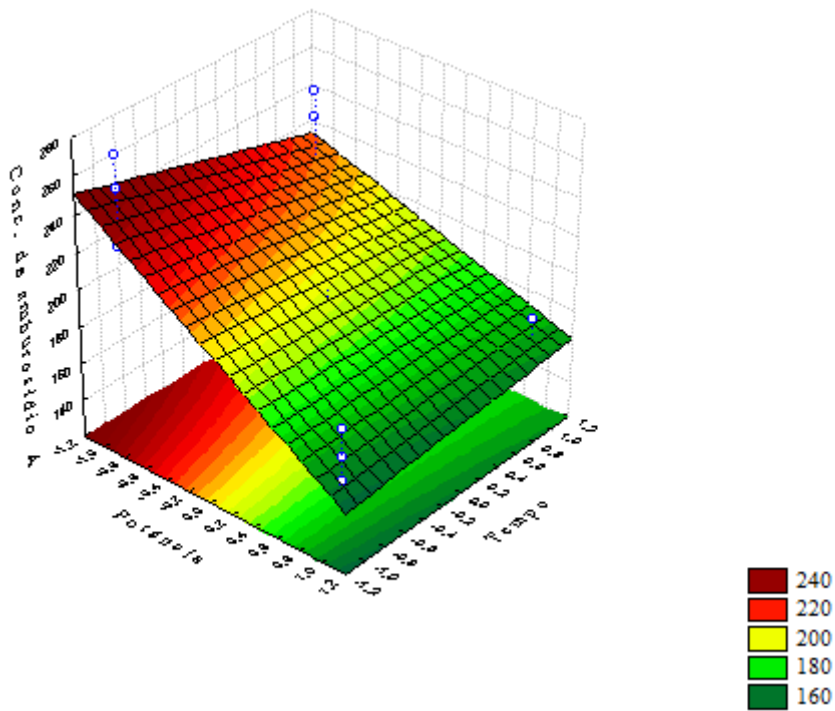
O efeito da variável Potência e da interação Potência x Tempo, na extração realizada com água + etanol (1:1) como solvente, também é demonstrado no gráfico de superfície de resposta (Figura 14) onde podemos observar que o aumento dessas variáveis resulta em um aumento no teor de amburosídio A, efeito semelhante foi encontrado por Fernández-Ronco *et al.* (2012) na extração de compostos bioativos em *Capsicum annuum* utilizando Extração Assistida por Ultrassom. As superfícies de resposta das extrações realizadas com etanol (Figura 15) e água (Figura 16) representam que o aumento das variáveis Potência e Tempo não interfere significativo para o aumento da extração de amburosídio A.

Figura 14 – Superfície de resposta para a concentração de amburosídio A utilizando água + etanol (1:1) como solvente.



