



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

MARINA DA SILVA

**EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* UTILIZANDO CO₂
SUPERCRÍTICO + CO-SOLVENTE ETANOL**

LARANJEIRAS DO SUL

2023

MARINA DA SILVA

**EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* UTILIZANDO CO₂
SUPERCRÍTICO + CO-SOLVENTE ETANOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eduarda Molardi Bainy

LARANJEIRAS DO SUL

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Silva, Marina da
EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE MORINGA OLEIFERA UTILIZANDO CO2
SUPERCRÍTICO + CO-SOLVENTE ETANOL / Marina da Silva. --
2023.
41 f.:il.

Orientadora: Drª Eduarda Molardi Bainy

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Engenharia de Alimentos, Laranjeiras do
Sul, PR, 2023.

1. Moringa oleifera. 2. Fluido Supercritico. 3.
Compostos Bioativos. 4. Potencial Antioxidante. I.
Bainy, Eduarda Molardi, orient. II. Universidade Federal
da Fronteira Sul. III. Título.

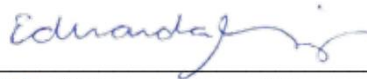
MARINA DA SILVA

**EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* UTILIZANDO CO₂
SUPERCRÍTICO + CO-SOLVENTE ETANOL**

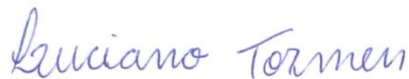
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 01/03/2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Eduarda Molardi Bainy – UFFS
Orientadora



Prof. Dr. Luciano Tormen
Avaliador



Msc. Leide Graciela Blanco Mattje
Avaliador

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela Bolsa de Iniciação Científica em 2019/2020 e apoio financeiro através do projeto Universal 2016 processo 404326/2016-1.

À orientadora, Prof^a Dr^a Eduarda Molardi Bainy, pela oportunidade de conhecer a pesquisa científica acadêmica, aos desafios em mim confiados, por todo suporte durante a graduação e amizade. Admiração profissional e pessoal inspiradora.

Ao Prof^o Dr^o Luciano Tormen, pelo apoio na graduação, ensinamentos, paciência, auxílio com as análises químicas e grandiosa companhia de laboratório para a realização desse estudo.

À Leide Blanco Mattje pela doação da matéria-prima *Moringa oleifera*, e a professora Dr^a Josimeire Leandrini pela identificação da espécie.

Ao prof^o Dr^o Marcos L. Corazza pela orientação nas extrações supercríticas e parceria com o acesso ao Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA) na Universidade Federal do Paraná (UFPR) que permitiu a excussão desse estudo.

A Aline Andreza pelo acompanhamento e suporte nas extrações supercríticas.

A Julia Trancoso pela participação na cinética e modelagem matemática realizadas para publicação desse estudo.

A prof^a Michele M. Bombardelli da Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO) pelo auxílio na elaboração do projeto e planejamento experimental.

A banca examinadora por aceitar o convite de participação e contribuições nesse trabalho.

Aos meus pais, Maria Lúcia Cimadon da Silva e Antônio Donizete da Silva, por todo incentivo e apoio, a caminhada foi mais leve por vocês.

Aos meus familiares, que mesmo distantes estiveram presentes nessa jornada.

Aos meus amigos por toda companhia, atenção, auxílio, aprendizados e momentos de descontração. A rede de apoio com vocês foi fundamental.

A Universidade Federal da Fronteira Sul e todos os professores, técnicos e colaboradores, que de alguma maneira auxiliaram a minha passagem pela graduação. Muito obrigada!

RESUMO

Extratos de folhas de *Moringa oleifera* foram obtidos por extração supercrítica com CO₂ usando etanol como co-solvente (scCO₂ + EtOH). As condições experimentais foram investigadas variando temperatura (35 – 80 °C), pressão (15 – 25 MPa) e razão de massa entre etanol e matéria-prima. Os ácidos fenólicos (ácido gálico, vanílico e p-cumárico) e flavonoides (catequina) foram identificados em todos os extratos, exceto no extrato obtido sem o co-solvente etanol. Os principais compostos identificados por CG-MS foram 1-triacontanol, nonacosano, heptacosano, fitol, γ -tocoferol e α -tocoferol. Os extratos obtidos a 35 °C apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos totais, e maior capacidade antioxidante medida pelos métodos DPPH e FRAP, porém, menor rendimento de extração. As condições de extração por scCO₂ + EtOH do ponto central (60 °C e 20 MPa) tiveram os melhores resultados combinados para rendimento (4,4%), teor de compostos fenólicos totais (24 ± 1 mg GAE g⁻¹), DPPH (77 ± 2 μ mol Trolox g⁻¹), FRAP (265 ± 9 μ mol Trolox g⁻¹) e a presença de compostos bioativos.

APLICAÇÃO PRÁTICA

A extração com fluido supercrítico com CO₂ é uma tecnologia limpa que emprega baixas temperaturas, produzindo extratos de alta qualidade. Os extratos das folhas de *Moringa oleifera* apresentaram diferentes composições de acordo com as condições experimentais avaliadas. O uso de etanol como co-solvente e altas temperaturas influenciaram positivamente o rendimento da extração. Todos os extratos apresentaram potencial antioxidante. A catequina, os ácidos gálico, vanílico e p-cumárico foram os principais compostos fenólicos identificados. O extrato obtido na condição de ponto central apresentou maior potencial antioxidante, rendimento e concentração de compostos bioativos.

Palavras-chave: moradia; *Moringa oleifera*; fluido supercrítico; compostos bioativos.

ABSTRACT

Moringa oleifera leaf extracts were obtained by supercritical extraction with CO₂ using ethanol as cosolvent (scCO₂ + EtOH). The experimental conditions were investigated varying temperature (35 – 80 °C), pressure (150 – 25 MPa), and mass ratio between ethanol and raw material. The phenolic acids (gallic, vanillic, and p-coumaric acids) and flavonoids (catechin) were identified in all extracts, except for the extract obtained without the co-solvent ethanol. The main compounds by GC–MS were 1-triacontanol, nonacosane, heptacosane, phytol, γ -tocopherol, and α -tocopherol. Extracts obtained at 35 °C showed higher concentrations of total phenolic compounds, and higher antioxidant capacity measured by the DPPH, and FRAP methods, however, the lowest extraction yield. The central point scCO₂ + EtOH extraction conditions (60 °C and 20 MPa) had the best-combined results for yield (4.4%), total phenolic compounds (24 \pm 1 mg GAE g⁻¹), DPPH (77 \pm 2 μ mol Trolox g⁻¹), FRAP (265 \pm 9 μ mol Trolox g⁻¹) and the presence of bioactive compounds.

PRACTICAL APPLICATIONS

Supercritical fluid extraction with CO₂ is a clean technology that employs low temperatures, producing high-quality extracts. *Moringa oleifera* leaf extracts showed different compositions according to the experimental conditions evaluated. The use of ethanol as a cosolvent and high temperatures positively influenced the extraction yield. All extracts showed antioxidant potential. Catechin, gallic, vanillic, and p-coumaric acids were the main phenolic compounds identified. The extract obtained at the central point condition showed higher antioxidant potential, yield, and concentration of bioactive compounds.

Keywords: *Moringa oleifera*; supercritical fluid; bioactive compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Folhas de <i>M. oleifera</i>	16
Figura 2 - Extrator Soxhlet.....	17
Figura 3 - Unidade de extração supercrítica.....	18
Figura 4 - Extratos de folhas de <i>M. oleifera</i> obtidos por scCO ₂ +EtOH.....	19

