

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**Tássia Carla Confortin**

**AÇÃO FUNGICIDA DE EXTRATOS DE *Lupinus albescens*  
OBTIDOS POR DIFERENTES TECNOLOGIAS DE EXTRAÇÃO**

Santa Maria, RS  
2017

**Tássia Carla Confortin**

**AÇÃO FUNGICIDA DE EXTRATOS DE *Lupinus albescens* OBTIDOS POR  
DIFERENTES TECNOLOGIAS DE EXTRAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Área de Concentração Engenharia Agroambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Agrícola**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Confortin, Tássia Carla  
AÇÃO FUNGICIDA DE EXTRATOS DE *Lupinus albescens*  
OBTIDOS POR DIFERENTES TECNOLOGIAS DE EXTRAÇÃO / Tássia  
Carla Confortin.- 2017.  
98 p.; 30 cm

Orientador: Marcus Vinicius Tres  
Coorientador: Marcio Antonio Mazutti  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2017

1. Extração 2. Fluidos supercríticos/pressurizados 3.  
Atividade antifúngica 4. *Lupinus albescens* 5. Atividade  
antioxidante I. Tres, Marcus Vinicius II. Mazutti,  
Marcio Antonio III. Título.

**Tássia Carla Confortin**

**AÇÃO FUNGICIDA DE EXTRATOS DE *Lupinus albescens* OBTIDOS POR  
DIFERENTES TECNOLOGIAS DE EXTRAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Área de Concentração Engenharia Agroambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Agrícola**.

**Aprovado em 17 de julho de 2017:**

---

**Marcus Vinícius Tres, Dr. (UFSM)  
Presidente/Orientador**

---

**Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)  
Coorientador**

---

**Giovani Leone Zobot, Dr. (UFSM)**

---

**Valéria Dal Prá, Dra. (UFRJ)**

Santa Maria, RS  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que sempre iluminou o meu caminho, guiou os meus passos, me dando forças para seguir em frente, me abençoando, por nunca soltar a minha mão e só colocar pessoas maravilhosas na minha vida.

Aos meus queridos pais, Aldecir e Leonira, pelo amor, carinho, confiança, incentivo e apoio incondicional, por serem o meu alicerce e o meu porto seguro. Agradeço imensamente por entenderem quando tive que me fazer ausente, não podendo estar presente em várias ocasiões. A meu irmão Michel por todos momentos de descontração, companheirismo, amizade, tolerância e amor. Sabes o quanto és especial para mim. Ao meu namorado Izelmar, pelo amor, incentivo, paciência, companheirismo e pela ajuda que necessitei durante a realização dos experimentos deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos de Souza e de Erechim, que mesmo de longe sempre apoiaram, me deram força, por sempre ouvirem os meus desabafos, pelos conselhos, incentivo, carinho e risadas proporcionadas.

Aos meus queridos amigos que fiz durante esses dois anos de mestrado, em especial a Luciana, Juliana, Thiarles, Jéssica e Suzy, os quais se tornaram tão importantes, onde dividimos momentos de alegria, compreensão, aprendizado e ensinamentos. Obrigada pela amizade forte e verdadeira.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcus Vinicius Três e coorientador Marcio Antonio Mazutti, agradeço a confiança em que depositaram a mim para desenvolver este trabalho, pela imensa atenção, dedicação e comprometimento na orientação por meio de sugestões e correções essenciais para a conclusão do presente estudo. Verdadeiramente tive grandes mentores que pude contar neste período que contribuiu muito para minha formação.

Agradeço ao Prof. Dr. Giovani e Valéria Dal Prá pelas contribuições ao trabalho realizado, aos artigos e fico imensamente feliz por ter tido a oportunidade de trabalhar com vocês.

A todos os professores do Departamento de Engenharia Agrícola, obrigada pelos ensinamentos e orientações.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, por ser um lugar de excelência para estudar.

Aos amigos do Laboratório BiotecFactory e ao Gustavo Ugalde pela convivência agradável, amizade, conhecimento e auxílio em diversos momentos.

Um agradecimento especial para o Cícero e para o Prof. Leopoldo, vocês foram de suma importância para a realização deste trabalho, sem medir esforços para ajudar em momentos em que tanto precisei.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Ministério da Educação) pelo apoio financeiro.

A vocês e todos aqueles que de forma direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista, que sempre acreditaram em mim, me ajudaram e apoiaram dando força para vencer mais esta etapa da minha vida, o MEU MUITO OBRIGADA!

Escolher Santa Maria e a UFSM para ser minha casa e meu trabalho foi uma escolha difícil, mas hoje estou convicta que foi a escolha mais correta, pois tive as melhores pessoas ao meu lado. Foram muitas as aprovações, a tentação de desistir bateu muitas vezes em minha porta, mas sempre tinha um de vocês para dizer não! Eu confio em você! Siga em frente!, ou, vai dar tudo certo!. Por esses motivos, que sou muito grata.

E a vocês dedico o trecho do poema Nada foi em vão de Mário Quintana: “Quero, um dia, poder ter a liberdade de dizer às pessoas que nada foi em vão... Que o amor existe, que vale a pena se doar as amizades e às pessoas, que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim... e que valeu a pena”.

*A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

### EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *LUPINUS ALBESCENS* UTILIZANDO FLUIDOS PRESSURIZADOS

AUTORA: Tássia Carla Confortin  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres

A utilização de produtos químicos, em doses excessivas ou de forma inadequada, no controle de pragas e doenças na agricultura, tem promovido grandes danos ambientais, contaminação de animais, intoxicação de agricultores, entre outros. Buscando alternativas de controle menos agressivas, extratos vegetais têm sido utilizados com sucesso e ressurgem como uma opção diferenciada e promissora para o manejo integrado em proteção de plantas. Estes produtos são considerados uma alternativa de controle de fitopatógenos, demonstrando prósperos resultados, não causando malefícios ao meio ambiente e aos seres vivos. Uma das técnicas de obtenção dos extratos vegetais é a extração por fluidos supercríticos/pressurizados que também aparece como ótima opção de tecnologia economicamente viável e ecologicamente correta. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi investigar o potencial da extração das flores, folhas, caules e raízes de *Lupinus albus*, a partir da técnica da extração por fluidos pressurizados ou em condições supercríticas utilizando gás liquefeito de petróleo (GLP) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solventes, bem como avaliar os parâmetros cinéticos, adequando ao ajuste matemático. Realizou-se também a caracterização dos extratos obtidos e avaliação do seu potencial no controle biológico. Na extração supercrítica foram utilizados dióxido de carbono no estado supercrítico (EFS-CO<sub>2</sub>) e gás liquefeito de petróleo pressurizado. Na EFS-CO<sub>2</sub> os valores de pressão investigadas foram fixados entre 150 a 250 bar e os valores da temperatura entre 40 e 60°C; já para a extração com GLP pressurizado, estes parâmetros foram fixados entre 15 e 35 bar e 25 e 45°C, respectivamente, sendo avaliados o rendimento de extração, os parâmetros cinéticos, o perfil químico e efeito antifúngico. O rendimento máximo de extrato obtido nas diferentes matrizes foi de 1,28% na folha com o solvente GLP nas condições de 45°C e 15 bar. Os perfis químicos foram semelhantes para todas as matrizes e solventes investigados, destacando-se o composto estigmasterol, em relação à concentração inibitória mínima que variou de 29,248 à 192,965 µg/ml<sup>-1</sup>. Para os testes antifúngicos, todos os extratos apresentaram poderes inibitórios para *Fusarium oxysporum* e *Fusarium verticillioides*. O extrato vegetal obtido a partir da raiz apresentou poder de inibição superior, para *Fusarium oxysporum* de 70,12% (CO<sub>2</sub>) e 65,12% (GLP) de inibição, e para *Fusarium verticillioides* de 67,76% (CO<sub>2</sub>) e 61,15% (GLP). A partir dos resultados obtidos neste trabalho, os mesmos confirmam que a extração supercrítica ou utilizando fluido pressurizado é uma metodologia promissora na obtenção de compostos bioativos de *Lupinus albus*, sendo que o extrato apresentou potencial antifúngico para ambos os fungos investigados neste trabalho.

**Palavras-chave:** *Lupinus albus*. Extração. Caracterização. Dióxido de Carbono Supercrítico. Gás Liquefeito de Petróleo Pressurizado. Atividade antioxidante. Potencial antifúngico.



## ABSTRACT

### EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *LUPINUS ALBESCENS* USING PRESSURIZED FLUIDS

AUTHOR: Tássia Carla Confortin  
ADVISOR: Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres

The use of chemicals, in excessive doses or inadequately, in the control of pests and diseases in agriculture, has promoted environmental damage, contamination of animals, intoxication of farmers, among others. Looking for less aggressive control alternatives, plant extracts have been successfully used and are a differentiated and a promising option for the integrated management in plant protection. These products are considered an alternative for the control of phytopathogens. They do not cause harm to the environment and to living beings. One of the techniques for extracting plant extracts is the extraction with supercritical/pressurized fluids. This technology appears as a great option which is economically viable and ecologically correct. Therefore, the main objective of this work was to investigate the potential of extraction of extracts from flowers, leaves, stalks and roots of *Lupinus albus*, using pressurized fluids as liquefied petroleum gas (LPG) or supercritical carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). Furthermore, the objective was to evaluate the kinetic parameters, adjusting to a mathematical spline model. Characterization of extracts and evaluation of their potential in biological control, was performed. In the supercritical fluid extraction with CO<sub>2</sub> (SFE-CO<sub>2</sub>) pressure ranged between 150 to 250 bar and temperature ranged between 40 and 60°C. In the extraction with compressed LPG, these parameters were fixed between 15 and 35 bar and 25 and 45°C, respectively. The yield of extraction, kinetic parameters, chemical profile and antifungal effect were evaluated. Maximum yield of extract obtained from different matrices was 1.28% in leaves with solvent LPG under 45°C and 15 bar. The chemical profiles were similar for all matrices and solvents investigated, highlighting stigmasterol. With respect to minimum inhibitory concentration, it ranged from 29.248 to 192.965 µg mL<sup>-1</sup>. For antifungal tests, all extracts showed inhibitory powers for *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticillioides*. Plant extract obtained from roots showed superior inhibition power, as 70.12% (CO<sub>2</sub>) and 65.12% (LPG) for *Fusarium oxysporum*, and 67.76% (CO<sub>2</sub>) and 61.15% (LPG) for *Fusarium verticillioides*. From the results obtained in this work, it is possible to confirm that the supercritical extraction or using pressurized fluid is a promising methodology for obtaining bioactive compounds from *Lupinus albus*, which presented antifungal potential for both fungi investigated in this work.

**Keywords:** *Lupinus albus*. Extraction. Characterization. Supercritical Carbon Dioxide. Pressurized Liquefied Petroleum Gas. Antioxidant activity. Antifungal potential.