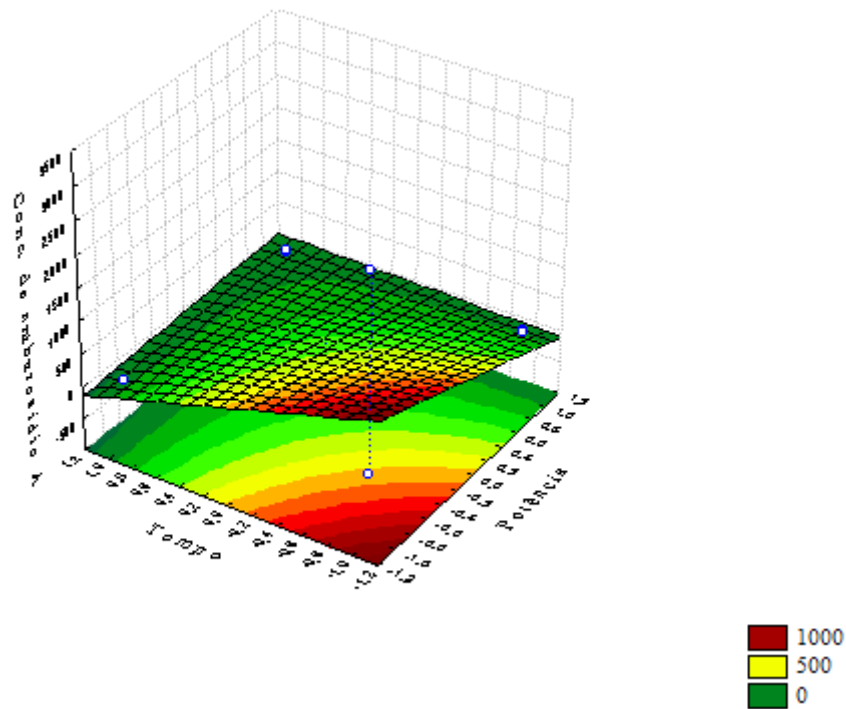
Fonte: Própria

Figura 15 – Superfície de resposta para a concentração de amburosídio A utilizando etanol como solvente.



Fonte: Própria

Figura 16 – Superfície de resposta para a concentração de amburosídeo A utilizando água como solvente.