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Condições experimentais, rendimento de extração e solubilidade para extrações de folhas de *M. oleifera* via scCO₂ + EtOH e por extrator Soxhlet24
- Tabela 2 - Composição química por CG-MS em extratos de folha de *M. oleifera* obtidos via scCO₂ +EtOH em diferentes condições experimentais e por extrator Soxhlet.....28
- Tabela 3 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC presente em extratos de folha de *M. oleifera* obtidos via scCO₂ em diferentes condições experimentais e por extrator Soxhlet.....32
- Tabela 4 - Determinação de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade de sequestro do radical DPPH e capacidade de redução do íon férrico (FRAP) em extratos de folhas de *M. oleifera* obtidos por diferentes condições experimentais via scCO₂ +EtOH e por extrator Soxhlet.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CG-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
CO ₂	Dióxido de Carbono
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EtOH	Etanol
FRAP	Capacidade de Redução do Íon Férrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IRe	Índice de Retenção Experimental
IRt	Índice de Retenção Teórico
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
scCO ₂	Extração Supercrítica com Dióxido de Carbono
SMR	Razão mássica
TR	Tempo de Retenção
TROLOX	(±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
γ	Gama
α	Alfa
Φ	Eficiência de extração mássica
£	Vazão de CO ₂ a 10 °C e pressão de cada condição
$\text{\$}$	Razão entre a massa do extrato obtido pela massa de material seco utilizado $\times 100$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1	MATERIAIS	15
2.2	PREPARO DA AMOSTRA.....	15
2.3	EXTRAÇÃO POR EXTRATOR SOXHLET.....	16
2.4	EXTRAÇÃO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO.....	17
2.5	SOLUBILIDADE APARENTE.....	19
2.6	IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA	19
2.7	IDENTIFICAÇÃO DE FENÓIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	20
2.8	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	21
2.9	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH.....	21
2.10	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO ÍON FÉRRICO.....	22
2.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
3.1	EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS E SUPERCÍTICAS.....	23
3.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	25
3.2.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA OBTIDA POR CG-MS.....	25
3.2.2	DETERMINAÇÃO DE FENÓIS POR HPLC.....	30
3.3	POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	33
4	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	APÊNDICE.....	41

1 INTRODUÇÃO

Moringa oleifera é uma planta de clima tropical nativa da Índia e representante da família Moringaceae (MORTON, 1991; NOUMAN et al., 2016; ÖZCAN, 2020). Devido a sua composição nutricional (AMAGLO et al., 2010; SAINI; SIVANESAN; KEUM, 2016), *M. oleifera* é utilizada de forma medicinal (ANWAR et al., 2007), em formulações alimentares (OYEYINKA; OYEYINKA, 2018), purificação de água (KALOGO et al., 2000) e para obtenção de biodiesel (RASHID et al., 2008). Os extratos das partes aérea de *M. oleifera* obtidos por diferentes métodos, têm apresentado atividades biológicas como antioxidante (CASTRO-LÓPEZ et al., 2017; ROCCHETTI et al., 2020; RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2016), antimicrobiana (PRABAKARAN et al., 2018), antiinflamatórias (ADEDIPO; FALAYI; OYAGBEMI, 2015) e ação contra o estresse oxidativo (SOLIMAN et al., 2020). Assim, *M. oleifera* é considerada uma planta benéfica para a saúde e com potencial uso indústria alimentícia, sendo de interesse ampliar o conhecimento científico a respeito da sua composição e identificar as melhores condições de extrações utilizando fluídos pressurizados.

Trabalhos anteriores com folhas de *M. oleifera* relataram diferentes formas para obtenção de extratos, como métodos de extração por infusão hidrometanólica (NOUMAN et al., 2016), maceração, decocção, extração assistida por ultrassom (CASTRO-LÓPEZ et al., 2017) e a utilização extrator Soxhlet usando etanol como solvente (VONGSAK et al., 2013). Porém métodos convencionais com a utilização de solventes orgânicos apresentam desvantagens, sendo prejudiciais ao meio ambiente, grande volume de solvente e necessário longo tempo de extração (HERRERO; IBÁÑEZ, 2015; OUÉDRAOGO et al., 2018). Além disso, compostos sensíveis a temperatura presentes na matriz vegetal da planta podem ser degradados pelo processo de extração em altas temperaturas por um longo período, afetando diretamente a qualidade do extrato e rendimentos de extração (DE SOUZA et al., 2018; GARCIA-SALAS et al., 2010). Conseqüentemente, a extração supercrítica com dióxido de carbono (scCO₂) pode minimizar as desvantagens das tecnologias convencionais.

O dióxido de carbono (ponto crítico: 7,4 MPa e 32 °C) é utilizado como o fluído supercrítico mais comum para extrair compostos voláteis e óleos essenciais de matrizes vegetais sem geração de resíduos e permite extrações com baixas condições de temperatura/pressão (BRUNNER, 2005; OUÉDRAOGO et al., 2018; RODRÍGUEZ-

PÉREZ et al., 2016). O CO₂ é disponível com alta pureza e baixo custo, além de não ser inflamável (BRUNNER, 2005). No entanto, seu uso individual como solvente apresenta o comportamento limitado em dissolver compostos orgânicos apolares de baixa massa molecular e pouca volatilidade (BRUNNER, 2005). Entretanto, a adição de um solvente orgânico, o etanol como co-solvente (scCO₂ + EtOH), é capaz de alterar esse comportamento, podendo aumentar a interação entre soluto e solvente, e, melhorar significativamente a solubilidade dos compostos polares (WANG; WELLER, 2006). Essa adição combina as propriedades benéficas do CO₂ e do solvente orgânico, resultando em diminuição da tensão interfacial, redução da viscosidade, melhora da difusão do sistema e auxiliando na transferência de massa (HERRERO; IBÁÑEZ, 2015; RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2016). Além disso, aumenta as taxas de rendimento da extração, causando uma recuperação considerável de compostos bioativos (CRUZ et al., 2019; DE SOUZA et al., 2018; GUEDES et al., 2018; HERRERO; IBÁÑEZ, 2015; RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2016).

Estudo anterior com extratos de folhas de moringa por scCO₂ identificou menor número de compostos em relação ao extrato obtidos por extrator Soxhlet com n-hexano devido à seletividade do método (ZHAO; ZHANG, 2013). A extração de folhas de *M. oleifera* utilizando CO₂ expandido com etanol apresentou maior rendimento do que a técnica de extração com scCO₂, uma vez que o etanol é capaz de influenciar a polaridade do solvente (RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2016). Até a pesquisa atual, nenhum estudo avaliou a extração de compostos bioativos de extratos de folhas de moringa utilizando extração de scCO₂ + EtOH como co-solvente com condições de extração semelhantes. Este tipo de pesquisa é importante para demonstrar a viabilidade da técnica e obter dados fundamentais para estabelecer um processo viável de extração com scCO₂ de folhas de *M. oleifera*.

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar extratos de folhas de *M. oleifera* obtidos por extração supercrítica utilizando CO₂ e etanol como co-solvente em um processo de extração semi-batelada. Os extratos foram caracterizados quanto à composição química e potencial antioxidante. Adicionalmente, as condições experimentais de temperatura e pressão do processo de extração supercrítica foram investigadas para verificar os efeitos no rendimento e na composição química dos extratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Folhas de *Moringa oleifera* foram utilizadas como matéria-prima. As partes aéreas foram coletadas no primeiro semestre de 2018, na cidade de Assis Chateaubriand (Estado do Paraná Brasil) e configuraram um único lote.

Todos os reagentes químicos e solventes foram utilizados sem purificação adicional e possuíam grau analítico. Dióxido de carbono (> 99% de pureza em fase líquida, White Martins), Metanol (99,8% de pureza, Sigma-Aldrich), Etanol (99,8% de pureza, Neon), N-hexano (98% de pureza, LiChrosolv®), Acetona (99,5% de pureza, Anidrol), Ácido fórmico (98% de pureza, Sigma-Aldrich), Folin-Ciocalteu (2N, Êxodo Científica), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich), Ácido Gálico (99,9% de pureza, Vetec), FeCl₃.6H₂O (>98% de pureza, Sigma-Aldrich), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (>98% de pureza, Sigma-Aldrich) e (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (97% de pureza, Sigma-Aldrich).

2.2 PREPARO DA AMOSTRA

As folhas de *Moringa oleifera* (Figura 1) foram lavadas com água corrente, sanitizadas com solução de hipoclorito (100 ppm) e secas em estufa com circulação de ar forçado a 50 °C até massa constante. As folhas secas foram trituradas em processador de alimentos (RI7776/90, Philips, Brasil) por 30 min. O material foi acondicionado em embalagens de polietileno de baixa densidade, seladas à vácuo e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para manter suas propriedades até a realização dos experimentos de extração. O material foi separado por granulometria utilizando diferentes peneiras da série de Tyler acopladas em agitador mecânico (Produtest, Brasil). O diâmetro médio das partículas foi determinado segundo o método descrito por Gomide (GOMIDE, 1983). A fração mássica do material retido nas peneiras x 100 foi de: 8 mesh (0,15%), 10 mesh (1,16%), 12 mesh (1,65%), 24 mesh (44,66%), 28 mesh (10,37%), 35 mesh (22,29%) e fundo (21,03%). As frações mássicas de 8 a 35 mesh foram unidas, homogeneizadas,

embaladas em embalagem de polipropileno de baixa densidade e mantidas em freezer a -14 °C na ausência de luz até o uso. A densidade real de folhas de *M. oleifera* foi determinada através da técnica de picnometria com o uso de gás hélio no Instituto de Química / Unicamp, Campinas, Brasil. A densidade aparente e a porosidade do leito foram determinadas conforme descrito por Cruz et al. (CRUZ et al., 2019).