## LISTA DE FIGURAS

### APRESENTAÇÃO

Figura 1.1- Fluxograma das atividades realizadas nesta dissertação.....17

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2.1- Inflorescência de *Lupinus luteus* (tremoço amarelo) (A), *Lupinus albus* (tremoço branco) (B) e *Lupinus angustifolius* (tremoço azul) (C).....18

Figura 2.2- Distribuição do gênero *Lupinus* ssp. no Brasil.....19

Figura 2.3- Região de São Francisco de Assis (1), onde há ocorrência natural de *L. albescens* no Rio Grande do Sul.....20

Figura 2.4- Aspectos do tremoço nativo de ocorrência espontânea em solo arenizado em São Francisco de Assis/RS, A: estado vegetativo de *L. albescens*, B: processos erosivos em solos arenizados (habitat), C e D: inflorescência do *L. albescens*.....22

Figura 2.5- Aspecto dos Fungos: *Fusarium verticillioides* (A) e *Fusarium oxysporum* (B).....27

Figura 2.6- Aparelho de extração convencional – Soxhlet.....30

Figura 2.7- Diagrama de fases em condições de fluido supercrítico.....31

Figura 2.8- Cinética de extração caracterizada por três períodos: CER, FER e Período Difusional.....34

### ARTIGO 1

Figura 1- Kinetic yields of extracts obtained from *Lupinus albescens* by SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG: experimental data and fitted curves using the spline model; assay 1 (■); assay 2 (◆); assay 3 (▲); assay 4 (●); average of assays 5, 6 and 7 (×); fitted line (—).....44

Figura 2- Composition (% area) of extracts obtained from *Lupinus albescens* by SFE-CO<sub>2</sub>, PLE-LPG, and Soxhlet; the condition that presented the highest yield for each solvent is presented; Stigmasterol (■); Ergosterol (▣); Vitamin E (■); Methyl Commate (□); Pentadecanoic acid (▤); Eicosanol (▥); Octadecanoic acid (▦); Neophytadiene (▧); Epiergostanol (▨); Tetracosanol (▩).....53

### ARTIGO 2

Figure 1- IC<sub>50</sub> of extracts from *L. albescens* obtained by supercritical fluid extraction with carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and pressurized liquid extraction with compressed liquefied petroleum gas (LPG).....66

Figure 2- Inhibition of roots extracts obtained from *L. albescens* against *F. oxysporum* and *F. verticillioides*; A: Control; B: 1<sup>st</sup> day of application; C: CO<sub>2</sub> roots extract after 7 days; D: LPG roots extract after 7 days; E: Control; F: 1<sup>st</sup> day of application; G: CO<sub>2</sub> roots extract after 7 days; H: LPG roots extract after 7 days.....70

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.1- Comparação entre as propriedades de gases, líquidos e fluidos supercríticos.....32

### ARTIGO 1

Table 1- Comparison of extraction yields obtained from *Lupinus albus* using SFE-CO<sub>2</sub>, PLE-LPG, and Soxhlet.....43

Table 2- Extraction of bioactive compounds from *L. albus* by SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG: kinetic parameters.....47

Table 3- Correlation of data predicted by the spline model with the experimental data for the extraction of compounds from *Lupinus albus*.....52

### ARTIGO 2

Table 1- Extraction conditions and yields of extracts from different parts of *L. albus*: roots, stalks, leaves, and flowers.....63

Table 2. Mycelial growth inhibition (percentage of *F. oxysporum* and *F. verticillioides*) by *L. albus* extracts.....68

## LISTA DE ABREVIATURAS

EFS	Extração com fluidos supercríticos
EFP	Extração com fluídos pressurizados
CO2	Dióxido de carbono
ESC	Extração supercrítica
GLP	Gás liquefeito de petróleo
CER	Taxa de extração constante
FER	Taxa decrescente de extração
DPPH	Radical 2,2 – difenil- 1- picril- hidrazila

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1- APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	13
1.2 OBJETIVOS .....	15
<b>1.2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	16
<b>CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
2.1 GÊNERO <i>Lupinus</i> sp.....	18
<b>2.1.1 <i>Lupinus albescens</i></b> .....	<b>20</b>
2.2 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES .....	22
2.3 CONTROLE BIOLÓGICO .....	23
<b>2.3.1 Extratos vegetais com potencial biológico – Metabólitos</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3.2 Potencial antifúngico de extratos vegetais</b> .....	<b>25</b>
2.3.2.1 Fungos Fitopatogênicos - Gênero <i>Fusarium</i> .....	26
2.3.2.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	27
2.3.2.1.2 <i>Fusarium verticillioides</i> .....	28
2.4 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO .....	29
<b>2.4.1 Soxhlet</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4.2 Extração Supercrítica</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4.3 Extração com líquidos pressurizados</b> .....	<b>32</b>
2.5 ESTUDO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO .....	33
2.6 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	34
<b>CAPÍTULO 3- ARTIGO 1</b> .....	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO 4- ARTIGO 2</b> .....	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>76</b>
5.1 DISCUSSÃO .....	766
5.2 CONCLUSÕES GERAIS.....	777
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>799</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>93</b>

## **CAPÍTULO 1- APRESENTAÇÃO**

### **1.1 INTRODUÇÃO**

Produtos naturais obtidos a partir da extração de matrizes vegetais constituem-se de substâncias bioativas compatíveis com programas de manejo integrado de pragas (MIP). Tais produtos podem ser fortes aliados a outros métodos de controle de plantas daninhas, insetos e doenças, mantendo o equilíbrio ambiental, sem deixar resíduos químicos, sem ação tóxica aos animais e ao homem e reduzindo os efeitos negativos ocasionados pela aplicação descontrolada de produtos sintéticos (MEDEIROS et al., 2005). Portanto, as plantas com suas propriedades antagônicas se tornam uma ferramenta importante ao controle biológico (BETTIOL & MORANDI, 2009).

A utilização do manejo biológico de doenças é preconizada com o objetivo de reduzir o uso de fungicidas, uma vez que estes podem causar danos ao homem, ao meio ambiente e contribuir para o surgimento de populações de fitopatógenos resistentes (TALAMINI & STADNICK, 2004). Neste contexto, o controle biológico, a indução de resistência em plantas, o uso de extratos vegetais e óleos essenciais surgem como alternativas ao método convencional de controle de doenças em plantas (SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005).

Extratos de plantas estão sendo investigados em fungos fitopatogênicos em diversos trabalhos publicados na literatura (CARNELOSSI et al., 2009; VENTUROSO et al., 2011; KOONA&BUDIDA, 2011; BIGATON et al., 2013; BONA et al., 2014). Estes apresentam resultados quanto o seu potencial no controle de fitopatógenos, por meio de sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial, formação de apressório e a germinação de esporos dos fungos, com destaque do efeito sobre a planta, que apresenta capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas em mecanismos de resistência (BENICIO et al.,2003; VENTUROSO et al., 2011).

A biodiversidade brasileira é considerada como fonte de substâncias biologicamente ativas e apresenta imenso potencial para a produção de compostos secundários que podem possuir atividades sobre insetos, plantas daninhas e fungos. Assim, os inseticidas, herbicidas e fungicidas naturais contribuem para o aumento da

produtividade e permanência sadia dos cultivares, tornando a área de cultivo mais equilibrada (MARANGONI et al., 2012).

Dentre as espécies presentes no Estado do Rio Grande do Sul, encontra-se o *Lupinus albescens*, pertencente à família Fabaceae e ainda pouco investigada em relação aos seus constituintes secundários (RATES, 2001; SIMÕES et al., 2002). O gênero *Lupinus*, também conhecido como tremoço, é uma planta encontrada em habitats abertos e ensolarados. No Brasil as espécies de *Lupinus* são encontradas em solos pobres como os serrados e campos rupestres de cima da serra (MONTEIRO & MONTEIRO, 1986).

O *L. albescens* é uma espécie do “Novo Mundo” (GRANADA et al., 2015), nativa da região noroeste da Argentina, Uruguai, Paraguai e sul do Brasil (PLANCHUELO et al., 1984). Na maior parte dos países, estas plantas foram utilizadas como culturas de cobertura, com intuito de melhorar o solo (VÁZQUEZ et al., 2006; MARTÍNEZ-ALCALÁ et al., 2010).

Entre os métodos de extração de matrizes vegetais investigados atualmente, a extração com fluidos supercríticos (EFS) e a extração com fluidos pressurizados (EFP) ocupam lugar de destaque nas investigações. Apresentam-se como uma alternativa ambientalmente correta e economicamente viável em relação aos métodos convencionais de extração, onde grandes quantidades de solventes, longos tempos de extração e altas temperaturas são requeridas, podendo promover a degradação dos compostos durante o processo extrativo (JU & HOWARD, 2003; NOBRE et al., 2006). A extração com fluidos pressurizados e/ou supercríticos permite minimizar alterações químicas e degradação de compostos sensíveis ao calor. O extrato é obtido em temperaturas relativamente baixas e livre de resíduos de solventes orgânicos (BOZAN & TEMELLI, 2002; YIN et al., 2005; SPARKS et al., 2006).

O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é o solvente mais utilizado na extração supercrítica (ESC), por permitir operações com pressões relativamente baixas e temperaturas próximas ao ambiente. Convém ressaltar que o  $\text{CO}_2$  apresenta algumas vantagens de utilização, pois é reconhecido como solvente seguro (MANTELL et al., 2013), inerte, não tóxico e não inflamável, está facilmente disponível com elevada pureza e apresenta baixo custo (BRUNNER, 2005; POULIOT et al., 2014).

Estudos também apresentam que o gás liquefeito de petróleo (GLP) vem sendo utilizado nas extrações de extratos naturais com resultados promissores (SOARES et al., 2016a; ABAIDE et al., 2017). Esta extração apresenta alguns benefícios como: proporcionar maior rendimento e seletividade, menor tempo de extração e menor consumo de solvente em comparação à extração onde se utiliza CO<sub>2</sub> como solvente (SALLET et al., 2017).

Considerando que a literatura apresenta poucos registros de pesquisas com a espécie *L. albescens* e tendo em vista o grande potencial antifúngico existente nos extratos vegetais, surgiu o interesse em investigar esta espécie. Assim, neste trabalho foram avaliados os seguintes parâmetros: rendimento dos extratos obtidos, composição química dos extratos extraídos das diferentes matrizes vegetais (flores, folhas, caules e raízes) e sua atividade contra a inibição de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium verticillioides*.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal investigar o potencial da extração de *Lupinus albescens*, bem como realizar a caracterização dos extratos obtidos e analisar o seu potencial para controle biológico.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Dentro deste contexto, os objetivos específicos foram delineados:

- Obter extratos a partir da planta *Lupinus albescens* (flores, folhas, caules e raízes) utilizando o método de extração com fluido pressurizados e/ou supercrítico;
- Verificar a viabilidade técnica da extração utilizando CO<sub>2</sub> e GLP como solventes;
- Investigar as condições de pressão e temperatura para a extração dos componentes presentes nas partes da planta *Lupinus albescens*;
- Realizar a modelagem matemática das curvas cinéticas de extração;



- Identificar os compostos bioativos dos extratos: análise cromatográfica e avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos;
- Avaliar o efeito dos metabólitos extraídos do *Lupinus albescens* sobre os fungos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium verticillioides*.

### 1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta Dissertação de Mestrado está organizada em Capítulos da seguinte forma:

Capítulo 1: é apresentada a introdução, os objetivos da presente dissertação de mestrado e a estrutura da mesma.

Capítulo 2: apresenta-se uma breve revisão da literatura, evidenciando sobre os conceitos fundamentais que norteiam a dissertação.

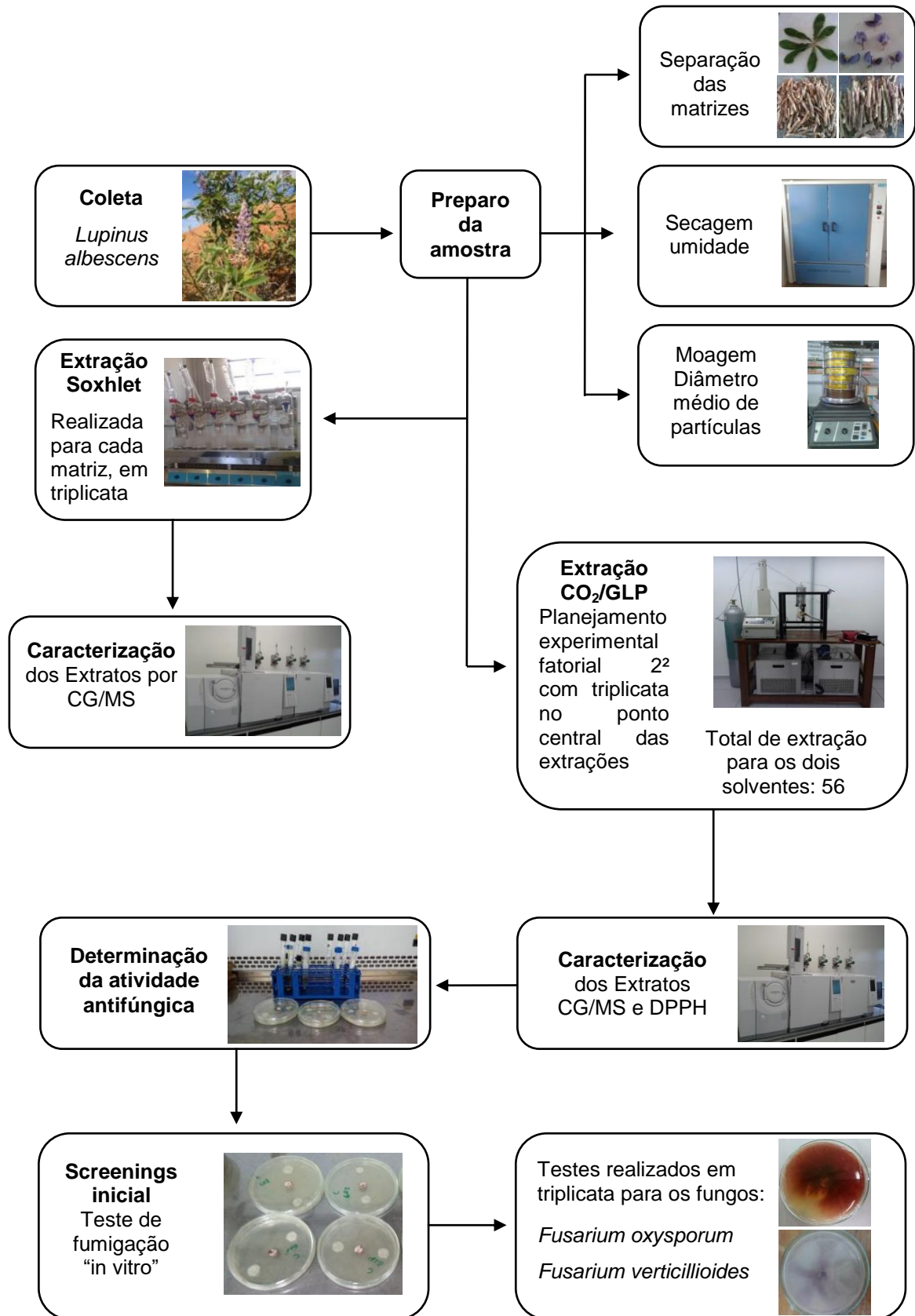
Capítulo 3: é apresentado o primeiro artigo, que teve como foco a extração, os parâmetros cinéticos e a caracterização dos compostos das matrizes: flores, folhas, caules e raízes da planta *Lupinus albescens*.