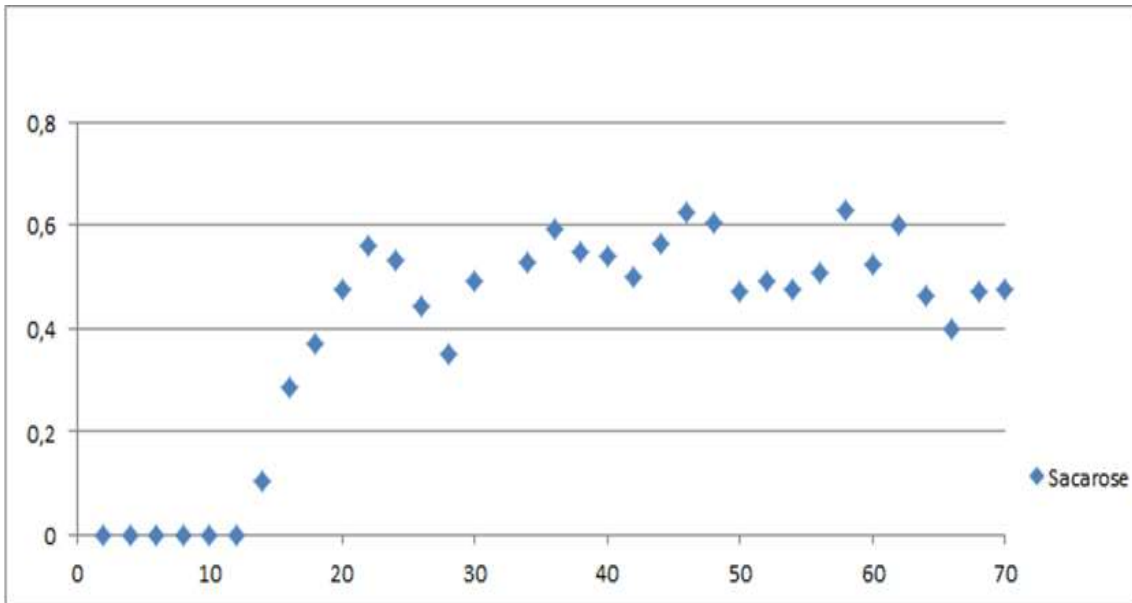


Fonte: Própria

#### 4.4 Saturação da coluna

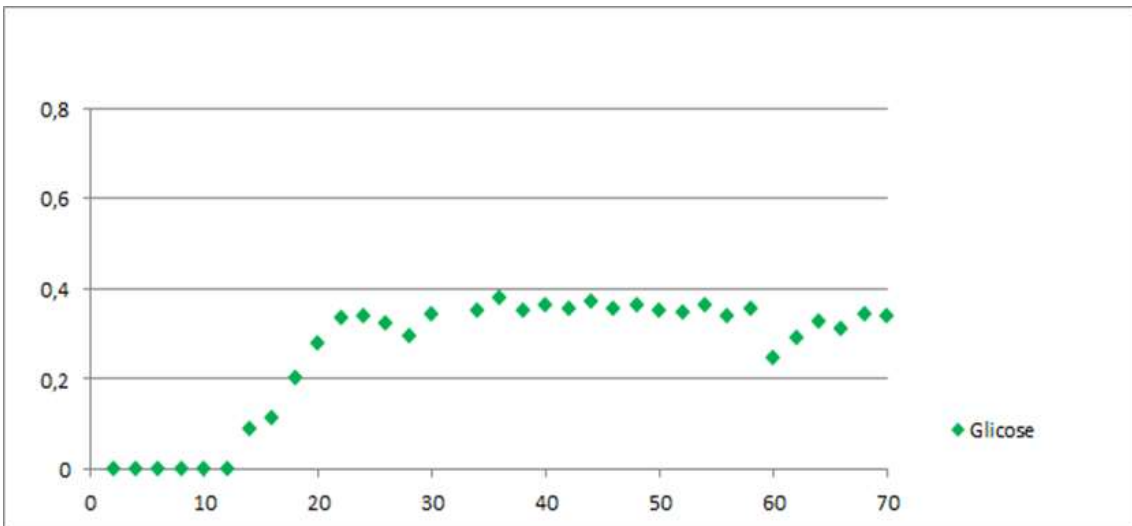
O tempo necessário para se atingir o equilíbrio, condição de completa saturação, foi verificado pela isoterma de adsorção obtida pelo método dinâmico da análise frontal. As Figuras 17, 18 e 19 apresentam as curvas de rupturas da sacarose, glicose e frutose na resina Dowex, onde o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio foi de 20 minutos para sacarose e aproximadamente 23 minutos para glicose e frutose.

Figura 17 – Isoterma de equilíbrio de adsorção de sacarose em extrato de cumaru.



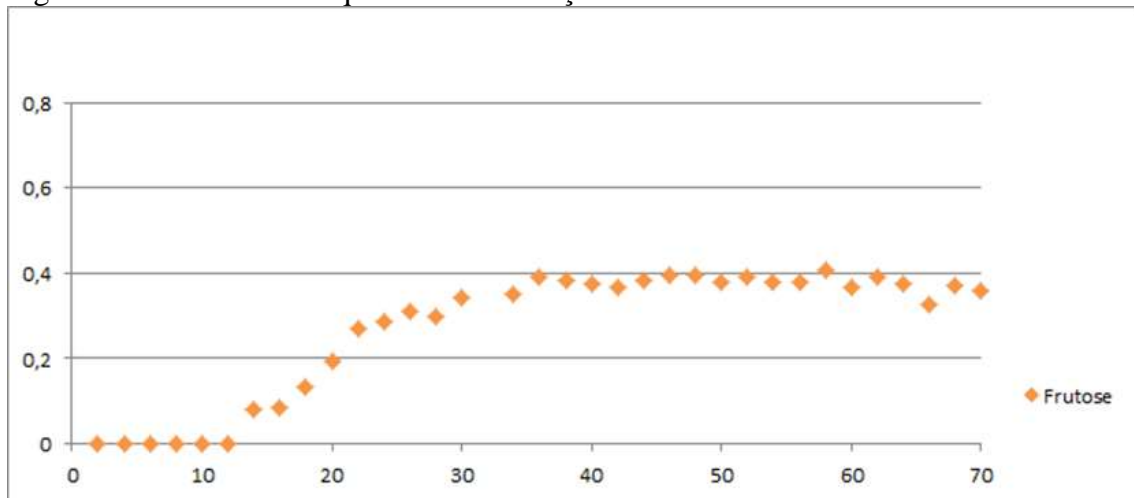
Fonte: Própria

Figura 18 – Isoterma de equilíbrio de adsorção de glicose em extrato de cumaru.



Fonte: Própria

Figura 19 – Isoterma de equilíbrio de adsorção de frutose em extrato de cumaru.



Fonte: Própria

#### 4.5 Determinação da concentração de sacarose

No extrato aquoso da casca do caule de cumaru estão presentes, além do amburosídeo A, outros compostos dentre eles a sacarose. Desta forma foi realizado um processo de fermentação e de adsorção com o objetivo de eliminar ou reduzir a carga de compostos que atrapalharia o processo de purificação amburosídeo A.