Figura 1 – Folhas de *Moringa oleifera*



Fonte: a autora (2019)

2.3 EXTRAÇÃO POR EXTRATOR SOXHLET

A extração em extrator Soxhlet (Figura 2) foi determinada como referência em relação a extração por fluido supercrítico. O solvente orgânico utilizado foi etanol 99%, e as extrações foram realizadas de acordo com o método oficial da AOAC (AOAC, 1999) com modificações, por 360 minutos. Após a extração o solvente foi removido utilizando evaporador rotativo sob pressão reduzida (Quimis, São Paulo, Brasil) a 60 °C até a massa constante. Os extratos foram armazenados em freezer a -14 °C na ausência de luz até sua análise.

Figura 2 – Extrator Soxhlet



Fonte: a autora (2019)

2.4 EXTRAÇÃO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO

As extrações foram realizadas em unidade de extração supercrítica em escala de bancada (Figura 3) (volume interno de $8,0 \times 10^{-5} \text{ m}^3$, comprimento de $0,16 \text{ m}$ e diâmetro de $2,52 \times 10^{-2} \text{ m}$), formado por um extrator vaso encamisado, um banho ultratermostatizado, uma válvula agulha para controle de fluxo do extrato obtido, uma bomba do tipo seringa e sensores e transdutores de pressão e temperatura. O solvente utilizado foi uma mistura de $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$. A influência do etanol no rendimento da extração foi verificada por diferentes razões mássicas iniciais (SMR), correspondendo ao etanol em gramas adicionado à matéria-prima, dividido pela massa inicial de CO_2 carregado no extrator na etapa estática.

Figura 3 – Unidade de extração supercrítica

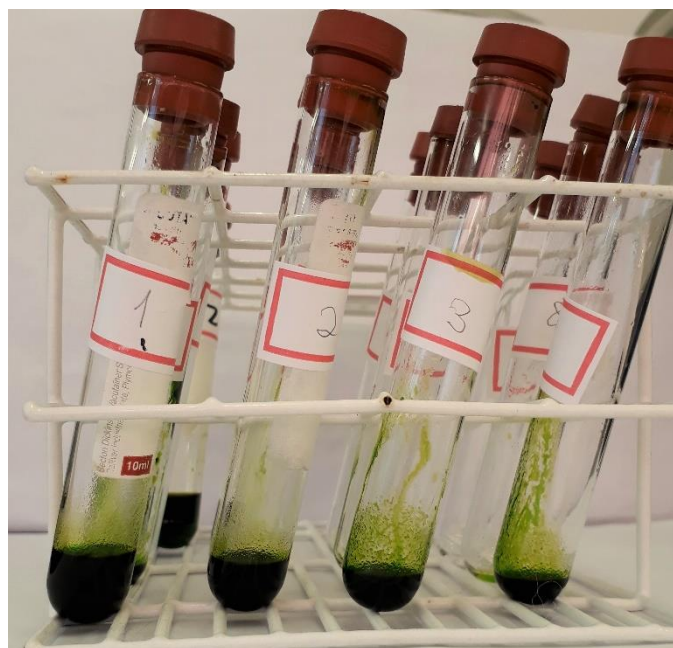


Fonte: a autora (2019)

Durante as extrações, temperatura e pressão foram controladas nos experimentos. Os dois principais fatores estudados foram temperatura e pressão com delineamento experimental 2^2 inteiramente casualizado com triplicata no ponto central. Os experimentos ocorreram nas condições de 35; 60 e 80 °C em 15, 20 e 25 MPa. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata para obter massa de amostra suficiente para análises futuras, exceto o ponto central realizado em triplicata.

As extrações decorreram da seguinte maneira: 8 g de matéria-prima em SMR 2:1 (etanol:amostra) foram direcionadas ao carregamento do vaso extrator. Em seguida, foi carregado com CO₂, ajustado às condições de temperatura/pressão e mantido em confinamento por 60 min. Após o período estático a extração foi iniciada. O fluxo de CO₂ comprimido foi ajustado para aproximadamente 2 mL min⁻¹, sendo controlado pela bomba seringa a 10 °C e pressão do extrator. O tempo total de cada extração foi de aproximadamente 25 min, sendo de 130 min para a amostra sem a presença de etanol como co-solvente. Os extratos (Figura 4) coletados foram direcionados para estufa com circulação de ar forçado a 60 °C até massa constante, a fim de remover o etanol residual presente. Além disso, também foi avaliado a relação de massa de 1:1 e 3:1 (etanol:amostra). A quantificação gravimétrica foi determinada para todas as amostragens. Todas as análises dos extratos foram realizadas em triplicata.

Figura 4 – Extratos obtidos por scCO₂ + EtOH



Fonte: a autora (2019)

2.5 SOLUBILIDADE APARENTE

A solubilidade aparente dos extratos refere-se a uma mistura de compostos solúveis presentes em scCO₂ + EtOH, e foi estimada através de modelos dinâmicos (DE SOUZA et al., 2018; FERREIRA et al., 1999; SANTOS et al., 2017). O soluto satura o solvente dentro do leito de extração fixo a uma taxa de fluxo de massa constante. Embora o etanol carregue a matéria-prima pelo leito fixo neste estudo, o modelo dinâmico foi utilizado, uma vez que o fluxo de CO₂ manteve-se constante durante as extrações. Assim, a solubilidade aparente foi estimada pelos coeficientes de correlação obtidos pela curva plotada entre massa de extrato (sem etanol) *versus* massa do solvente comprimido.

2.6 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-MS)

Os extratos foram dissolvidos em n-hexano (15 mg mL⁻¹) e filtrados antes de injetá-los no equipamento. O cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa

(GCMS-QP2010 Ultra) foi operado no modo *Splitless* com hélio como gás carreador. A coluna utilizada foi NST DB-5MS (30 m x 0,25 mm diâmetro, espessura fase estacionária 0,25 μm , 5% difenil/95% dimetil polisiloxano). A temperatura do injetor e interface foi de 250 °C, fonte de íons a 230 °C e volume de injeção de 2 μL . A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C mantida por 2 min, aumentada a uma taxa de 15 °C/min até 180 °C e posteriormente aumentada a uma taxa de 2 °C/min até 280 °C mantendo-se por 22 min. O espectrômetro de massa foi programado para fazer varreduras de 35 a 550 m/z. Os compostos foram identificados através da fragmentação e do índice de retenção com base no banco de dados da biblioteca NIST-08, NIST 08s, NIST 11 e NIST 11s. O índice de retenção foi calculado por meio do software do equipamento após a análise do padrão de n-alcenos C8 – C40 (40147-U Supelco). Os resultados são expressos em porcentagem de área relativa \pm desvio padrão.

2.7 IDENTIFICAÇÃO DE FENÓIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Os extratos foram dissolvidos em metanol (2 mg mL⁻¹) e filtrados em filtro seringa de PTFE com porosidade de 0,22 μm . A análise foi conduzida em cromatógrafo em fase líquida (UFLC Shimadzu) e coluna C18 – NST 18 100^a (25 cm x 4,5 mm diâmetro, poros 5 μm) acoplado a um detector por arranjo de diodos. Foram injetados volumes de 10 μL mantendo a coluna em 40 °C, fase móvel (99,9% água, 0,1% de ácido fórmico, fase móvel A; 99,9% metanol, 0,1% ácido fórmico, fase móvel B) numa vazão de 1,2 mL/min. Foi utilizado o programa de gradiente de eluição de seis etapas para a fase móvel B. A identificação e quantificação foram realizadas com soluções padrão dos seguintes compostos: ácido gálico, (-) catequina, epicatequina, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido transferrúlico, resveratrol, quercetina e mirecitina. Os resultados são expressos em micrograma de composto por grama de extrato ($\mu\text{g g}^{-1}$).

2.8 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

A quantificação de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método de *Folin-Ciocalteu* (MINUSSI et al., 2003). Aproximadamente 10 mg de extrato foram diluídos para 10 mL com etanol 99% em frascos opacos. Em seguida, foram para balão volumétrico 0,2 mL da solução do extrato, 2,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10% (v/v), 1,0 mL de carbonato de sódio 7,5% (m/v) e 6,8 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso na ausência de luz por 2 h. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro UV-visível (Evolution 201, Thermo Scientific) no comprimento de onda de 765 nm. O ácido gálico foi utilizado para curva padrão. Os resultados foram expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg g^{-1}).