Capítulo 4: apresenta o segundo artigo, no qual foi avaliado o potencial dos extratos de diferentes matrizes vegetais de *Lupinus albescens*, obtidos por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico e GLP comprimido, sobre o desenvolvimento *in vitro* de duas espécies de *Fusarium*: *Fusarium oxysporum* e *Fusarium verticillioides*. Além disso, avaliou-se a atividade antioxidante dos mesmos extratos por radical livre 2,2 – difenil- 1- picril- hidrazila (DPPH).

Capítulo 5: são apresentadas as discussões e conclusões gerais do trabalho.

A Figura 1.1 apresenta um fluxograma organizacional do presente trabalho, com intuito de melhor entendimento das etapas realizadas na consecução do mesmo.

Figura 1.1- Fluxograma das atividades realizadas nesta dissertação



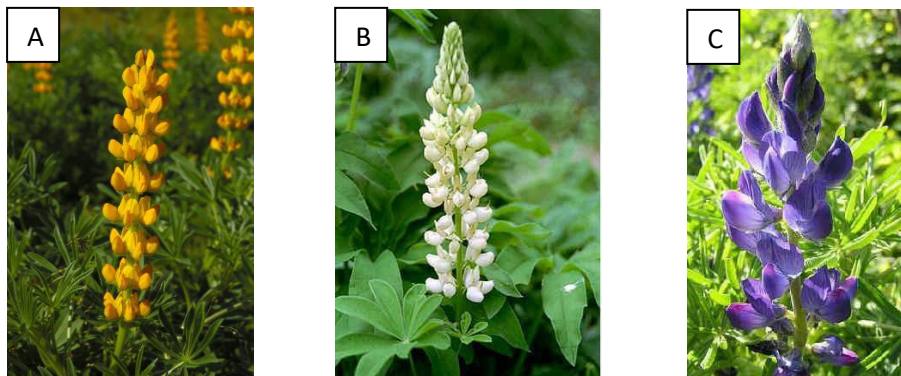
Fonte: autor.

## CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GÊNERO *Lupinus* sp.

A palavra *Lupinus* tem origem do latim, lúpulo (lobo), pela grande capacidade de adaptação em todos os tipos de ambientes, sendo necessário, para isso, uma leve camada de solo (BARROSO, 1991; SPRENT, 2000). Este gênero é constituído por plantas anuais herbáceas ou perenes herbáceas e arbustivas, apresentando crescimento ereto, folhas compostas e digitadas, frutos em forma de vagem e inflorescências papilionadas e racemosas (Figura 2.1) (PINHEIRO, 2000; PINHEIRO & MIOTTO, 2001).

Figura 2.1- Inflorescência de *Lupinus luteus* (tremoço amarelo) (A), *Lupinus albus* (tremoço branco) (B) e *Lupinus angustifolius* (tremoço azul) (C)



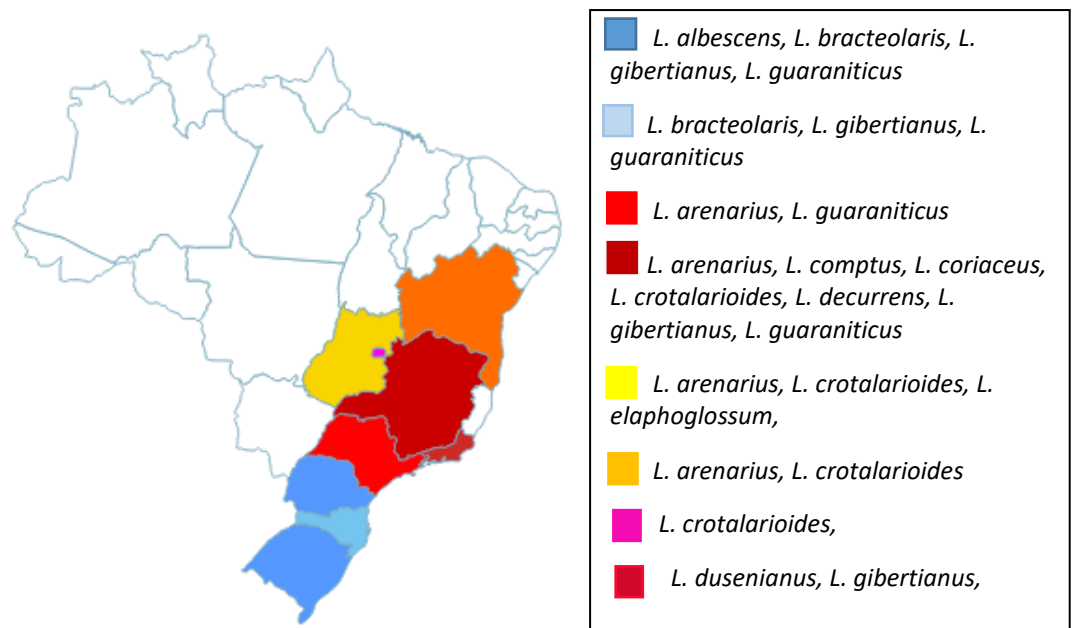
Fonte: (CREMONEZ et al., 2013).

São consideradas plantas rústicas, por apresentarem folíolos e ramos pilosos com alto teor de substâncias resiníferas, característica esta que serve como mecanismo de proteção e adaptação às condições climáticas de determinadas regiões. São encontrados em sua maioria em habitats ensolarados e abertos, sendo intolerantes a muita proteção (PINHEIRO & MIOTTO, 2001; ROVEDEER, 2007) e por possuírem um sistema radicular profundo e largo prosperam em solos com pouca água e nutrientes (GLADSTONE et al., 1998).

Conhecido popularmente como tremoço, pertence à família Fabaceae e possui mais de 500 espécies em nível mundial (STĘPKOWSKI et al., 2007). Estão presentes em grande número, principalmente no oeste da América do Norte, Alasca, México, Peru, Brasil, Uruguai e Argentina (GLADSTONE, 1998; BACKES, 1999).

Segundo dados da Flora do Brasil existem 31 espécies de *Lupinus* sp., catalogadas no Brasil, com distribuição geográfica confirmada: Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), com domínios fitogeográficos na Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (Figura 2.2).

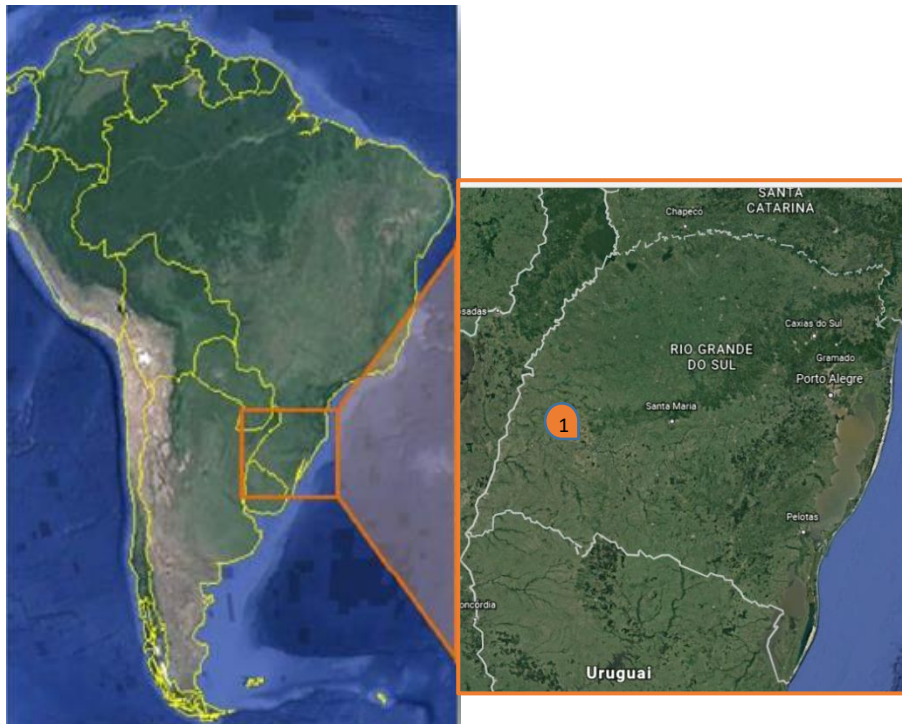
Figura 2.2- Distribuição de algumas espécies do gênero *Lupinus* sp. no Brasil



Fonte: *Lupinus* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

No Rio Grande do Sul, o gênero *Lupinus*, está representado por 13 espécies, sendo estas, distribuídas por todas as regiões do estado, porém, com uma maior incidência nos Campos de Cima da Serra (BACKES, 1999; PINHEIRO & MIOTTO 2001). Na região Sudeste são identificadas as espécies: *Lupinus albescens*, *Lupinus bracteolaris*, *Lupinus gibertianus*, *Lupinus linearis*, *Lupinus lanatus* e *Lupinus multiflorus*, além de uma espécie ainda não identificada (ROVEDEER, 2007). Destaque para a região de São Francisco de Assis (S: 29° 43' 23,2"/ W: 053° 43' 03.4"), onde foi identificada a planta estudada, *L. albescens* (Figura 2.3).

Figura 2.3- Região de São Francisco de Assis(1), onde há ocorrência natural de *L. albescens* no Rio Grande do Sul



Fonte: Google Earth™.

### 2.1.1 *Lupinus albescens*

A vegetação da região sudoeste do estado do Rio Grande do Sul possui espécies testemunhas de um paleoambiente desértico, mais seco que o atual. A exemplo disto verifica-se a ocorrência de espécies cactáceas, além de diversas características de xerofilia, tais como elevada pilosidade, elevado conteúdo de compostos resiníferos, presença de órgão de reserva, entre outras peculiaridades úteis a este tipo de ambiente (MARCHIORI, 1995). Entre estas espécies, encontra-se o *L. albescens*, uma leguminosa que pertence ao “Novo Mundo”, ocorrendo naturalmente na Argentina, Uruguai, Paraguai e nas regiões da Campanha, Litoral e Missões do Rio Grande do Sul (PINHEIRO, 2000; GRANADA et al., 2015).

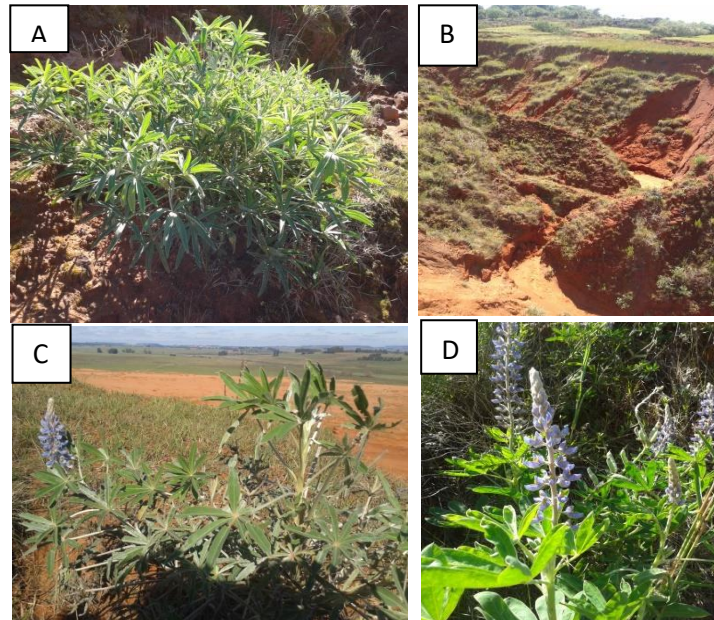
Popularmente conhecida como tremoço nativo, esta espécie apresenta folíolos e ramos muito pilosos, além de apresentar substâncias resiníferas, o que pode ser um mecanismo de adaptação às condições edafoclimáticas da região, comprovando a sua evolução paralela a um paleoambiente xeromórfico. Estas características, além de atribuírem alta rusticidade à espécie, possuem efeitos

benéficos quanto ao uso da espécie em estratégias de recuperação de solo e a torna inadequada ao consumo animal. Essa elevada pilosidade atua diminuindo a transpiração, fator importante em solos de baixa retenção hídrica (ROVEDDER et al., 2005). Devido à sua capacidade de crescer em solos arenosos, Fuentes e Planchuelo (1999), relataram que *L. albescens* foi a primeira espécie de tremoço a colonizar bancos de areia e que poderia ser recomendada como planta útil para a fixação de dunas.