##### 4.5.1 Adsorção

A análise de adsorção de sacarose pela coluna contendo a resina Dowex mostrou-se bastante eficiente, uma vez que toda sacarose presente foi removida do extrato. Porém, a remoção da sacarose ocasionou uma redução de aproximadamente 54% da concentração de amburosídeo A presente no extrato (Tabela 11). Essa redução pode ter sido ocasionada pela adsorção, da molécula de amburosídeo A, por sua região glicosilada pela resina.

Tabela 11 – Concentração de sacarose e amburosídio A nos extratos não purificado e purificado de cumaru.

	<b>Concentração de sacarose (mg / L)</b>	<b>Concentração de amb. A (mg / L)</b>
Não Purificado	752,0	6.754,43
Purificado	0	3.100,12

Fonte: Própria

#### 4.5.2 Fermentação

A análise de sacarose foi realizada no extrato não fermentado e no extrato após a fermentação, na Tabela 12 pode-se observar uma redução na concentração de sacarose de 49%, porém o processo de fermentação ocasionou uma redução de 26,20% na concentração do amburosídio A. Essa redução pode ter sido provocada pela complexação dos compostos com a parede da levedura ou podem ter sidos consumidos.

Tabela 12 – Concentração de sacarose e amburosídio A nos extratos concentrado não fermentado e fermentado de cumaru.

	<b>Concentração de sacarose (mg / L)</b>	<b>Concentração de amb. A (mg / L)</b>
Não Fermentado	266,4	11.384,72
Fermentado	130,4	8.401,63

Fonte: Própria

## 5 CONCLUSÕES

O processo de extração em Maceração Dinâmica apresentou as maiores quantidades de amburosídio A em relação aos outros processos.

Os extratos obtidos com a mistura água + etanol (1:1) apresentaram maiores quantidades de amburosídio A, em relação aos outros solventes, tanto no processo de Maceração Dinâmica quanto em Extração Assistida por Ultrassom.

No processo de Extração Assistida por Ultrassom, o fator potência e a interação potência x tempo foram significativos somente com a mistura água + etanol (1:1), sendo a Potência mais significativa no processo de extração.

A melhor condição para extrair maiores quantidade de amburosídio A utilizando Extração Assistida por Ultrassom foi usando 100% de potência com tempo de 6 minutos.

Nos processos utilizados para remoção de açúcar do extrato, o processo de adsorção mostrou-se mais eficiente do que a fermentação. Uma vez que toda concentração de açúcar foi removido pela adsorção e apenas 49% da concentração de açúcar foi removido pela fermentação. Porém, ambos os processos ocasionaram uma redução na concentração de amburosídio A presente no extrato, a adsorção reduziu 54% da concentração e a fermentação 26,20%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. R. G. S.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; SANTOS, M. R. V.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, n. 11, p. 1-8, 2010.
- BANDEIRA, P. N.; FARIAS, S. S.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; COSTA, S. M. O. New isoflavone derivative and other flavonoids from the resin of *Amburana cearensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 2, p. 372-375, 2011.
- BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M. F.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, 65, p. 135-172, 2001.
- BRAVO, J. A. B.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A. T.; MUÑOZ, V. O.; CALLAPA, J.; MEN-OLIVIER, L. L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 71-74, 1999.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Embrapa: Brasília, 1994.
- CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1189-1195, 2011.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1241-1243, 2006.
- CANUTO, K. M. **Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (Química – Agronomia – Farmacologia) de *Amburana cearensis* A. C. Smith**. 2008. 313 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008a.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E.; LEAL, L. K. A. M.; VIANA, G. S. B. Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith: alternativa para preservação e exploração econômica da espécie. **Embrapa Semi-Árido**: Petrolina, p. 24, 2008b.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 662-666, 2010a.
- CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, dezembro, 2010b.
- CHARPE, T. W.; RATHOD, V. K. Extraction of glycyrrhizic acid from licorice root using ultrasound: Process intensification studies. **Chemical Engineering and Processing**, v. 54, p. 37-41, 2012.



CHEN, F.; SUN, Y.; ZHAO, G.; LIAO, X.; HU, X.; WU, J.; WANG, Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 767-778, 2007.