2.9 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH

A capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) dos extratos foi realizada segundo metodologia de Rufino (RUFINO et al., 2007) com modificações. Três soluções com diferentes concentrações dos extratos foram preparadas a partir de uma solução concentrada de cada extratos em acetona 99,5%. A solução inicial de DPPH foi preparada na concentração de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$. Em tubo de polipropileno e alíquotas de 0,1 mL de cada solução de extrato foram adicionadas com 3,9 mL da solução do radical e monitoradas absorvância até total estabilização. A leitura de absorvância foi realizada em 515 nm por espectrofotômetro UV-visível. A curva padrão foi determinada utilizando reagente (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). Os resultados foram expressos em micro mol de Trolox por grama de extrato ($\mu\text{mol g}^{-1}$).

2.10 CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO ÍON FÉRRICO (FRAP)

A capacidade de redução do íon férrico (FRAP) foi realizada segundo descrição de Rufino (RUFINO et al., 2006) com modificações. Três soluções com diferentes concentrações dos extratos foram preparadas a partir de uma solução concentrada de cada extratos em acetona 99,5%. Em seguida, alíquotas de 0,1 mL de cada solução de extrato foram transferidas para tubo de polipropileno com 0,2 mL de água destilada, 2,7 mL de solução FRAP (25 mL de tampão acetato pH 3,6, 2,5 mL de solução de 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina 10 mmol L⁻¹ e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mmol L⁻¹) e incubadas a 35 °C por 30 min. A leitura da absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm por espectrofotômetro UV-visível. A curva padrão foi realizada utilizando Trolox. A capacidade de redução do íon férrico foi expressa em micro mol de Trolox equivalente por grama de extrato ($\mu\text{mol g}^{-1}$).

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para determinar a diferença com 95% de significância. O Teste de Tukey foi aplicado a fim de comparar médias ($p < 0,05$) quando houvesse diferença significativa. Todos os resultados foram analisados usando o software *Statistica 7.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS E SUPERCRÍTICAS

As folhas de *M. oleifera* utilizadas apresentaram diâmetro médio de partícula de $(5,21 \pm 1,18) \times 10^{-4}$ m, densidade real 1.300 kg m^{-3} , densidade aparente de leito de $118,75 \text{ kg m}^{-3}$ e porosidade do leito de partículas de 0,91. A Tabela 1 apresenta as condições experimentais utilizadas para obter os extratos da folha de *M. oleifera*, resultados de rendimento, eficiência da extração em relação a extração em extrator Soxhlet e solubilidade aparente.

Como mostra a Tabela 1, a extração realizada apenas com CO_2 como solvente sem adição de etanol (Exp. 3), resultou o baixo rendimento de 1,60% em massa. Quando comparado com a extração na mesma condição de temperatura e pressão ($35 \text{ }^\circ\text{C}$ e 25 MPa) e com a presença de etanol (Exp. 6), observou-se que o rendimento não apresentou melhora (1,45%) e nem diferença significativa ($p < 0,05$). Consequentemente, a combinação de baixa temperatura e alta pressão não foi suficiente para que a extração fosse mais eficiente. No entanto, o rendimento da extração aumentou significativamente (4,87% em massa) quando a temperatura foi aumentada para $80 \text{ }^\circ\text{C}$ na mesma pressão e com etanol como co-solvente (Exp. 8). O aumento da temperatura provavelmente melhorou a solubilidade dos compostos que levaram a um maior rendimento.

O etanol altera a polaridade do solvente misto utilizado, uma vez que o solvente muda de apolar (apenas CO_2) para uma mistura com características polares ($\text{CO}_2 + \text{EtOH}$), contribuindo para um aumento na extração de moléculas polares presentes na amostra (JESSOP; SUBRAMANIAM, 2007). O etanol utilizado para extração no equipamento Soxhlet também influenciou o rendimento da extração (25,2% em massa). Os experimentos de 4 a 8 (Tabela 1) apresentam as condições de extração do delineamento experimental 2^2 com triplicata do ponto central, no qual o objetivo foi avaliar o efeito da temperatura e da pressão durante as extrações com $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$ na razão mássica de etanol/matéria-prima de 2:1 (m/m).

Tabela 1 - Condições experimentais, rendimento de extração e solubilidade para extrações de folhas de *M. oleifera* via scCO₂ + EtOH e Soxhlet

Exp.	T (°C)	P (MPa)	SMR (g EtOH g CO ₂ ⁻¹)	Proporção de co-solvente (g EtOH g matéria- prima ⁻¹)	Tempo de extração (min)	Densidade de CO ₂ (Kg m ⁻³)**	Vazão CO ₂ (cm ³ min ⁻¹)£	Rendimento (%)§	Φ	Solubilidade aparente (g extrato g solvente ⁻¹)
1	60	20,0	1,60	3:1	25	374,1	2,0	6,1	4,6	0,0301
2	60	20,0	1,54	1:1	15	374,1	2,0	2,9	2,3	0,0219
3 [#]	35	25,0	0,00	0:1	130	467,7	2,0	1,6 ^c ± 0,4	3,8	0,0012 ± 0,0002 ^d
4 [*]	60	20,0	0,84	2:1	20	374,1	2,0	4,4 ^b ± 0,3	9,8	0,0269 ± 0,0031 ^b
5	35	15,0	1,00	2:1	25	280,6	2,0	2,9 ^{b,c} ± 0,7	6,5	0,0183 ± 0,0028 ^c
6	35	25,0	0,56	2:1	25	467,7	2,0	1,5 ^c ± 0,1	3,3	0,0053 ± 0,0004 ^d
7	80	15,0	1,41	2:1	20	280,6	2,0	4,9 ^b ± 0,1	11,3	0,0385 ± 0,0028 ^a
8	80	25,0	0,80	2:1	25	467,7	2,0	4,9 ^b ± 0,9	11,4	0,0185 ± 0,0031 ^c
Soxhlet	-	-	-	-	360	-	-	25,2 ^a ± 2,2	100,0	-

Condições experimentais realizadas em triplicatas apresentam valores médios ± desvio padrão. ^{a-g} Letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p <0,05).

SMR: Razão mássica inicial entre etanol e CO₂ na etapa estática.

#: Extração sem etanol.

*: Ponto central do delineamento experimental (2²).

** : Densidade de CO₂ estimada na temperatura e pressão de cada condição de extração no vaso extrator.

£: Vazão de CO₂ à 10 °C e pressão de cada condição de extração.

§: Razão entre a massa do extrato obtido pela massa de material seco utilizado × 100.

Φ: Eficiência de extração em função da massa de extrato (g) obtido via scCO₂ + EtOH por massa de extrato (g) obtido em extrator Soxhlet x 100.

A temperatura e a pressão influenciaram nas extrações. Os experimentos de 4 a 8 apresentados na Tabela 1 foram realizados em temperaturas e pressões distintas (60 °C/20 MPa e 80 °C/25 MPa, respectivamente), e resultaram em rendimentos de extração próximos (4,0% em massa). Esses resultados permitem possíveis otimizações nas condições experimentais, como diminuição da temperatura a fim de evitar a degradação térmica dos extratos e redução de gás gerando economia de energia, mantendo o rendimento estatisticamente similar na extração.

A condição experimental 7 (Tabela 1) do extrato obtido na menor pressão e maior temperatura (15 MPa e 80 °C), apresentou maior rendimento (4,89%) e eficiência de extração em massa (11,27%). Adicionalmente, nessas condições obteve-se a maior solubilidade aparente ($0,0385 \pm 0,0028$ g extrato g solvente⁻¹). Por outro lado, os menores valores de solubilidade aparente ($0,0183 \pm 0,0028$ e $0,0053 \pm 0,0004$ g extrato g solvente⁻¹), foram obtidos a 35 °C e pressões de 15 e 25 MPa, confirmando a influência da temperatura nas extrações.

3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

3.2.1 Composição química obtida por CG-MS

A partir da cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa, foi realizada a identificação dos compostos químicos presentes nos extratos de folhas de *M. oleifera*, obtidos via scCO₂ + EtOH e extrator Soxhlet conforme apresenta Tabela 2. Foram identificados 29 compostos sendo, hidrocarbonetos, terpenos, ésteres, aldeídos e tocoferóis. Entre os compostos majoritários estão 1-triacontanol (7,3-34,3%), nonacosano (14,9-21,4%) e heptacosano (6,6-11,5%). O triacontanol é um policosanol, um álcool alifático de cadeia longa (CHOI et al., 2016), com ações benéficas a saúde contra doenças cardiovasculares (SHEN; LUO; LIN, 2019; VARADY; WANG; JONES, 2003). A maior quantidade deste composto (34%) foi obtida no Exp. 4 e 5 com maior temperatura de extração e para extração com extrator Soxhlet (33%), e, a menor quantidade (7,3%) no Exp. 1 utilizando a menor temperatura entre os experimentos. Nonacosano e heptacosano

possuem características cerosas (TRIVEDI et al., 2019) e foram encontrados principalmente nos extratos obtidos nos estudos Exp. 5 e Exp. 1, respectivamente.