É uma planta de porte herbáceo, de crescimento ereto, com hábito anual, apresentando folhas digitadas, inflorescências racemosas com flores lilases e frutos na forma de vagem, com até sete sementes (Figura 2.4) (PINHEIRO, 2000). A germinação do tremoço nativo é abundante, levando de 10 a 20 dias para germinar, formando um banco de plântulas com alta densidade. Por tratar-se de uma espécie nativa, que não sofreu processos de melhoramento genético, o *L. albescens* possui desuniformidade em algumas fases do seu desenvolvimento, tais como desigual na emissão das inflorescências e florescimento irregular dentro do racemo (ROVEDDER, 2007).

Além dessas características, a espécie apresenta dormência das sementes, o qual se trata de um fenômeno fisiológico causado por bloqueio físico representado pelo tegumento resistente e impermeável que, ao impedir o trânsito aquoso e as trocas gasosas, não permite a embebição da semente nem a oxigenação do embrião, que por isso permanece latente. Essas sementes, denominadas duras, alcançam grande longevidade e qualquer procedimento que permita romper o tegumento das sementes (escarificação), fazendo-as absorver água, promove sua germinação e emergência de plântulas geralmente vigorosas (GRUS, 1990).

Figura 2.4- Aspectos do tremoço nativo de ocorrência espontânea em solo arenizado em São Francisco de Assis/RS. A: estado vegetativo de *L. albescens*, B: processos erosivos em solos arenizados (habitat), C e D: inflorescência do *L. albescens*



Fonte: autor.

## 2.2 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser compreendidos como um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais, normalmente baixas quando comparadas as concentrações dos substratos oxidáveis, retardam ou inibem significativamente a oxidação daquele substrato pela reação com os radicais livres, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo (SOUSA et al., 2007).

Basicamente, os antioxidantes são divididos em dois grupos, primários que são capazes de interromper a cadeia de radicais doando um elétron a um radical lipídico livre, assumindo a condição estável; e secundários que reduzem o processo inicial de formação do radical livre, utilizando agentes quelantes de metais (OLIVEIRA, 2010).

A origem das substâncias antioxidantes pode ser sintética ou natural sendo benéficas à saúde protegendo as células do organismo contra danos causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (BAJEROVÁ et al, 2014; GOUFO & TRINDADE, 2014). Crescente interesse na identificação de antioxidantes naturais eficazes e econômicos tem surgido devido ao aumento da preocupação com a

segurança dos antioxidantes sintéticos, tais como o hidroxianisolbutilado e hidroxitoluenobutilado (LAOKULDILOK et al., 2011). Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonoides e isoflavonoides, taninos, ligninas, xantonas e outros (RAZAVI et al., 2008).

Muitos métodos são usados para estimar a atividade antioxidante de uma substância ou de uma mistura de substâncias. Estudos demonstraram que a atividade antioxidante é fortemente influenciada pelo método de determinação, razão pela qual os dados da literatura são difíceis de serem comparados. Além disso, as propriedades antioxidantes de óleos essenciais dependem da composição qualitativa e quantitativa dos sistemas em teste (RUBERTO & BARATTA, 2000).

Dentre os métodos mais utilizados para a avaliação DPPH (KUSKOSKI et al., 2005; BARBOSA et al., 2006, ABE et al., 2007; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006), método que consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical DPPH, que possui coloração púrpura que absorve a 515 nm, na qual através de um antioxidante o radical DPPH é reduzido formando o difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela (SOUSA et al., 2007).

### 2.3 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle das doenças na agricultura tem se intensificado, sendo realizado basicamente através do emprego de produtos químicos (VENTUROSOSO et al., 2010). Estes produtos em curto prazo auxiliam de maneira eficaz o agricultor no alcance de altas produtividades. Porém, em longo prazo, acarreta resultados negativos tanto para a sociedade como para o ambiente: isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, resíduos nos alimentos, desequilíbrio biológico, intoxicação de operadores, são alguns dos problemas existentes (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Nos últimos anos, tem havido crescente interesse em métodos agrícolas que sejam ambientalmente e economicamente viáveis. Assim sendo, é de fundamental importância a pesquisa constante e a procura de novos grupos químicos com efeitos fungicidas. Na natureza, a maioria das plantas são resistentes aos diferentes patógenos e essa resistência pode estar relacionada à existência de fungicidas



produzidos naturalmente (LEMOS et al., 1990). A busca de métodos alternativos ao controle químico inclui a utilização de produtos naturais que são menos agressivos ao ambiente, destacando-se entre estes os extratos botânicos (PEREIRA et al., 2008; JABRAN et al., 2015).

Existe uma grande diversidade de fontes entre os extratos botânicos. Eles podem ser extraídos de uma planta inteira ou de uma parte da planta (parte aérea, ramo, bulbo, flor, fruta, folha, casca, raiz, semente) e de material vegetal fresco ou seco (OKWU et al., 2007; CHOHAN et al., 2011; CORDOVA-ALBORES et al., 2014; WANG et al., 2016). A composição dos vegetais flutua em quantidade e qualidade, dependendo da planta (espécie, variedade, subespécie), órgão, idade ou estágio da planta, composição do solo, estação e clima (BASER & BUCHBAUER, 2009; PITAROKILI et al., 2003; RAEISI et al., 2015; LICATA et al., 2015; MOGHADDAM & MEHDIZADEH, 2015).

### **2.3.1 Extratos vegetais com potencial biológico – Metabólitos**

O metabolismo vegetal consiste em um conjunto de reações que ocorrem em cada célula que visam à produção de energia através da adenosina trifosfato (ATP) e biossíntese de substâncias indispensáveis à sua sobrevivência (CAPASSO et al., 2011). Os compostos químicos obtidos são chamados de metabólitos, que podem ser classificados como primários ou secundários.

Os metabólitos primários são essenciais ao crescimento e à vida das plantas, como os monossacarídeos, aminoácidos entre outros. Os metabólitos secundários estão relacionados aos processos adaptativos de defesa das plantas sendo considerados produtos finais (ANARAT-CAPPILLINO & SATTELY, 2014). As plantas, apesar de autotróficas, são imóveis, não podendo escapar do ataque de fitopatógenos, pragas ou invasão de outras plantas, por esta razão a principal função destes metabólitos é a proteção contra o ataque de seus inimigos (OLIVEIRA et al., 2012). Pode-se afirmar, portanto, que os metabólitos secundários são a forma encontrada pelas plantas para se comunicar ou responder a estímulos externos (PAVARINI et al., 2012).

A interação química de plantas e microrganismos através da produção e liberação no ambiente de compostos provenientes do metabolismo secundário, que podem interferir no crescimento e no desenvolvimento de sistemas biológicos é

conhecido como alelopatia. Estes compostos (aleloquímicos) podem ser usados diretamente para a formulação de herbicidas naturais, inseticidas, fungicidas e nematicidas (defensivos agrícolas) ou até mesmo alterados a fim de melhorar sua ação biológica (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007; FERREIRA et al., 2008; DOUSSEAU et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2014b).

As substâncias aleloquímicas podem ser produzidas em todos os tecidos da planta como, folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e sementes. Sua presença pode variar em quantidade e qualidade e de espécie para espécie, visto que sua ocorrência e síntese sofrem influência de fatores genéticos e ambientais (VIDAL, 2010; LI et al., 2011).

São conhecidos cerca de 10.000 metabólitos secundários com ação alelopática (BARBOSA et al., 2008). Convém ressaltar que os terpenos, os compostos fenólicos e os alcaloides são os três grupos de metabólitos secundários mais importantes nas plantas (VIZZOTTO et al., 2010) que apresentam diversas aplicações em muitas áreas. Isso se deve ao fato de atuarem como agentes antibacterianos ou antifúngicos, agentes redutores do colesterol, imunossupressores, antiparasitários e herbicidas (VAISHNAV & DEMAIN, 2010).

### **2.3.2 Potencial antifúngico de extratos vegetais**

Um dos principais métodos de controle de doenças de plantas é a utilização de fungicidas sintéticos (GARCIA et al., 2012). Seu uso constante pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, fazendo com que estes não tenham mais uma eficiência satisfatória (SILVA et al., 2008). A utilização de extratos vegetais é vista como uma grande oportunidade, reduzindo os riscos causados pela utilização de produtos sintéticos e devido à grande variabilidade de estruturas químicas existentes e por serem teoricamente, mais seguros ao ambiente (TUR et al., 2010; KLEIN, 2015).

Os compostos naturais produzidos por plantas que possuem atividade biológica, são as principais fontes de novas estruturas químicas com potencial para utilização nas indústrias farmacêuticas, alimentícia e agrícola (MACÍAS et al., 2008). Extratos de diversas espécies vegetais apresentam potencial contra fungos fitopatogênicos (PLODPAI et al., 2013; SUKORINI et al., 2013) e já foram testados em diversos trabalhos (ROMERO et al., 2009; DOMINGUES et al., 2011; SILVA et

al., 2012; CRUZ et al., 2013; YUSNAWAN et al., 2015), mostrando seu potencial de controle a partir da inibição do crescimento micelial, germinação de esporos dos fungos, entre outras formas.

Os mecanismos pelos quais os produtos botânicos atuam contra microrganismos são ainda poucos conhecidos. Esses mecanismos dependem da composição dos extratos. Estudos revelam que os principais componentes são os responsáveis pela atividade biológica dos extratos, mas outros concluem que vários componentes atuam em sinergia (PITAROKILI et al., 2003; BAKKALI et al., 2008). Além disso, como os extratos contêm uma mistura de componentes diversos, sua atividade antifúngica provavelmente não é atribuível a um único mecanismo. Os principais mecanismos relatados até agora são a interrupção da membrana, a quelação do metal, a interação com o DNA e a indução de reações de defesa da planta (COWAN, 1999; ARZOO et al., 2012).

Vários estudos relatam que os extratos ou alguns de seus componentes são capazes de perturbar a parede celular e a integridade da membrana e penetrar facilmente nas células (LI et al., 2015; PONTIN et al., 2015). Essa interrupção provoca danos na membrana mitocondrial, o que induz mudanças na cadeia de transporte de elétrons. Conseqüentemente, os radicais livres são produzidos, e eles oxidam e danificam lipídios, proteínas e DNA. Em contato com espécies reativas de oxigênio, os compostos fenólicos são oxidados e liberam radicais de fenoxilo reativos (BAKKALI et al., 2008; ALAM et al., 2014).

#### 2.3.2.1 Fungos Fitopatogênicos – Gênero *Fusarium*

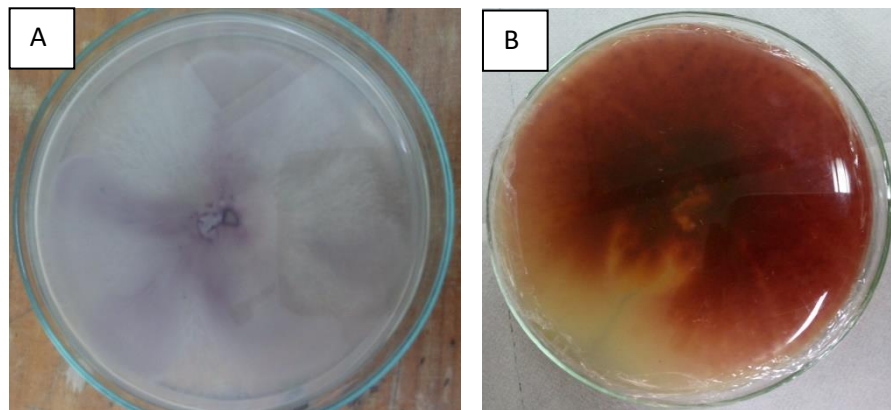
Os fungos constituem um grupo numeroso de organismos, bastante diversificado filogeneticamente e de grande importância ecológica e econômica. Os fungos fitopatogênicos representam uma importante classe, cuja maioria deles tem a capacidade de se desenvolver em diversos tipos de substratos. São agentes causadores de diversos tipos de doenças em vegetais, acarretando perdas significativas na agricultura, destruindo grãos durante a estocagem, diminuindo o valor nutritivo e, algumas vezes, produzindo micotoxinas prejudiciais ao homem e aos animais (KIMATI et al., 2005).