D'ALESSANDRO, L. G.; KRIAA, K.; NIKOV, I.; DIMITROV, K. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. **Separation and Purification Technology**, v. 93, p. 42-47, 2012.

DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N. P.; VARGAS, G. D.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 173-180, 2004.

FELLOWS, P. J. Food processing technology: Principles and Practice. Cambridge: Woodhead Publishing Ltda. Third Edition. 912 p., 2009.

FERNÁNDEZ-RONCO, M. P.; GRACIA, I.; DE LUCAS, A.; RODRÍGUEZ, J. F. Extraction of *Capsicum annuum* oleoresin by maceration and ultrasound assisted extraction: influence of parameters and process modeling. **Journal of Food Process Engineering**, n. 36, p. 343-352, 2013.

GIRONI, F.; PIEMONTE, V. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. **Chemical Engineering Research And Design**, n. 89, p. 857-862, 2011.

GONG, R.; DING, Y.; LI, M.; YANG, C.; LIU, H.; SUN, Y. Utilization of powdered peanut hull as biosorbent for removal of anionic dyes from aqueous solution. **Dyes and Pigments**, 64, p. 187-192, 2005.

HEWIMOL, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Ultrasound-assisted extraction of anthroquinones from roots of *Morinda citrifolia*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 6, p. 543-548, 2006.

HUSSAIN, A. I.; CHATHA, S. A. S.; NOOR, S.; KHAN, Z. A.; ARSHAD, M. U.; RATHORE, H. A.; SATTAR, M. Z. A. Effect of Extraction Techniques and Solvent Systems on the Extraction of Antioxidant Components from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Hulls. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 4, p. 890-896, 2012.

KAYA, K.; PEHLIVAN, E.; SCHMIDT, C.; BAHADIR, M. Use of modified wheat bran for the removal of chromium (VI) from aqueous solutions. **Food Chemistry**, v. 158, p. 112-117, 2014.

KIAI, H.; HAFIDI, A. Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation. **LWT – Food Science Technology**, 57, p. 663-670, 2014.

KO, M. J.; CHEIGH, C. I.; CHUNG, M. S. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). **Food Chemistry**, v. 14, p. 147-155, 2014.

KO, R.J. Causes, epidemiology and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 37, n. 6, p. 697-708, 1999.

LEAL, K. A. M.; MATOS, M. E.; MATOS, F. J. A.; RIBEIRO, R. A.; FERREIRA, F. V.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v. 4, n. 3, p. 221-227, 1997.

LEAL, K. A. M.; NOBRE JÚNIOR, H. V.; CUNHA, G. M. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; OLIVEIRA, R. A.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, 388, p. 86-90, 2005.

LEAL, K. A. M.; COSTA, M. F.; PITOMBEIRA, M.; BARROSO, V. M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences**, 79, p. 98-104, 2006a.

LEAL, K. A. M. **Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (Cumaru): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosidio**. 2006. f. 179. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006b.

LEAL, L. K.; CANUTO, K. M.; D A SILVA COSTA, K. C.; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; VASCONCELOS, S. M.; SILVEIRA, E. R.; FERREIRA, M. V.; FONTENELE, J. B.; ANDRADE, G. M.; DE BARROS VIANA, G. S. Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 104, p. 198-205, 2008.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; SILVA, G. S. B.; LIMA, D. E. S. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n.1, p. 53-57, jan./mar., 2004.

MAIA, Gerda Nickel. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D & Z. 2004. p. 413.

MARAN, J. P.; MANIKANDAN, S.; NIVETHA, C. V.; DINESH, R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, 29, p. 365-373, 2011.

MUÑIZ-MÁRQUEZ, D. B.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C.; WONG-PAZ, J. E.; BELMARES-CERDA, R.; RODÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1149-1154, 2013.

NEGRI, G.; OLIVEIRA, A. F. M.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Chemistry of the stem bark of *Amburana cearensis* (Allemão) (A. C. SM.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 1-4, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2ª ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, p. 119-128, 2003.