Outro composto identificado em maior quantidade foi o fitol (5,9 - 22,8%), um diterpeno resultante da degradação da clorofila que possui atividades antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante (ISLAM et al., 2018). Extratos obtidos nos Exp.1 e Exp.3 apresentaram os maiores valores de fitol (~21,5%). Além disso, também foram identificados α e γ -tocoferóis. O γ -tocoferol variou de 0,6 a 3,2%. O maior valor (3,2%) foi encontrado no extrato obtido no Exp. 1 (com co-solvente etanol). Para os demais extratos por scCO₂, o γ -tocoferol variou de 0,6 a 0,7%. O extrato obtido com extrator Soxhlet não apresentou γ -tocoferol. Para α -tocoferol uma alta quantidade de 4,9 a 13,7% foi determinada nos extratos obtidos no Exp. 4 e Exp. 1, respectivamente. Mais uma vez, o maior valor (13,7 %) foi identificado no extrato obtido no Exp. 1 sem a presença de co-solvente. Além disso, os extratos dos Exp. 2 e 3 com baixa temperatura de extração (35 °C) apresentaram valores elevados de α -tocoferol, respectivamente 10,8 e 12,6 %. A vitamina E, ou tocoferóis, possuem atividade antioxidante conhecida. O α -tocoferol possui maior atividade antioxidante entre os quatro isômeros do tocoferol (BARZOTTO et al., 2019). Conseqüentemente, os resultados mostram que os extratos de moringa possuem compostos químicos responsáveis pela atividade biológica, como capacidade antioxidante. Adicionalmente, o co-solvente interferiu negativamente na extração desses compostos devido à natureza apolar deles.

Conforme discutido, a composição química dos extratos de folhas de *M. oleifera* variou de acordo com as condições de extração utilizadas. Diferentes temperaturas, pressões e uso de solvente orgânico durante os ensaios experimentais influenciaram a composição química avaliada por CG-MS. Os extratos obtidos por scCO₂ apresentaram o maior número de compostos, variando de 18 a 22. Os Exp. 4 e 6 apresentaram 22 compostos químicos. O ponto central (Exp. 6) apresentou valores intermediários de α -tocoferol (8,0%) e fitol (11,3%), entre as condições testadas. Adicionalmente, o extrato obtido através do experimento do ponto central foi o único em que foi identificado o ácido linoleico (0,3%).

O extrato obtido por extrator Soxhlet com o uso de etanol 99% foi responsável pelo menor em número de identificação dos compostos (15). O aquecimento excessivo por um longo período (360 min) provavelmente causou a degradação de alguns compostos. Além disso, o etanol 99% é um solvente orgânico com característica polar e conseqüentemente responsável por extrair majoritariamente compostos polares, que

possuem baixa volatilidade e menor possibilidade de identificação através da cromatografia gasosa. Este extrato resultou na composição diferenciada com picos de menor tempo de retenção (RT) representados por compostos com menor massa molecular. Os principais compostos identificados foram 1-triacontanol (33,0%), nonacosano (14,9%) e heptacosano (6,6%). Nonacosano e heptacosano que possuem propriedades cerosas, conforme citado anteriormente. Além disso, o efeito do co-solvente também foi observado para extratos obtidos via $scCO_2 + EtOH$ e $scCO_2$ sem co-solvente em baixa temperatura (35 °C). Essas condições resultaram em maiores valores de área relativa (%) para os compostos principais identificados, como fitol, heptacosano e α e γ - tocoferol.

Tabela 2 - Composição química por CG-MS em extratos de folha de *M. oleifera* obtidos via scCO₂ +EtOH em diferentes condições experimentais e Soxhlet.

Pico	Composto	TR	IRe ± DP	IRt	Área relativa (%)							
					1 [#]	2	3	4	5	6 ^{**}	7	
					35 °C 25MPa	35 °C 15MPa	35 °C 25MPa	80 °C 15MPa	80 °C 25MPa	60 °C 20MPa	Soxhlet	
1	n-Nonaldeído	6,98	1102,3 ± 0,6	1104	0,5 ± 0,3	-	-	-	-	-	-	-
2	1-Penteno, 2,3,3-trimetil-5-fenil-	9,24	1320,0 ± 0,0	1372	-	-	-	-	-	-	-	1,0 ± 0,7
3	n-Fenetil-2-metilbutilidenimina	10,21	1424,3 ± 0,6	1543	-	-	-	-	-	-	-	1,2 ± 0,8
4	4-(2-Metil-3-oxociclohexil)butanal	11,27	1530,3 ± 0,6	1500	-	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	-	0,2 ± 0,1	2,0 ± 0,6	-
5	Ácido benzóico, éster 2-etilhexil	13,69	1715,0 ± 0,0	1692	0,3 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-
6	2-Pentadecin-1-ol	14,75	1774,3 ± 1,5	1772	0,8 ± 0,3	1,6 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,0 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,8 ± 0,2	-	-
7	1-Octadecine	16,03	1840,3 ± 0,6	1808	-	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	3,1 ± 0,9	-
8	7-Octadecino, 2-metil-	16,96	1883,7 ± 0,6	1863	-	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	-	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,5	-
9	Farnesil acetona	17,75	1917,3 ± 0,6	1902	-	-	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	-	-	-	-
10	Ácido palmítico	18,81	1959,3 ± 1,5	1968	0,5 ± 0,3	-	-	-	-	-	-	-
11	Ácido palmítico, éster etílico	19,65	1992,7 ± 0,6	1978	-	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,8	-
12	-Eicoseno, (E)-	22,22	2082,0 ± 0,0	2017	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,3 ± 0,1	-	0,3 ± 0,1	-	-
13	Fitol	23,20	2114,7 ± 1,5	2045	20,2 ± 5,7	11,9 ± 1,2	22,8 ± 2,4	9,2 ± 3,0	7,0 ± 0,7	11,3 ± 0,5	5,9 ± 1,5	-
14	Ácido linoleico	24,60	2158,7 ± 0,6	2183	-	-	-	-	-	0,3 ± 0,1	-	-
15	Ácido linolênico	24,80	2165,0 ± 0,0	2191	-	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,5 ± 1,2	-
16	n-Pentacosano	36,38	2503,3 ± 0,6	2506	4,8 ± 0,3	3,7 ± 0,4	4,3 ± 0,3	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,1	2,2 ± 0,4	-
17	Hexacosano	39,89	2602,7 ± 0,6	2606	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	-	-
18	Ácido Docosahexanóico cis-4,7,10,13,16,19-	41,64	2653,0 ± 0,0	2612	0,7 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-

19	Heptacosano	43,40	2704,0 ± 1,7	2705	11,5 ± 1,3	10,0 ± 1,3	9,8 ± 0,5	9,0 ± 0,8	9,6 ± 1,3	8,9 ± 0,7	6,6 ± 0,9
20	Octacosano	46,76	2802,0 ± 0,0	2804	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	-
21	(4E,8E,12E,16E) - 4,8,13,17,21-Pentametil- 4,8,12,16,20- docosapentaenal	47,49	2833,7 ± 0,6	2819	0,5 ± 0,1	-	-	-	-	-	-
22	1-Hexacosanol	49,89	2896,0 ± 0,0	2849	-	0,6 ± 0,1	-	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	-
23	Nonacosano	50,17	2905,3 ± 3,2	2904	19,1 ± 2,1	18,2 ± 2,4	15,1 ± 0,4	18,0 ± 0,7	21,4 ± 2,7	18,9 ± 1,2	14,9 ± 2,7
24	γ.-Tocoferol	54,48	3036,3 ± 0,6	3036	3,2 ± 0,2	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	-
25	(.+/-)-.alfa.-Tocoferol	57,30	3122,3 ± 3,5	3149	13,7 ± 0,5	10,8 ± 2,0	12,6 ± 0,5	4,9 ± 0,6	6,3 ± 0,9	8,0 ± 0,3	5,3 ± 1,0
26	1,30-Triacontanediol	60,79	3239,0 ± 0,0	3489	5,4 ± 0,4	-	-	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	-
27	Acetato de 22,23- dibromostigmasterol	62,22	3284,0 ± 1,7	3335	2,9 ± 0,3	-	2,6 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,3 ± 0,2	1,9 ± 0,3	2,0 ± 0,8
28	1-Triacontanol	63,16	3308,3 ± 5,8	3246	7,3 ± 0,9	25,3 ± 7,2	15,6 ± 2,7	34,2 ± 5,0	34,3 ± 4,1	29,7 ± 1,6	33,0 ± 5,1
29	Triciclo [20.8.0.0(7,16)] triacetano, 1(22),7(16) - diepoxi-	64,68	3349,0 ± 1,0	3350	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,4	0,7 ± 0,5	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	-

Área relativa expressa como média ± desvio padrão.