O gênero *Fusarium* pertence ao filo Ascomycota e é inserido dentro do Sub-filo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes (ÍNDIX FUNGORUM, 2016). Doenças

fúngicas causadas pelo gênero *Fusarium* sp. em plantas impedem a produção agrícola em todo o mundo (GULLINO et al., 2015), causando sérios problemas econômicos ocasionados pela sua ação como fitopatógeno, além de sua ampla distribuição geográfica (ETHUR et al., 2008). Os estudos referentes à distribuição populacional de *Fusarium* sp. na maioria das vezes, limitam-se às áreas de cultivo com grandes culturas, como soja e trigo, possivelmente por serem o principal alvo do mercado de agroquímicos (ETHUR et al., 2008). Entretanto, além de infectar as culturas, o gênero *Fusarium* é conhecido por produzir micotoxinas em grãos armazenados (MASHESHWAR et al., 2009).

Esse gênero produz um micélio de aspecto aveludado, com matizes rosadas, vermelhas, violetas ou marrons (Figura 2.5). A maioria das suas espécies é habitante do solo, de ocorrência cosmopolita e consegue sobreviver na ausência do hospedeiro, como saprófita (KIMATI et al., 2005).

Figura 2.5- Aspecto dos Fungos: *Fusarium verticillioides* (A) e *Fusarium oxysporum* (B)



Fonte: autor.

#### 2.3.2.1.1 *Fusarium oxysporum*

O *F. oxysporum* é um dos agentes patogênicos mais importantes do solo que causa doenças de murcha em grande variedade de culturas (HASHEM et al., 2010), causando sérios danos durante a produção e armazenamento (GULLINO et al., 2015). O patógeno tem a capacidade de persistir por períodos muito longos no solo sem hospedeiro (LARENA et al., 2003). As estratégias químicas que envolvem

a utilização de pesticidas sintéticos para o controle de fungos têm agora sido desencorajadas devido a efeitos indesejáveis na saúde do solo, nos seres humanos e nos organismos não visados no ambiente (DE CAL et al., 2009).

Mais de 20 doenças com importância econômica são causadas por essa espécie. Esse patógeno invade as plantas principalmente pelo sistema radicular e coloniza o xilema. Alguns dos sintomas provocados pelas plantas são: murcha, descoloração vascular, clorose, nanismo e morte prematura das plantas (PEREIRA, 2007). *F. oxysporum* é um fungo facultativo ascomiceto e apresenta uma ampla resistência aos agentes antifúngicos vulgarmente utilizados, por conseguinte, é necessário o desenvolvimento de agentes alternativos para seu controle (DANANJAYA et al., 2017).

#### 2.3.2.1.2 *Fusarium verticillioides*

O *F. verticillioides* tem como forma teleomórfica descrita a espécie *Giberella moniliformis*, mas também é pertencente ao complexo de espécies *Giberella fujikuroi*, tendo também outras populações como representantes das espécies *F. subglutinans* e *F. proliferatum* (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Produz hifas aéreas com aspecto algodinoso e coloração esbranquiçada e o verso com coloração que varia de creme ao rosa e violeta (IARC, 2002).

É um importante patógeno fúngico do milho de importância econômica em todo o mundo. No campo é capaz de causar infecção sistêmica da planta do milho, tais como a podridão de sementes, plântulas, raízes, caule (BATTILANI et al., 2011; MASCHIETTO et al., 2016). O processo de infecção por *F. verticillioides* e o acúmulo de micotoxinas são influenciados pelas condições ambientais, também pela resistência do hospedeiro e pela composição bioquímica do grão, incluindo a umidade, estágio de desenvolvimento e composição lipídica (SAGARAM et al., 2006; BATTILANI et al., 2008; WOLOSHUK & SHIM, 2013; MASCHIETTO et al., 2015).

Além de sua capacidade destrutiva, a ocorrência do patógeno é agravada por produzir principalmente as micotoxinas fumonisinas B1, B2 e B3, conhecidas por causarem doenças em animais (JIMENÉZ et al., 2003; DAMBOLENA et al., 2010) e é considerada carcinogênica para o homem (SANTIAGO et al., 2015). A principal abordagem para minimizar danos que podem fornecer pontos de entrada para este patógeno e aumentar a contaminação por micotoxinas é o uso de fungicidas

(MAZZONI et al., 2011). No entanto, existe um interesse significativo e esforço para desenvolver estratégias de controle integrado menos dependentes das medidas de controle químico, especialmente para sistemas de produção sustentáveis e orgânicos (SAMSUDIN et al., 2017).

## 2.4 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

O termo extração significa retirar, da maneira mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contidas na droga vegetal, utilizando, para isso, uma mistura de líquidos tecnologicamente e toxicologicamente apropriados (SANTOS et al., 2013). Antes de executar uma extração, deve-se levar em consideração uma série de fatores que interferem nesta operação, tais como as características do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator (solvente) e a metodologia a ser empregada.

Os extratos vegetais são obtidos de partes de plantas através de diferentes processos de extração, porém a estrutura histológica das diversas partes componentes de uma planta é bastante heterogênea. Existem órgãos, como as raízes e os caules, cujos tecidos estão extraordinariamente compactados (xilema), ao passo que em flores e folhas os tecidos se apresentam com textura mais delicada. Como o poder de penetração dos solventes depende, entre outros fatores, da consistência dos tecidos que formam o material a extrair, é necessário considerar que quanto mais rígido for o material menor deve ser sua granulometria. O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. É graças à seletividade e por consequência a polaridade do solvente que se pode extrair apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade (SIMÕES et al., 2000).

A obtenção de extratos naturais pode ser realizada por processos convencionais com utilização de solventes orgânicos. Processos alternativos de extração têm sido estudados para a obtenção de produtos e matérias-primas com apelo natural e mais adequados, tendo em vista a redução de tempo de processo, melhorias nos rendimentos e na qualidade final do produto (COELHO et al., 2015).

### 2.4.1 Soxhlet

As extrações com solventes orgânicos podem utilizar uma grande variedade de solventes e são comumente aplicadas nas indústrias farmacêuticas, químicas e

obtenção de extratos em geral (REVERCHON et al., 2006). O n-hexano é o solvente comumente mais usado, descrito como um dos mais eficientes (BARREIRA et al., 2014).

O processo de extração Soxhlet é utilizado sobre tudo, para extrair sólidos com solventes voláteis, exigindo o emprego do aparelho Soxhlet (Figura 2.6) (SIMÕES et al., 2000). Essa técnica apresenta vantagens em relação ao alto rendimento, mas a desvantagem desse processo é a necessidade de eliminação do solvente após a extração e o uso de temperaturas muito altas (REVERCHON et al., 2006).

Figura 2.6- Aparelho de extração convencional – Soxhlet



Fonte: autor.

O ideal é que os procedimentos de extração sejam ecologicamente corretos, porém a extração Soxhlet não atende este critério. Este método utiliza solventes perigosos e emite vapores tóxicos, com isso surge a necessidade de tecnologias mais limpas, como a ESC (SAHENA et al., 2009).

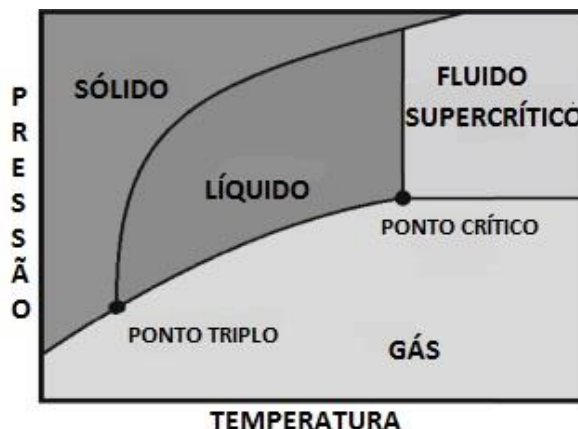
#### **2.4.2 Extração Supercrítica**

Em 1822 o estado supercrítico foi evidenciado pela primeira vez e no ano de 1879, Hannay e Hogarth demonstraram a capacidade dos fluidos supercríticos em dissolver solutos, introduzindo a possibilidade de um novo solvente (HERRERO et

al., 2010; ROMBAUT et al., 2014). No entanto, apenas no início dos anos 1970 que a ESC foi aplicada para processamento de óleos comestíveis e seus compostos (BRUNNER, 2005). As primeiras aplicações desta tecnologia foram com a descafeinação do café e do chá e atualmente tem sido industrialmente utilizada na obtenção de diferentes produtos (MANTELL et al., 2013).

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que se encontra acima de sua temperatura e pressão críticas do solvente (KNEZ et al., 2014). Acima do ponto crítico, deixa de haver tensão superficial e separação entre as fases líquida e gasosa em equilíbrio, formando-se uma única fase supercrítica, cujas propriedades são intermediárias daqueles dois estados. Abaixo do ponto crítico o fluido pode existir como um líquido ou como um vapor (SANDLER, 1989). A condição de fluido supercrítico pode ser visualizada na Figura 2.7.

Figura 2.7- Diagrama de fases em condições de fluido supercrítico



Fonte: Adaptado de KNEZ et al. (2014).

Uma das características do fluido supercrítico é apresentar algumas propriedades dos gases e líquidos ao mesmo tempo. Sua viscosidade e difusividade são semelhantes à dos gases e densidade semelhante à dos líquidos, possuindo também uma tensão superficial mínima, o que facilita a molhabilidade completa de substratos de geometrias complexas. Isto proporciona uma excelente solubilização em matrizes sólidas tornando-o uma ótima ferramenta na área da extração de produtos naturais (SCOPEL, 2013). A Tabela 2.1 apresenta a comparação entre as propriedades físicas dos fluidos supercríticos, dos gases e dos líquidos.



Tabela 2.1- Comparação entre as propriedades de gases, líquidos e fluidos supercríticos

Propriedades físicas	Gás	Fluido supercrítico		Líquido
	(1 atm, 15-30°C)	T <sub>c</sub> , P <sub>c</sub>	T <sub>c</sub> , 4xP <sub>c</sub>	15 - 30 °C
Difusidade (cm <sup>2</sup> /s)	0,1-0,4	0,7x10 <sup>-3</sup>	0,2x10 <sup>-3</sup>	(0,2-2)x10 <sup>-5</sup>
Viscosidade (g/cm.s)	(1-3)x10 <sup>-4</sup>	(1-3)x10 <sup>-4</sup>	(3-9)x10 <sup>-4</sup>	(0,2-3)x10 <sup>-2</sup>
Densidade (g/L)	(0,6-2)x10 <sup>-3</sup>	0,2-0,5	0,4-0,9	0,6-1,6

Fonte: Adaptado de BRUNNER (2005) e TZIA et al. (2003).

Esta alteração do estado de agregação de um gás ou líquido, em função de mudanças na pressão e na temperatura, conduz a uma mudança na sua densidade e no poder de solvatação, alterando o comportamento químico da substância (SARGENTI, 1994).

Para a extração com fluidos supercríticos podem ser utilizados diversos solventes, como o etanol, propano, pentano e n-butano. Porém o mais utilizado tem sido o dióxido de carbono, devido a sua não toxidez em baixas concentrações e não inflamabilidade (BRUNNER, 2005; POULIOT et al., 2014). Convém ressaltar que permite operações supercríticas com pressões relativamente baixas e temperaturas próximas à ambiente (T<sub>c</sub>: 31,1°C; P<sub>c</sub>: 73,8 bar) (REVERCHON & DE MARCO, 2006; POULIOT et al., 2014), o que traz vantagens na extração de compostos sensíveis e conservação de substâncias termolábeis ou facilmente oxidáveis (HERRERO et al., 2010; SILVA, 2014a).