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

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

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed., cap. 15, p. 291-320, Florianópolis, 2000.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. Medicinal plants phytomedicines and phytotherapy. **Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine**. 4ª ed., cap. 1, p. 1-39, New York, 2001.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food chemistry**, 89, p. 191-198, 2005.

SOTO, M. L.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJ'S, J. C. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review. **Journal of Food Engineering**, 105m p. 1-27, 2011.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S.; Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

WANG, H.; HELLIWELL, K. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusion by high-performance liquid chromatography. **Food Research International**, 34, p. 223-227, 2001.

WANG, X.; WU, Y.; CHEN, G.; YUE, W.; LIANG, Q.; WU, Q. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 846-854, 2013.

WIJEKOON, M. M. J. O.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlintera elatior* Jack.) inflorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 615-619, 2011.

YANG, X.; AL-DURI, B. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes on activated carbon. **Journal of Colloid and Interface Science**, 287, p. 25-34, 2005.

YOSHIDA, T.; KONISHI, M.; HORINAKA, M.; YASUDA, T.; GODA, A. E.; TANIGUCHI, H.; YANO, K.; WAKADA, M.; SAKAI, T. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 375, p. 129-133, 2008.

**APÊNDICE**

Apêndice 01 – Média das concentrações de amburosídio A obtidas na variação da potência e do tempo em Extração Assistidas por Ultrassom.

<b>Potências</b>	<b>Ultrassom</b>	<b>Média da concentração (mg / 100 g)</b>
Potência 50%	Etanol	245,5
	Água + Etanol (1:1)	235,1
	Água	27,2
Potência 75%	Etanol	157,3
	Água + Etanol (1:1)	140,0
	Água	34,7
Potência 100%	Etanol	169,1
	Água + Etanol (1:1)	460,7
	Água	37,8

Fonte: Própria

Apêndice 02 - Delineamento experimental e resposta em diferentes condições de extração assistida por ultrassom, usando água como solvente.

<b>Ensaio</b>	<b>Potência (%)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Amburosídio A (mg / 100 g)</b>
1	50	2	36,1
2	50	2	36,6
3	50	2	30,1
4	100	2	42,2
5	100	2	68,6
6	100	2	48,8
7	50	6	21,2
8	50	6	19,1
9	50	6	14,8
10	100	6	29,9
11	100	6	17,5
12	100	6	27,3
13 (C)	75	4	26,9
14 (C)	75	4	41,8
15 (C)	75	4	48,4

Fonte: Própria

Apêndice 03 - Delineamento experimental e resposta em diferentes condições de extração assistida por ultrassom, usando etanol como solvente.

<b>Ensaio</b>	<b>Potência (%)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Amburosídio A (mg / 100 g)</b>
1	50	2	252,9
2	50	2	222,3
3	50	2	270,5
4	100	2	170,3
5	100	2	184,6
6	100	2	156,7
7	50	6	232,6
8	50	6	246,7
9	50	6	181,9
10	100	6	176,1
11	100	6	176,3
12	100	6	176,1
13 (C)	75	4	162,2
14 (C)	75	4	164,4
15 (C)	75	4	159,5

Fonte: Própria



APÊNDICE 04 - Análise de Variância para extração com água como solvente em ultrassom.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Valor F</b>
<b>Potência (L)</b>	703876,79	1	703876,79	1,19
<b>Tempo (L)</b>	808846,11	1	808846,11	
<b>Potência x Tempo</b>	723061,34	1	723061,34	
<b>Resíduo</b>	140837,36	1	140837,36	
<b>Erro Puro</b>	5907611,78	10	590761,17	
<b>Total</b>	8284233,40	14		

$R^2 = 0,26$ ; (L) Termos Lineares

APÊNDICE 05 - Análise de Variância para extração com etanol como solvente em ultrassom.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Valor F</b>
<b>Potência (L)</b>	11211,85	1	11211,85	15,89
<b>Tempo (L)</b>	380,81	1	380,81	
<b>Potência x Tempo</b>	856,83	1	856,83	
<b>Erro Puro</b>	8124,03	10	738,54	
<b>Total</b>	20573,53	14		

$R^2 = 0,60$ ; (L) Termos Lineares