TR: Tempo de retenção (min).

IRe: Índice de retenção experimental.

IRt: Índice de retenção teórico.

#: Sem etanol.

**: Ponto central do delineamento experimental.

-: não detectado.

3.2.2 Determinação de fenóis por HPLC

Os compostos fenólicos presentes nos extratos de folhas de *M. oleifera* obtidos via scCO₂ + EtOH em diferentes condições experimentais, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a utilização de seus respectivos padrões. Como mostra a Tabela 3, os compostos fenólicos identificados nos extratos foram os ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico e ácido p-cumárico; e os flavonoides: (-) catequina, epicatequina e quercetina. O ácido transferrúlico e o flavonoide mirecetina não foram identificados nos extratos. Além desses compostos, o extrato obtido com extrator Soxhlet também apresentou resveratrol, um polifenol não flavonoide do tipo estilbeno. Para o extrato via scCO₂ sem a presença de etanol como co-solvente, não houve a identificação de nenhum dos compostos estudados. Esse resultado está associado à polaridade do solvente, uma vez que CO₂ puro possui baixa polaridade. A mudança desse comportamento é possível com a adição de um co-solvente (EtOH) capaz de aumentar a polaridade da mistura (AZMIR et al., 2013) e extrair substâncias mais polares, como os fenóis. A combinação dos parâmetros de extração e escolha do solvente resulta na extração de diferentes classes de compostos.

O extrato que apresentou a maior variedade de compostos identificados, foi via scCO₂ + EtOH a 80 °C e 25 MPa. O aumento da temperatura e pressão permitiu extrair mais fenóis. Adicionalmente, a utilização de co-solvente melhorou a extração de fenóis devido ao aumento da polaridade do solvente. O extrato obtido no Exp. 6 (60 °C e 20 MPa) apresentou as maiores concentrações dos compostos ácido gálico ($20 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$), catequina ($235 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$) e ácido p-cumárico ($79 \pm 0 \mu\text{g g}^{-1}$), entre as extrações com scCO₂. Consequentemente, a pressão e temperatura intermediárias (ponto central) resultaram em extratos com maiores concentrações de fenóis.

O flavonoide catequina foi o principal composto fenólico identificado em todos os extratos de folhas de *M. oleifera* analisados. Esta classe pertence ao grupo dos polifenóis, que são importantes metabólitos secundários de plantas. As catequinas possuem potencial antioxidante devido à sua capacidade de redução. Além disso, atuam como doadores de hidrogênio e receptores de oxigênio singlete, capazes de proteger contra a formação de oxidantes *in vitro* e *in vivo* (GRZESIK et al., 2018). Os flavonóides

também estão associados a propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana (NAGULA; WAIRKAR, 2019).

As folhas de *M. oleifera* são conhecidas pela rica composição de compostos fenólicos (ANWAR et al., 2007; ÖZCAN, 2020; SAINI; SIVANESAN; KEUM, 2016). Estudo anterior sobre o perfil químico de diversas partes de *M. oleifera* (AMAGLO et al., 2010), concluiu que as folhas de moringa possuem alto teor de polifenóis e flavonoides, como mostrado no atual estudo. Outro trabalho a respeito da composição química de sete cultivares de folhas de *M. oleifera* (NOUMAN et al., 2016), mostrou que flavonoides eram os principais compostos fenólicos dos extratos de moringa e estavam associados ao seu elevado comportamento antioxidante e atividade biológica.

Tabela 3 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC presente em extratos de folha de *M. oleifera* obtidos via scCO₂ em diferentes condições experimentais e Soxhlet.

Composto	LOD	LOQ	Concentração (µg composto g ⁻¹)						
			1 [#]	2	3	4	5	6 ^{**}	7
			35 °C 25MPa	35 °C 15MPa	35 °C 25MPa	80 °C 15MPa	80 °C 25MPa	60 °C 20MPa	Soxhlet
Ácido Gálico	7	23	Nd	12 ^d ± 1	Nd	18 ^c ± 1	14 ^d ± 1	20 ^b ± 1	23 ^a ± 1
Catequina	18	59	Nd	218 ^c ± 4	126 ^e ± 6	173 ^d ± 3	177 ^d ± 1	235 ^b ± 5	3.262 ^a ± 9
Epicatequina	23	75	Nd	Nd	Nd	Nd	37 ^a ± 2	Nd	Nd
Ácido Cafeico	9	30	Nd	Nd	24 ^b ± 1	Nd	49 ^a ± 1	Nd	Nd
Ácido Vanílico	7	23	Nd	22 ^c ± 3	13 ^d ± 1	63 ^b ± 1	60 ^b ± 1	Nd	140 ^a ± 1
Ácido p-cumárico	6	20	Nd	27 ^d ± 1	18 ^c ± 1	47 ^c ± 1	45 ^c ± 2	79 ^a ± 1	53 ^b ± 2
Ácido Transferrúlico	3	9	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Resveratrol	5	16	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	78 ^a ± 1
Quercetina	5	18	Nd	Nd	Nd	13 ^a ± 1	Nd	Nd	Nd
Mirecetina	2	6	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

Resultados expressos em valores médios ± desvio padrão. ^{a-c} Letras diferentes na mesma linha significam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Nd: não detectado.

#: Sem etanol.

** : Ponto Central do delineamento experimental.

LOD: Limite de Detecção

LOQ: Limite de Quantificação

3.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O potencial antioxidante dos extratos de folhas de *M. oleifera* foi investigado através da quantificação de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade de sequestro do radical DPPH e de redução do íon férrico (FRAP) e estão apresentados na Tabela 4. Extrato de folhas de moringa obtido via scCO₂ (35 °C e 25 MPa) sem etanol como co-solvente resultou na maior concentração de CFT (39 ± 5 mg GAE g⁻¹) entre todos os extratos. Outros extratos apresentaram resultados de CFT semelhantes, entre 18 a 27 mg GAE g⁻¹.

Este resultado difere dos compostos fenólicos quantificados por HPLC (Tabela 3). A análise por HPLC usou padrões de baixo peso molecular com polaridades intermediárias e altas. Já a extração via scCO₂ utiliza dióxido de carbono, um solvente apolar. Este tipo de solvente extrai preferencialmente compostos de baixa polaridade. Adicionalmente, extratos obtidos via scCO₂ + EtOH e com extrator Soxhlet com etanol permitem extrair compostos com maior polaridade. Conseqüentemente, cada método (HPLC e CFT) recuperou diferentes classes de fenóis. Por esse motivo, essas diferenças foram observadas neste estudo.

Tabela 4 - Determinação de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade de sequestro do radical DPPH e redução do íon férrico (FRAP) em extratos de folhas de *M. oleifera* obtidos por diferentes condições experimentais via scCO₂ + EtOH e Soxhlet

Exp	T (°C)	P (MPa)	Proporção de co-solvente [#]	CFT (mg ÁG g ⁻¹)	DPPH (µmol Trolox g ⁻¹)	FRAP (µmol Trolox g ⁻¹)
1*	35	25,0	0:1	39 ^a ± 5	101 ^{ab} ± 3	306 ^a ± 53
2	35	15,0	2:1	25 ^b ± 1	100 ^{ab} ± 2	322 ^a ± 21
3	35	25,0	2:1	23 ^{bc} ± 1	93 ^{bc} ± 2	311 ^a ± 33
4	80	15,0	2:1	23 ^{bc} ± 2	38 ^d ± 9	171 ^b ± 18
5	80	25,0	2:1	18 ^c ± 1	47 ^d ± 5	180 ^b ± 14
6**	60	20,0	2:1	24 ^{bc} ± 1	77 ^c ± 2	265 ^a ± 9
Soxhlet	-	-	-	27 ^b ± 3	120 ^a ± 17	271 ^a ± 6

^{a-d} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

*: Sem adição de etanol.

** : Ponto Central do delineamento experimental.

: Razão mássica de etanol e matéria prima (g EtOH g matéria-prima⁻¹).