#### 2.4.3 Extração com líquidos pressurizados

Cada vez mais se tem aumentado o interesse em substituir as extrações convencionais por extrações que utilizem condições (pressão e temperatura) mais brandas e que alcancem rendimentos satisfatórios, levando em consideração o rendimento, a eficiência e a qualidade do óleo/extrato extraído (ABAIDE et al., 2017). Assim a extração por fluidos pressurizados tem se mostrado uma alternativa promissora, economicamente viável e ecologicamente vantajosa em diversos processos industriais (RIBAS et al., 2014).

A utilização de n-butano e propano líquido surge como uma alternativa aos processos tradicionais. Quando esses gases são liquefeitos, suas propriedades físico-químicas são ideais (YANG et al., 2004), no entanto, o custo deste solvente é vinte vezes mais elevado quando comparado ao CO<sub>2</sub> supercrítico. Para isso um solvente alternativo seria o GLP comprimido, que contém em sua composição, como substâncias majoritárias, o propano e o n-butano (SILVA et al., 2013; RIBAS et al., 2014; SILVA et al., 2014c).

Como qualquer gás comprimido, o GLP tem a vantagem sobre os solventes orgânicos líquidos de ser facilmente separado do produto final por despressurização do sistema (SOARES et al., 2016a). Quando comparado com o CO<sub>2</sub> supercrítico diversos trabalhos demonstram sua eficiência quanto ao rendimento e tempo de extração (DAL PRÁ et al., 2016; SOARES et al., 2016a; ABAIDE et al., 2017; SALLET et al., 2017). Porém o GLP é altamente inflamável, tóxico, sendo um líquido incolor, assim, a extração com GLP comprimido como solvente requer mais segurança, atenção e controle, quando comparada com o CO<sub>2</sub> (BIER et al., 2016). Apesar das vantagens na utilização do GLP, até o momento, nenhum estudo tem sido relatado na literatura utilizando este solvente na extração de compostos bioativos de *L. albescens*.

## 2.5 ESTUDO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

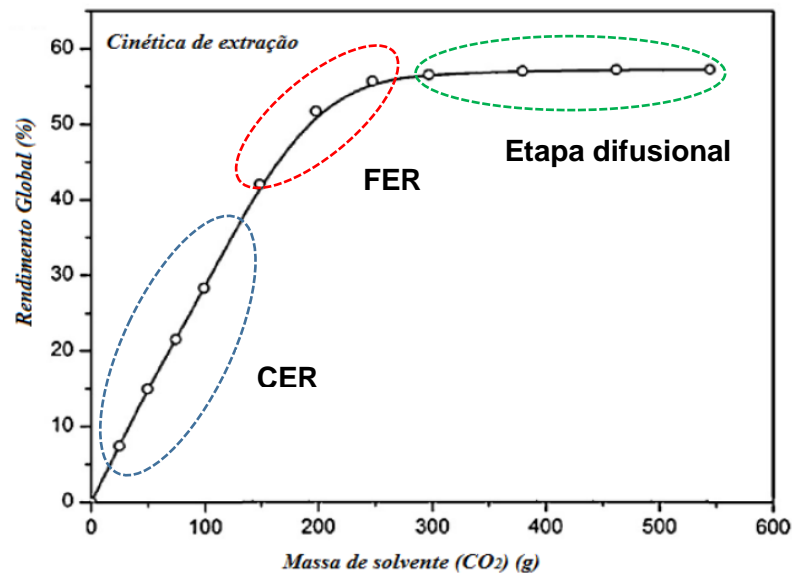
O estudo das curvas cinéticas de extração e o conhecimento das variáveis operacionais permitem respostas importantes que ajudam a definir a ampliação dos processos. As curvas cinéticas são obtidas a partir da plotagem da massa acumulada, ou rendimento em relação ao tempo de extração ou em relação ao consumo de solvente (BARROS et al., 2016).

As curvas de extração podem ser caracterizadas por três períodos (Figura 2.8): taxa de extração constante (CER), período de taxa decrescente de extração (FER) e período difusional (Etapa difusional) (BRUNNER, 2005; PIANTINO et al., 2008; MEZZOMO et al., 2009). Na etapa CER a remoção do extrato ocorre na superfície externa da partícula a uma velocidade aproximadamente constante, por convecção. No período FER ocorre resistência à transferência de massa na interface sólido-fluido devido a falhas do soluto na camada externa da superfície da matriz, iniciando o mecanismo de difusão, que atua combinado com a convecção. A última

etapa da curva é o período onde não há soluto na superfície da partícula sólida, caracterizando a retirada do extrato através do mecanismo de difusão (FERREIRA & Meireles 2002).

As curvas de ESC podem ser utilizadas para determinação de parâmetros como: tempo de processo, caracterização de etapas de extração, determinação de solubilidade e modelagem da transferência de massa do sistema. A modelagem das curvas é importante para se obter informações relacionadas com a pressão, temperatura e vazão do solvente, permitindo a ampliação de escala dos processos de ESC (PERRUT, 2000).

Figura 2.8- Cinética de extração caracterizada por três períodos: CER, FER e Etapa difusional



Fonte: Adaptado de BARROS, et al. (2016).

## 2.6 MODELAGEM MATEMÁTICA

A modelagem das curvas cinéticas pode servir para ajustar curvas experimentais ou mesmo compreender os fenômenos que controlam o processo de ESC (MARTÍNEZ et al., 2003). No entanto tem como principal objetivo definir parâmetros para o desenho dos processos, como as dimensões do equipamento a ser projetado, fluxo do solvente e tamanho de partícula da matriz. Convém ressaltar que vários modelos matemáticos são apresentados na literatura para descrever a EFS, porém um modelo deve ser um instrumento matemático que reflete o comportamento físico da estrutura sólida e as observações experimentais. Desta

forma, pode ser usado como uma ferramenta de simulação para as curvas de cinética de EFS e depois, para aplicações industriais desta tecnologia (MEZZOMO et al., 2009).

Os modelos matemáticos permitem generalizar os resultados experimentais, descrevendo os principais fenômenos de interesse através de uma equação ou um sistema de equações, que posteriormente poderão ser aplicados a condições de trabalho, diferentes daquelas inicialmente pesquisadas, possibilitando assim obter informações necessárias para dimensionamento de uma unidade de extração supercrítica (MOURA, 2004). Em geral, diversos modelos matemáticos têm sido utilizados objetivando a predição de curvas cinéticas de extração e estes normalmente são baseados em equações empíricas ou no balanço diferencial de massa aplicado na coluna de extração (QUISPE-CONDORI, 2005).

Os primeiros trabalhos baseados em modelagem matemática foram realizados por Bulley et al. (1984), este modelo foi baseado em balanços diferenciais e nas leis de conservação de massa para o processo de extração de óleo de canola. Em 1993, Reverchon e colaboradores, a partir da ESC de óleos essenciais de matrizes herbáceas, propuseram um modelo matemático que consistia num balanço diferencial numa partícula esférica, considerando difusão interna. Sovová em 1994 estudando o processo de extração de sementes moídas, foi a primeira tentativa de introduzir uma descrição física do substrato vegetal na modelagem matemática. É importante destacar que cada vez mais há trabalhos desenvolvidos, quanto a modelagem matemática em relação a extração supercrítica (ZABOT et al., 2014; MORAES et al., 2015; SOARES et al., 2016b; ABAIDE et al., 2017; SALLET et al., 2017).

## CAPÍTULO 3- ARTIGO 1

### Extraction and composition of extracts obtained from *Lupinus albus* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas

Accepted: The Journal of Supercritical Fluids – Available online at:  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.006>

#### Abstract

This work presents the extraction yields, kinetic parameters, and composition of extracts obtained from flowers, leaves, stalks, and roots of *Lupinus albus*. Different conditions of pressure and temperature were evaluated using supercritical CO<sub>2</sub> (150, 200 and 250 bar; 40, 50 and 60°C) and compressed liquefied petroleum gas (LPG) (15, 25 and 30 bar; 25, 35 and 45°C). The spline model was used to determine kinetic parameters for the processes. The highest yield obtained was 1.2 wt.% from the flowers using LPG under 15 bar and 25°C. The roots provided the highest composition of stigmaterol (50.8%) and ergosterol (25.6%) in the extracts obtained by LPG. Other compounds were identified, as tetracosanol, pentadecanoic acid and eicosanol. Thus, this work highlights the possibility of using supercritical CO<sub>2</sub> or compressed LPG for obtaining bioactive compounds found in the *Lupinus albus* plant.

**Keywords:** *Lupinus albus*; supercritical CO<sub>2</sub> extraction; compressed LPG extraction; kinetic parameters; bioactive compounds.

#### Introduction

Plants are widely studied as a source of bioactive compounds because of their easy availability and diversity [1]. Active substances found in plant extracts can be used in a variety of products, such as food, cosmetics, medicines and agricultural [2, 3]. The application of active substances increases the interest of several industrial sectors in the exploitation and extraction of extracts from novel species of plants, as well as the interest in the chemical composition and optimization of extractive methods [4].

The genus *Lupinus*, popularly known as lupine, belongs to the family Fabaceae and it is composed of approximately 300 species [5]. Divided into "Old World" and "New World", the plants can be annual or perennial herbaceous and shrub, being able to grow in wide climatic variation and different environmental conditions [6].

Amongst the species that constitute the "New World", *L. albescens* Hook. & Arn is known as native lupine. It is an annual herbaceous plant with erect growth, digitate leaves, fruits in the form of pods and lilac flowers. *L. albescens* plants are native from the northwest region of Argentina, Uruguay, Paraguay and southern Brazil [7]. Due to its ability to grow in sandy soils and to be the first species of lupine to colonize sand banks, studies are directed to its use to fix dunes [8]. However, studies regarding the yields of extract or chemical characterization could not be found in the literature up to now.

Therefore, the extraction of bioactive compounds from *L. albescens* is an interesting gap. The supercritical fluid extraction (SFE) and pressurized liquid extraction (PLE) are promising technologies used to obtain bioactive compounds from natural sources [9, 10]. These techniques have advantages over traditional extractions such as low energy consumption, easy fluid disposal or reuse and extraction of thermolabile compounds [2].

SFE can be considered a green technology because it enables solvent-free extracts [11], which the CO<sub>2</sub> is the most used solvent for the extraction of bioactive compounds from natural matrices. It presents advantages such as non-toxic, non-flammable, and mild working conditions [1]. There are more than 150 SFE plants worldwide with a total extraction volume of vessels more than 500 L, which most of these plants are used for extraction of natural products [12]. PLE process requires lower volumes of solvents and it is faster against traditional techniques [13]. The use of liquefied petroleum gas (LPG) becomes attractive when compared to other liquid solvents because it is cheaper and it is more easily separated from the final product by system depressurization [14], thus assuring the quality and safety of extracts.

Therefore, both techniques (SFE or PLE) using different solvents (CO<sub>2</sub> or LPG) for the extraction of bioactive compounds of *L. albescens* become interesting. Based on this context, the objective of this study was to evaluate the extraction yields, kinetic parameters and chemical composition of extracts obtained from different parts of *L. albescens* using SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Plant material**

The plant material of *L. albescens* was collected from São Francisco de Assis, Rio Grande do Sul, Brazil (S: 29° 43' 23,2"/ W: 053° 43' 03.4"), in a degraded area under natural sandy erosion. Identification of samples was done and deposited in the Herbarium of the Federal University of Santa Maria (UFSM, Brazil) under the certificate number 15.447.

### **2.2 *L. albescens* preparation**

Samples were dried at 40°C until a constant mass was reached. Thereafter, the samples were milled (Marconi, SP, Brazil) and the particles were classified by the Mean Sauter Diameter using the Tyler series. The sizes ranging from 8 mesh to 48 mesh (0.7 to 0.8 mm) were used for subsequent steps. The samples were maintained at -12°C until the extractions.

### **2.3. Solvents and reagents**

CO<sub>2</sub> (purity > 99.5%) was purchased from White Martins S.A. (Santa Maria, Brazil). LPG was purchased from Liquigás S.A. (Santa Maria, Brazil) and consisted of a mixture of propane (50.3 wt.%), n-butane (28.4 wt.%), isobutane (13.7 wt.%), ethane (4.8 wt.%), and other hydrocarbons minor constituents (2.8 wt.%). N-hexane was supplied by Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil).

### **2.4 Soxhlet extraction**

Soxhlet extraction was performed using 1 g of a sample for each plant matrix and 150 mL of n-hexane for 120 min in a Soxhlet apparatus (Marconi, Model MA491/6). At the end of the experimental run, the n-hexane was evaporated and the extracted mass was quantified by the gravimetric method. The assays were performed in triplicate and the responses were expressed as a mean ± standard

deviation. Soxhlet extractions were used as a reference for comparing the yields and compositions obtained by SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG.

## 2.5 Supercritical CO<sub>2</sub> and compressed LPG extractions

The experimental assays were performed in a laboratory scale equipment [15] composed mainly by (i) a 100 mL extraction vessel (stainless steel) with internal diameter of 2.5 cm and 19.5 cm of height, supporting up to 35 MPa; (ii) a syringe pump (ISCO 500 D, Lincoln, USA); (iii) an ultrathermostatic cooling bath (Quimis, São Paulo, Brazil) for controlling the temperatures of CO<sub>2</sub> and LPG at the syringe pump; (iv) an ultrathermostatic heating bath (Quimis, São Paulo, Brazil) with thermocouples; (v) a heating electric jacket to control the temperature inside the extraction vessel; (vi) blocking valves and micrometering valves (HIP 15-11AF2 316SS, Erie, USA); and (vii) 1/8 inch tubing of stainless steel (HIP, Erie, USA).

For the extraction procedures with CO<sub>2</sub> and LPG, approximately 10 g of the samples (dried and milled) were loaded in the extraction vessel. In the sequence, the solvent (CO<sub>2</sub> or LPG) was pumped in the bed and the condition of pressure and temperature was established (after 20 min). Subsequently, the micrometric valve was opened at a constant CO<sub>2</sub> or LPG flow rate to collect the extract in the collection vials. The extraction time for each matrix was fixed after evaluating the extraction curve obtained in preliminary tests. The flow rate of LPG and CO<sub>2</sub> used in all assays was 4 g/min. During the kinetic extraction curves using supercritical CO<sub>2</sub>, the extract was collected at equal intervals of 15 min, while for the compressed LPG the interval was 2 min. The curves were constructed for all matrices in different experimental conditions in order to determine the yield of extract as a function of time using the following equation:

$$Yield(wt.%) = \frac{\text{mass of extract (g)}}{\text{initial dry mass of the matrix (g)}} \cdot 100 \quad (1)$$

The influence of temperature and pressure on the extraction yields and chemical composition was evaluated. Assays were performed using the factorial experimental design with triplicate at the central point. For the experimental assays carried out with CO<sub>2</sub>, the extractions were performed at the temperatures of 40, 50, and 60°C, and the pressures of 150, 200 and 250 bar. The density of the fluid ( $\rho$ )



was obtained from the Chemistry WebBook – National Institute of Standards and Technology (NIST) [16]. For the experimental assays carried out with LPG, the extractions were performed at 25, 35 and 45°C, and at 15, 25 and 35 bar.

The effect of the independent variables on the overall yield obtained by SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG was analyzed separately by analysis of variance (ANOVA), at 5% uncertainty level, using STATISTICA 8.0<sup>®</sup> (Statsoft Inc., USA). The Tukey test was applied to determine the significant differences among the yields.

## 2.6. Kinetic extraction curves

The experimental data were fitted to a spline model with 3 straight lines [17] using SAS 9.2<sup>®</sup>:

$$1) \quad \text{For } t \leq t_{CER} :$$

$$Yield(t) = b_1 \cdot t \tag{2}$$

$$2) \quad \text{For } t_{CER} < t \leq t_{FER} :$$

$$Yield(t) = (b_1 + b_2) \cdot t - b_2 \cdot t_{CER} \tag{3}$$

$$3) \quad \text{For } t > t_{FER} :$$

$$Yield(t) = (b_1 + b_2 + b_3) \cdot t - b_2 \cdot t_{CER} - b_3 \cdot t_{FER} \tag{4}$$

Where:  $b_1$  is the slope of line 1;  $b_1 + b_2$  is the slope of line 2;  $b_1 + b_2 + b_3$  is the slope of line 3;  $t$  is the extraction time;  $t_{CER}$  is the end of the constant extraction rate (CER) period;  $t_{FER}$  is the end of the falling extraction rate (FER) period;  $Yield(t)$  is the yield of extract as a function of time.

From the spline fitting, five derived quantities were obtained: 1) the end of the CER period ( $t_{CER}$ ); 2) the end of the FER period ( $t_{FER}$ ); 3) the mass transfer rate for the CER period ( $M_{CER}$ ); 4) the yield for the CER period ( $R_{CER}$ ); and 5) the mass ratio of solute in the fluid phase at the extraction vessel outlet for the CER period ( $Y_{CER}$ ).

## 2.7 Chemical characterization by gas chromatography

The samples were analyzed in a GC-Q/MS system. The autosampler was an AOC-20is series injector (Shimadzu), the gas chromatograph was a GC-2010 Plus

(Shimadzu) and the mass spectrometer was a GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu). The column was a 30 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary column coated with 0.25 µm Rtx-5MS (Restek). Helium was the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The injector temperature was maintained at 300°C. A volume of 1 µL of each sample was injected with a 1:30 split ratio. The oven temperature program used was of 200°C (hold 5 min), then 15°C/min from 200°C to 280°C (hold 1 min), then 5°C/min from 280 to 300°C (hold 10 min). The interface temperature was held at 320°C and the ion source temperature at 260°C. Mass spectra were recorded over 35-650 amu range at 0.30 scan/s, with an ionization energy of 70 eV. Identification of individual components was done using their relative retention indices with the Wiley Registry of Mass Spectral Data (Palisade Corporation, Newfield, NY).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Extraction yields

Extraction yields obtained by Soxhlet, SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG from flowers, leaves, roots and stalks of *L. albescens* matrices are presented in Table 1. The highest yield was obtained by Soxhlet extraction, in descending order for flowers (2.24 wt%), leaves (1.79 wt%), roots (0.28 wt%) and stalks (0.20 wt%).

The highest yield using supercritical CO<sub>2</sub> was 0.8 wt.% for the flowers. All matrices of *L. albescens* presented similar behaviors regarding the yields under SFE-CO<sub>2</sub>, where the highest yields were found in assay 4 with conditions of higher temperature and pressure (60°C - 250 bar). Otherwise, the smaller ones were found in assay 3 with higher temperature and lower pressure (60°C - 150 bar). According to Dal Prá et al. [18], higher temperatures favor the extraction yields of vegetal extracts because the influence of the vapor pressure overlaps the influence of the solvent density, which consequently increases the solubility of extracts in supercritical CO<sub>2</sub>. Furthermore, increasing the pressure improves the solvation power of the solvent, providing a higher and better permeability of the solvent into the solid matrix. Consequently, increasing the pressure increases the solubility of solutes.

Regarding the PLE-LPG, the highest extraction yields were obtained from the flowers (1.2 wt.%) and leaves (1.0 wt.%) under conditions of 25°C - 15 bar and 35°C - 25 bar, respectively. Otherwise, for the stalks (0.02 wt.%) and roots (0.025 wt%),

the extraction yields were lower when compared with the extractions using SFE-CO<sub>2</sub> at 45°C - 35 bar and 25°C - 15 bar, respectively.

Even though low yields are reached in some cases, some pressurized fluids have been reported in the extraction of phytochemicals from vegetal matrices. For example, pressurized n-butane was applied to andiroba (*Carapa guianensis*) seeds. The amount of extract obtained in that study was 18 wt.% for the lowest temperature and pressure (25°C - 7 bar) evaluated during an extraction period of 45 min [19]. Likewise, the extraction of compounds from litchi (*Litchi chinensis Sonn.*) and oat (*Avena sativa L.*) seeds using pressurized n-butane was investigated. The highest extraction yield was 3.53 wt.% [20].

In this work, based on ANOVA analysis for SFE-CO<sub>2</sub>, the main effect of temperature and pressure, as well as their interactions, were significant on the yields. When analyzing the assays for each solvent or the assays between solvents through the Tukey's test, some statistical differences (p-value < 0.05) were observed (Table 1). It indicates that the process variables influenced on most the responses, except for flowers, where the highest yield does not differ statistically from the others (as the centralpoint).

**Table 1.** Comparison of extraction yields obtained from *Lupinus albus* using SFE-CO<sub>2</sub>, PLE-LPG, and Soxhlet

Assay	T (°C)	P (bar)	ρ (kg/m <sup>3</sup> )	Yield (wt.%)			
				Flowers	Leaves	Roots	Stalks
<b>Supercritical CO<sub>2</sub></b>							
1	(-1) 40	(-1) 150	750.501	0.40 ± 0.02 <sup>d, D, E</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>b, C</sup>	0.14 ± < 0.01 <sup>d, F</sup>	0.18 ± < 0.01 <sup>d, G, H</sup>
2	(-1) 40	(+1) 250	887.534	0.49 ± 0.01 <sup>c, C</sup>	0.49 ± 0.01 <sup>d, F</sup>	0.24 ± < 0.01 <sup>b, B</sup>	0.28 ± < 0.01 <sup>b, B</sup>
3	(+1) 60	(-1) 150	565.509	0.33 ± 0.02 <sup>b, E</sup>	0.34 ± < 0.01 <sup>c, D</sup>	0.10 ± < 0.01 <sup>e, E</sup>	0.14 ± < 0.01 <sup>e, D, E</sup>
4	(+1) 60	(+1) 250	776.880	0.81 ± 0.20 <sup>a, F, G</sup>	0.64 ± 0.01 <sup>a, B</sup>	0.34 ± < 0.01 <sup>a, A</sup>	0.40 ± < 0.01 <sup>a, A</sup>
5	(0) 50	(0) 200	765.942	0.49 ± 0.02 <sup>c, d, C, D</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>d, F</sup>	0.19 ± < 0.01 <sup>c, C</sup>	0.21 ± < 0.01 <sup>c, F, G</sup>
6	(0) 50	(0) 200	765.942	0.43 ± 0.02 <sup>c, d, C, D</sup>	0.51 ± 0.03 <sup>d, F</sup>	0.19 ± < 0.01 <sup>c, C</sup>	0.21 ± < 0.01 <sup>c, F, G</sup>
7	(0) 50	(0) 200	765.942	0.46 ± 0.02 <sup>c, d, C, D</sup>	0.55 ± 0.03 <sup>d, F</sup>	0.19 ± < 0.01 <sup>c, C</sup>	0.20 ± < 0.01 <sup>c, F, G</sup>
<b>Compressed LPG</b>							
1	(-1) 25	(-1) 15	Nd	1.18 ± 0.02 <sup>a, A</sup>	0.80 ± < 0.01 <sup>c, G</sup>	0.12 ± < 0.01 <sup>b, c, D, E, F</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>c, C</sup>
2	(-1) 25	(+1) 35	Nd	1.07 ± 0.02 <sup>b, B</sup>	0.75 ± 0.01 <sup>b, E</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>b, F</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>c, d, F, G, H</sup>
3	(+1) 45	(-1) 15	Nd	0.77 ± 0.02 <sup>d, G</sup>	0.79 ± < 0.01 <sup>c, G</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>c, D, E</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>a, E</sup>
4	(+1) 45	(+1) 35	Nd	0.85 ± 0.02 <sup>c, F</sup>	0.78 ± 0.01 <sup>a, A</sup>	0.19 ± < 0.01 <sup>a, C</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>d, D, H</sup>
5	(0) 35	(0) 25	Nd	0.83 ± 0.01 <sup>c, d, F, G</sup>	0.80 ± 0.01 <sup>c, G, E</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>b, c, D, F</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>c, b, F</sup>
6	(0) 35	(0) 25	Nd	0.84 ± 0.01 <sup>c, d, F, G</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>c, G, E</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b, c, D, F</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>c, b, F</sup>
7	(0) 35	(0) 25	Nd	0.81 ± 0.01 <sup>c, d, F, G</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>c, G, E</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>b, c, D, F</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>c, b, F</sup>
<b>Soxhlet</b>							
8	Nd	Nd	Nd	2.24 ± 0.224	1.79 ± 0.118	0.20 ± 0.007	0.28 ± 0.007

T: temperature; P: pressure; ρ: density; Nd: not determined.