A maior concentração de CFT (40,17 mg GAE g⁻¹) foi determinada para o extrato de sementes de moringa obtido por extrator Soxhlet com n-hexano (OGBUNUGAFOR et al., 2011). Além disso, a concentração de CFT foi maior (36,02 mg GAE g⁻¹) para extratos de folhas de moringa obtidos por extrator Soxhlet usando água (SREELATHA; PADMA, 2009) do que com etanol 99% usado neste estudo. A concentração de CFT depende da composição química, localização da matéria-prima, condições de cultivo e parâmetros de extração usados. A polaridade do solvente influencia a extração de compostos, como antocianinas, polifenóis, terpenos e flavonoides. Além disso, altas temperaturas podem degradar compostos termolábeis (AZMIR et al., 2013).

Os extratos obtidos nas condições de temperatura e pressão mais baixas (Exp. 2) e sem o cosolvente (Exp. 1) apresentaram os maiores valores de capacidade de sequestro do radical DPPH (100 µmol Trolox g⁻¹). No entanto, eles não diferiram do extrato obtido por extrator Soxhlet. Além disso, o extrato obtido na temperatura mais baixa e na pressão mais alta (Exp. 3: 35 °C, 25 MPa) também apresentou maior capacidade de sequestro do radical DPPH (93 ± 2 µmol Trolox g⁻¹). Da mesma forma, é justificável o efeito da temperatura nestes resultados. Os compostos responsáveis pelas características antioxidantes são sensíveis e facilmente degradados em temperaturas elevadas. Assim, a menor temperatura de extração proporciona a preservação destes compostos e por isso a maior capacidade de sequestro do radical DPPH.

Contudo, os melhores resultados de capacidade de sequestro do radical DPPH foram nos extratos obtidos por procedimentos que apresentaram menores rendimentos nas extrações supercríticas (1,45 a 2,85%), limitando o uso dessas condições de extração. Relacionando o potencial antioxidante pelo sequestro do radical DPPH e rendimento das extrações, o extrato obtido via scCO₂ + EtOH a 60 °C e 20 MPa, resultou melhor valor de DPPH (77 ± 2 µmol Trolox g⁻¹) e rendimento de extração (4,40%, Tabela 1). Além disso, esta condição utilizou menor tempo de extração comparado aos 130 min de extração no experimento sem co-solvente.

Comparando os resultados de capacidade de sequestro do radical DPPH entre todos os extratos, o método convencional por Soxhlet utilizando solvente polar resultou em valor superior. Este comportamento é esperado devido a extração via scCO₂ possuir baixa polaridade do CO₂, limitando a extrair grande quantidade dessas classes de compostos, os quais em geral apresentam capacidade antioxidante baixa. Os fenóis possuem capacidade antioxidante reconhecida e são formados por anéis aromáticos com grupos hidroxila, moléculas alifáticas insaturadas com ligações em ressonância e

pigmentos em geral. Esses compostos possuem polaridade de intermediária a alta, e sua recuperação pode variar de acordo com o método de extração.

Como apresentado na Tabela 4, os maiores valores de FRAP foram obtidos nas condições com menor temperatura (Exp. 1-3, 6). Os extratos obtidos na maior temperatura (Exp. 4 e 5) apresentaram os menores valores de FRAP, justificando que o aquecimento a 80 °C durante a extração pode ter causado a degradação de compostos que seriam capazes de reduzir o íon férrico. Além disso, os resultados de capacidade de sequestro do radical DPPH mostraram comportamento semelhante aos de redução do íon férrico. Extrato gerado pela extração no ponto central a 60 °C e 20 MPa foi a melhor condição operacional entre os experimentos supercríticos. Essa condição se torna uma opção viável, pois apresenta maiores valores de FRAP ($265 \pm 9 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) e de capacidade de sequestro do radical DPPH, além de maior rendimento de extração (4,4% em massa).

Os valores de FRAP para os extratos de folhas de *M. oleifera* neste estudo foram maiores do que outras matrizes vegetais, como extrato de partes aéreas de *Arctium lappa* (DE SOUZA et al., 2019) ($86,29 \pm 3,01 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) e extratos de folhas de orégano (GARCÍA-PÉREZ et al., 2019) (2,9 a $6,9 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$). Um estudo anterior com extratos de folhas de moringa mostrou que extrações com solventes de média a alta polaridade obtiveram maior potencial antioxidante pelo método FRAP (LUIZA et al., 2019).

A presença de compostos fenólicos com alta polaridade na composição dos extratos resulta em potencial antioxidante mais significativo, uma vez que esses compostos influenciam mecanismos para a atividade antioxidante, como a eliminação de radicais livres e a capacidade de complexação em íons metálicos (LIN; ZHANG; CHEN, 2018).

Os resultados obtidos de teor de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade de sequestro do radical DPPH e de redução íon férrico (FRAP), confirmaram o potencial antioxidante dos extratos de folhas de *M. oleifera*. Além disso, como mostra a Tabela 4, os extratos responsáveis pela maior quantificação de fenólicos, também apresentaram os melhores resultados nos demais ensaios avaliados (DPPH e FRAP).

4 CONCLUSÕES

Extração realizada via $scCO_2$ + EtOH apresentou os melhores rendimentos com a presença de etanol como co-solvente e temperaturas maiores. Os maiores rendimentos de extração via $scCO_2$ + EtOH foram obtidos a 60 e 80 °C em todas as pressões investigadas (15, 20 e 25 MPa), sendo que a temperatura foi a condição experimental que mais afetou o rendimento de extração supercrítica de folhas de *M. oleifera*.

Os extratos de folhas de *M. oleifera* obtidos por extração supercrítica com o uso de CO_2 e co-solvente etanol apresentaram capacidade antioxidante pelos métodos testados e compostos bioativos em sua composição. Esses extratos apresentaram maiores concentrações de flavonoides e fenólicos, sendo os principais, catequina, ácido-gálico, ácido-vanílico e ácido-p-cumárico. A composição química dos extratos por CG-MS identificou em maior quantidade os compostos 1-triacontanol, nonacosano, heptacosano, fitol, γ -tocoferol e α -tocoferol. Extrações supercríticas apresentaram maiores níveis de rendimentos com etanol como co-solvente e em altas temperaturas.

A condição experimental intermediária de 60 °C e 20 MPa foi a melhor condição operacional, apresentando resultados promissores para rendimento, CFT, capacidade de sequestro do radical DPPH, FRAP e compostos bioativos. Esta condição de extração preservou melhor os compostos termolábeis, produziu extratos com potencial antioxidante e rendimento satisfatório. Além disso, economizou dióxido de carbono e energia durante a extração, devido ocorrer em menor tempo e empregar pressão intermediária.

REFERÊNCIAS

- ADEDAPO, A. A.; FALAYI, O. O.; OYAGBEMI, A. A. Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, phytochemical and toxicological properties of the methanolic leaf extract of commercially processed *Moringa oleifera* in some laboratory animals. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, n. 5, p. 491–499, 2015.
- AMAGLO, N. K. et al. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1047–1054, 2010.
- ANWAR, F. et al. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 1, p. 17–25, jan. 2007.
- AOAC. **Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists International Chemical and Functional Properties of Food Saccharides**, 1999.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- BARZOTTO, I. L. M. et al. Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and A-tocopherol content. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 55–63, 2019.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21–33, mar. 2005.
- CASTRO-LÓPEZ, C. et al. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1139–1148, dez. 2017.
- CHOI, S. J. et al. Contents and compositions of policosanols in green tea (*Camellia sinensis*) leaves. **Food Chemistry**, v. 204, p. 94–101, 2016.
- CRUZ, P. N. et al. Antioxidant activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained by supercritical CO₂ + ethanol solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 146, p. 55–64, 2019.
- DE SOUZA, A. R. C. et al. Extraction of *Arctium Lappa* leaves using supercritical CO₂ + ethanol: Kinetics, chemical composition, and bioactivity assessments. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, p. 137–146, 2018.
- DE SOUZA, A. R. C. et al. Assessment of composition and biological activity of *Arctium lappa* leaves extracts obtained with pressurized liquid and supercritical CO₂ extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 152, p. 104573, 2019.
- FERREIRA, S. R. S. et al. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum*

- L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, n. 3, p. 235–245, 1999.
- GARCÍA-PÉREZ, J. S. et al. Supercritical CO₂ -based tailor made valorization of *Origanum vulgare* L extracts: A green approach to extract high-value compounds with applied perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 796–802, 2019.
- GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 3 dez. 2010.
- GOMIDE, R. **Operações Unitárias 1º volume: operações com sistemas sólidos granulares**. v.1, 1983.
- GRZESIK, M. et al. Antioxidant properties of catechins : Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, n. August 2017, p. 480–492, 2018.
- GUEDES, A. R. et al. Extraction of citronella grass solutes with supercritical CO₂, compressed propane and ethanol as cosolvent: Kinetics modeling and total phenolic assessment. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, p. 16–22, 2018.
- HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E. Green processes and sustainability: An overview on the extraction of high added-value products from seaweeds and microalgae. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 211–216, 2015.
- ISLAM, M. T. et al. Phytol: A review of biomedical activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 82–94, 2018.
- JESSOP, P. G.; SUBRAMANIAM, B. **Gas-expanded liquids** **Chemical Reviews**, 2007.
- KALOGO, Y. et al. Effect of a water extract of *Moringa oleifera* seeds on the hydrolytic microbial species diversity of a UASB reactor treating domestic wastewater. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 259–264, 2000.
- LIN, M.; ZHANG, J.; CHEN, X. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. **Journal of Functional Foods**, v. 47, n. June, p. 469–479, 2018.
- LUIZA, T. et al. Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS / MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil. **Food Research International**, v. 125, n. July, p. 108647, 2019.
- MINUSSI, R. C. et al. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 409–416, ago. 2003.
- MORTON, J. F. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae)-A boon to Arid Lands? **The New York Botanical Garden**, v. 45, n. 3, p. 318–333, 1991.
- NAGULA, R. L.; WAIRKAR, S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 296, p. 190–201, 2019.

NOUMAN, W. et al. Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 166–176, 2016.

OGBUNUGAFOR, H. A. et al. Physico-chemical and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed oil. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 10, n. 5, p. 409–414, 2011.

OUÉDRAOGO, J. C. W. et al. Enhanced extraction of flavonoids from *Odontonema strictum* leaves with antioxidant activity using supercritical carbon dioxide fluid combined with ethanol. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 131, p. 66–71, 2018.

OYEYINKA, A. T.; OYEYINKA, S. A. *Moringa oleifera* as a food fortificant: Recent trends and prospects. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 17, n. 2, p. 127–136, abr. 2018.

ÖZCAN, M. M. *Moringa spp*: Composition and bioactive properties. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 25–31, mar. 2020.

PRABAKARAN, M. et al. Polyphenol composition and antimicrobial activity of various solvent extracts from different plant parts of *Moringa oleifera*. **Food Bioscience**, v. 26, p. 23–29, 2018.

RASHID, U. et al. *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8175–8179, 2008.

ROCCHETTI, G. et al. Phenolic profiling and in vitro bioactivity of *Moringa oleifera* leaves as affected by different extraction solvents. **Food Research International**, v. 127, p. 108712, jan. 2020.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C. et al. Green downstream processing using supercritical carbon dioxide, CO₂-expanded ethanol and pressurized hot water extractions for recovering bioactive compounds from *Moringa oleifera* leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 116, p. 90–100, out. 2016.

RUFINO, M. DO S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**, p.1 - 4, 2006. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11964/1/cot-125.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2023.

RUFINO, M. DO S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**, p.1 - 4, 2007. Disponível em : <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2023.

SAINI, R. K.; SIVANESAN, I.; KEUM, Y.-S. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 203, 22 dez. 2016.

- SANTOS, Ê. R. M. et al. Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 1–9, 2017.
- SHEN, J.; LUO, F.; LIN, Q. Policosanols: Extraction and biological functions. **Journal of Functional Foods**, v. 57, n. 498, p. 351–360, 2019.
- SOLIMAN, M. M. et al. The ameliorative impacts of *Moringa oleifera* leaf extract against oxidative stress and methotrexate-induced hepato-renal dysfunction. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 128, p. 110259, 2020.
- SREELATHA, S.; PADMA, P. R. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, n. 4, p. 303–311, 2009.
- TRIVEDI, P. et al. Compositional and morphological analyses of wax in northern wild berry species. **Food Chemistry**, v. 295, p. 441–448, 2019.
- VARADY, A. K.; WANG, Y.; JONES, P. Role of Policosanols in the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease. **Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease**, v. 61, n. 11, p. 376–383, 2003.
- VONGSAK, B. et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566–571, 2013.
- WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.
- ZHAO, S.; ZHANG, D. Supercritical fluid extraction and characterisation of *Moringa oleifera* leaves oil. **Separation and Purification Technology**, v. 118, p. 497–502, out. 2013.

APÊNDICE A – Journal of Food Process Engineering: Extraction of compounds from *Moringa oleifera* leaves using supercritical CO₂ plus ethanol as a cosolvente

Received: 25 August 2021 | Revised: 22 December 2021 | Accepted: 28 December 2021
DOI: 10.1111/jfpe.13979

ORIGINAL ARTICLE

Journal of
Food Process Engineering

WILEY

Extraction of compounds from *Moringa oleifera* leaves using supercritical CO₂ plus ethanol as a cosolvent

Marina da Silva¹ | Julia Trancoso² | Luciano Tormen¹ | Michele M. Bombardelli³ | Marcos L. Corazza²  | Eduarda M. Bainy¹ 

¹Food Engineering Undergraduate Program, Federal University of Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, Puerto Rico, Brazil

²Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraná, Curitiba, Puerto Rico, Brazil

³Department of Food Engineering, State University of Midwest Paraná, Guarapuava, Puerto Rico, Brazil

Correspondence

Eduarda M. Bainy, Food Engineering Undergraduate Program, Federal University of Fronteira Sul, 85.301-970, Laranjeiras do Sul, PR, Brazil.
Email: eduarda.bainy@uffs.edu.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 404326/2016-1

Abstract

Extracts of compounds from *Moringa oleifera* leaves were obtained by supercritical extraction with CO₂ using ethanol as a cosolvent (scCO₂ + EtOH). The experimental conditions were investigated by varying temperature (35–80°C), pressure (15–25 MPa), and mass ratio between ethanol and raw material. The phenolic acids (gallic, vanillic, and p-coumaric acids) and flavonoids (catechin) were identified in all extracts, except for the extract obtained without the cosolvent. The main compounds by GC-MS were 1-triacontanol, nonacosane, heptacosane, phytol, γ -tocopherol, and α -tocopherol. Extracts obtained at 35°C showed the highest values of total phenolic compounds, DPPH, and FRAP, however, the lowest extraction yield. The central point extraction conditions (60°C and 20 MPa) had the best-combined results for yield (4.4%), total phenolic compounds (24 ± 1 mg GAE/g), DPPH (77 ± 2 μ mol Trolox/g), FRAP (265 ± 9 μ mol Trolox/g) and the presence of bioactive compounds.

Practical Applications

Supercritical fluid extraction with CO₂ is a clean technology that employs low temperatures, producing high-quality extracts. *Moringa oleifera* leaf extracts showed different compositions according to the experimental conditions evaluated. The use of ethanol as a cosolvent and high temperatures positively influenced the extraction yield. All extracts showed antioxidant potential. Catechin, gallic, vanillic, and p-coumaric acids were the main phenolic compounds. The extract obtained at the central point condition had better antioxidant potential, yield, and bioactive compounds.

1 | INTRODUCTION

Moringa oleifera is a plant of tropical climate native to India and from the Moringaceae family (Morton, 1991). It has bioactive compounds in different parts (Morton, 1991; Nouman et al., 2016; Özcan, 2020) and nutritional composition (Ali, Yusof, Chin, & Ibrahim, 2017; Amaglo et al., 2010; Saini, Sivanesan, & Keum, 2016). As a result, moringa is used medicinally (Anwar, Latif, Ashraf, & Gilani, 2007), in food formulations (Oyeyinka & Oyeyinka, 2018), in water purification (Kalogo, Rosillon, Hammes, & Verstraete, 2000), and to obtain biodiesel (Rashid, Anwar, Moser, & Knothe, 2008). Moringa extracts have shown biological activities, such as antioxidant (Castro-López

et al., 2017; Rocchetti et al., 2020; Rodríguez-Pérez, Mendiola, Quirantes-Piné, Ibáñez, & Segura-Carretero, 2016), antimicrobial (Prabakaran, Kim, Sasireka, Chandrasekaran, & Chung, 2018), anti-inflammatory (Adedapo, Falayi, & Oyagbemi, 2015), and action against oxidative stress (Soliman et al., 2020). Moringa is considered beneficial for health, food, and other industries. Consequently, it is essential to expand the scientific knowledge regarding its composition and identify the best extraction conditions using pressurized fluids.

Previous work with moringa leaves reported different ways to obtain extracts, such as extraction by infusion with methanol (Nouman et al., 2016), maceration, decoction, ultrasound-assisted extraction (Castro-López et al., 2017), and Soxhlet extraction with