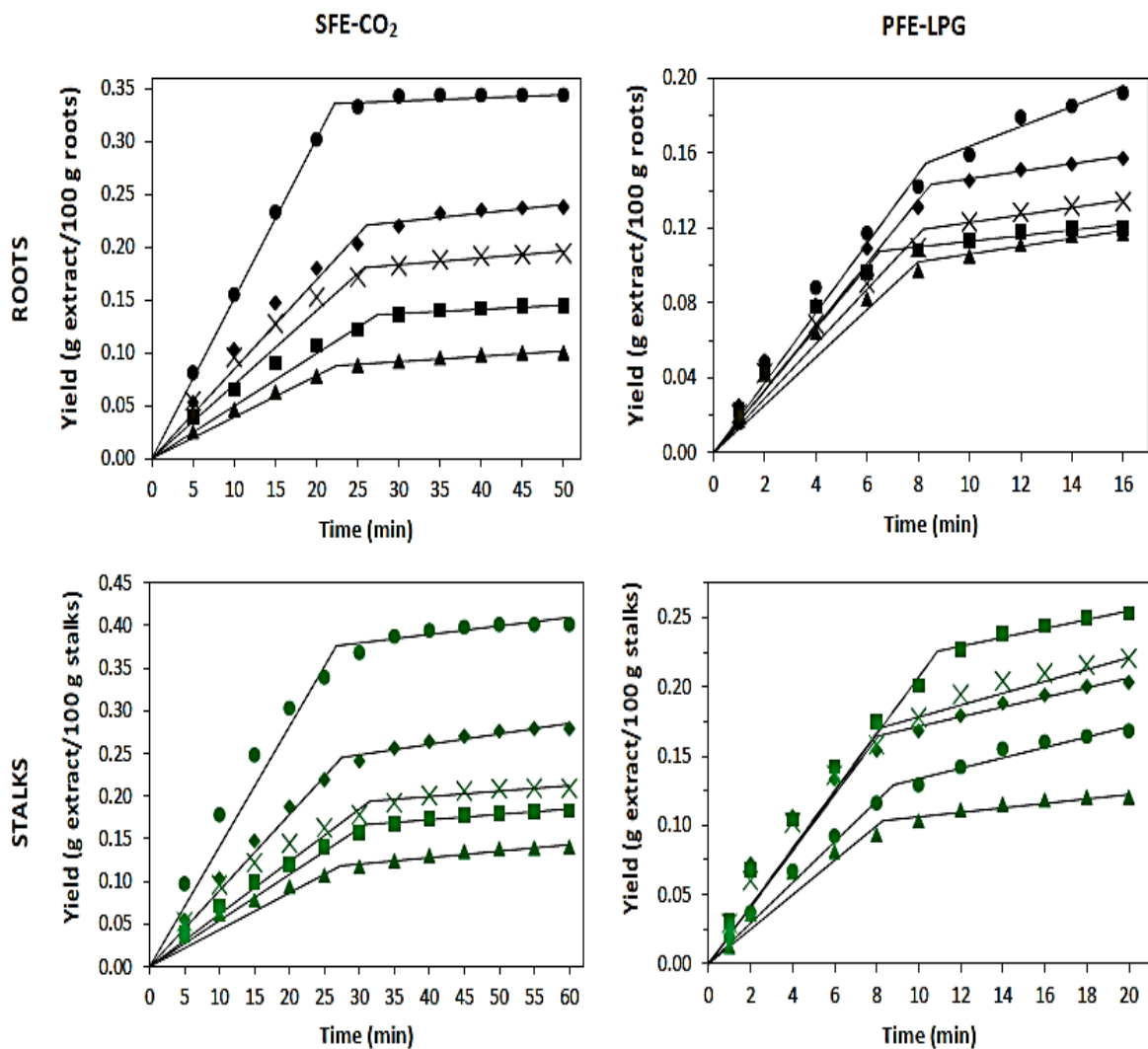
a–e Different letters in the same column represent a significant difference at 95% ( $p < 0.05$  - Tukey test) among the assays for each solvent.

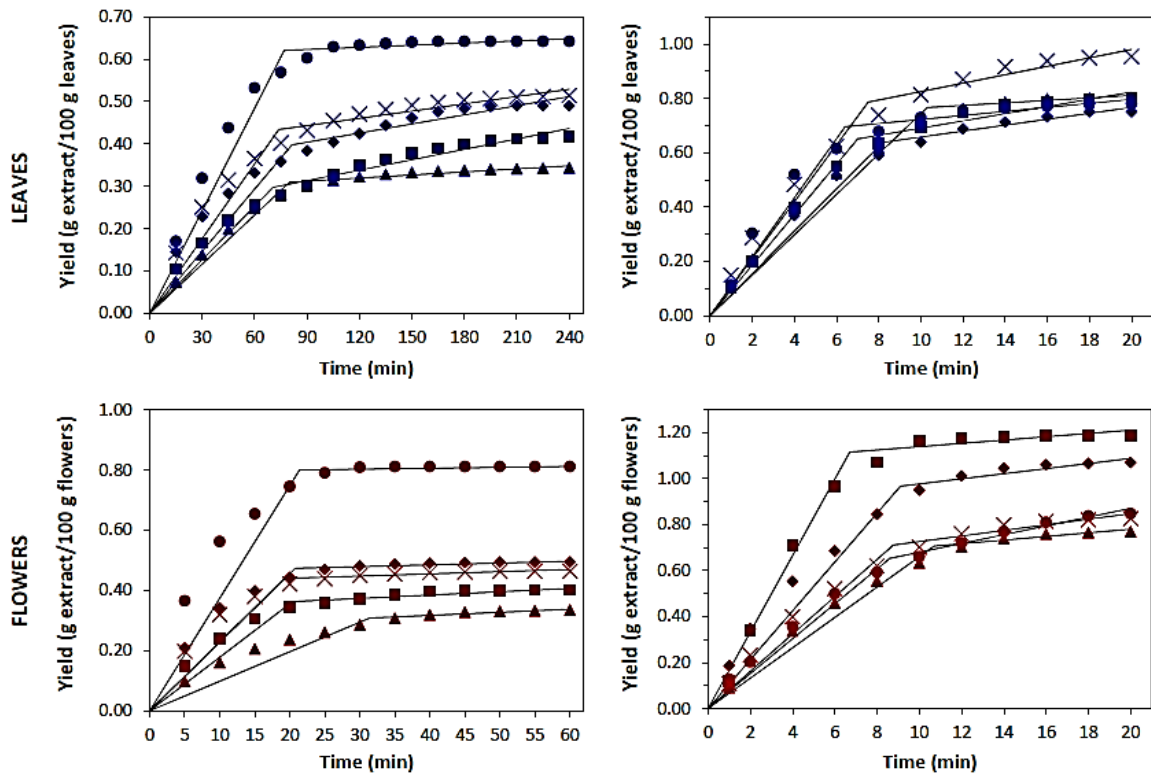
A-G Different letters in the same column represent a significant difference at 95% ( $p < 0.05$ —Tukey test) among the assays between both solvents.

### 3.2. Extraction curves

Kinetic curves for the extraction of *L. albescens* matrices by SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG are presented in Fig. 1. The curves were constructed by the cumulative mass of extract from *L. albescens* as a function of extraction time or solvent mass to feed mass ratio (S/F). The objective was the evaluation of the behavior of extractions over time.

**Fig. 1.** Kinetic yields of extracts obtained from *Lupinus albescens* by SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG: experimental data and fitted curves using the spline model; assay 1 (■); assay 2 (◆); assay 3 (▲); assay 4 (●); average of assays 5, 6 and 7 (×); fitted line (—)





The behavior of the extractions is typical of two distinguished periods: the first one means the higher extraction rate and the second one means the smaller extraction rate. The highest percentage of the extract obtained is in the first period for both matrices and solvents, differentiating them only as a function of time. For the leaves, the first stage occurred in the range from 4 to 6 min with compressed LPG and from 35 to 55 min with supercritical CO<sub>2</sub>. For the flowers, the first stage occurred from 3 to 5 min for LPG and from 6 to 12 min for CO<sub>2</sub>. For the stalks, it succeeded from 4 to 7 min for LPG and from 8 to 12 min for CO<sub>2</sub>. For the roots, it succeeded from 3 to 5 min for LPG and from 12 to 20 min for CO<sub>2</sub>. However, in the diffusional period, the increase in the yields is slow over the processing time. Therefore, it is preferable to work in the CER period, sometimes extending to the falling extraction rate (FER) period when the bulk extract is sought, where the highest yields might be obtained [10, 21].

It can be noticed that the extraction time using compressed LPG was considerably lower for both matrices when compared to the supercritical CO<sub>2</sub>. It represents an important factor in the energy expended in the process, where the energy required for the recompression of LPG is lower than that required for CO<sub>2</sub>

[18]. Consequently, it is important for the economic variability of the extraction processes [21, 22]. Sallet et al. [15] reported that extract obtained from a filamentous fungus (*Mortierella isabellina*) was extracted in larger amount when using compressed LPG. Furthermore, Ribas et al. [23] obtained satisfactory yields of candeia oil when using propane as solvent (one of the main constituents of LPG) in the extractions. Regarding this work (Fig. 1), approximately 95 wt.% of the whole extract obtained from flowers using compressed LPG was extracted in the first 8 min for a flow rate of 4 g/min (S/F = 5), which indicates a fast experimental run.

When comparing different parts of *L. albescens*, most of the extracts obtained by SFE-CO<sub>2</sub> or PLE-LPG was found in the leaves and flowers (Fig. 1). The flowers contributed with approximately 6 times higher extract than the roots. These differences can be attributed to the diversified compositions of extracts, especially related to the sterols, vitamins and fatty acids. The structure of each part also influenced the behavior of each kinetic curve. For instance, the inclination of the curves in the first stage of extraction was more pronounced when using the leaves and flowers. Then, for having a quantitative description of the kinetic curves, kinetic parameters were evaluated.

### 3.3. Kinetic parameters

Kinetic curves are important answers to other decisions involving the scale up of processes. One of the approaches that could be applied to analyze the extraction curves is to describe these curves by a simple and usable spline model. To obtain the kinetic parameters, several studies dealing with the extraction of target compounds from plant sources have been reported [24-27]. In this sense, the kinetic parameters for the  $t_{CER}$  period obtained for each experimental assay from the flowers, leaves, roots and stalks are reported in Table 2. Fitting of kinetic parameters in the CER period is common because  $M_{CER}$  is constant and the productivity of process is high, that usually influences the costs of the extract [28].

**Table 2.** Extraction of bioactive compounds from *L. albescens* by SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG: kinetic parameters

Assay		t <sub>CER</sub> (min)	t <sub>FER</sub> (min)	R <sub>CER</sub> (wt.%)	M <sub>CER</sub> × 10 <sup>3</sup> (g/min)	M <sub>Sol.CER</sub> (g)	S/F <sub>CER</sub> (g solvent/g raw material)	Y <sub>CER</sub> × 10 <sup>3</sup> (g extract/g sol.)
<b>FLOWERS</b>								
<b>Supercritical CO<sub>2</sub></b>								
1	40°C – 150 bar	10.9	22.6	0.27	2.49	43.6	4.4	0.62
2	40°C – 250 bar	10.3	26.5	0.37	3.56	41.2	4.1	0.89
3	60°C – 150 bar	11.4	36.8	0.19	1.67	45.6	4.6	0.42
4	60°C – 250 bar	7.0	23.0	0.51	7.30	28.0	2.8	1.83
5	50°C – 200 bar	10.2	22.2	0.38	3.73	40.8	4.1	0.93
6	50°C – 200 bar	7.1	21.9	0.27	3.82	28.4	2.8	0.96
7	50°C – 200 bar	10.5	23.3	0.33	3.13	42.0	4.2	0.78
<b>Compressed LPG</b>								
1	25°C – 15 bar	5.1	7.7	0.88	17.29	20.4	2.0	4.32
2	25°C – 35 bar	2.5	9.9	0.44	17.64	10.0	1.0	4.41
3	45°C – 15 bar	2.7	9.9	0.27	10.04	10.8	1.1	2.51
4	45°C – 35 bar	4.7	9.8	0.44	9.32	18.8	1.9	2.33
5	35°C – 25 bar	3.5	11.1	0.32	9.08	14.0	1.4	2.27
6	35°C – 25 bar	2.4	9.3	0.34	14.34	9.6	1.0	3.59
7	35°C – 25 bar	4.5	11.5	0.48	10.64	18.0	1.8	2.66



Table 2. (Continued)

Assay		$t_{CER}$ (min)	$t_{FER}$ (min)	$R_{CER}$ (wt.%)	$M_{CER} \times 10^3$ (g/min)	$M_{Sol.CER}$ (g)	$S/F_{CER}$ (g solvent/g raw material)	$Y_{CER} \times 10^3$ (g extract/g sol.)
<b>LEAVES</b>								
<b>Supercritical CO<sub>2</sub></b>								
1	40°C – 150 bar	37.6	150.6	0.22	0.58	150.4	15.0	0.15
2	40°C – 250 bar	35.9	154.3	0.29	0.80	143.6	14.4	0.20
3	60°C – 150 bar	52.6	98.3	0.24	0.45	210.4	21.0	0.11
4	60°C – 250 bar	51.0	106.7	0.52	1.01	204.0	20.4	0.25
5	50°C – 200 bar	49.4	123.1	0.34	0.68	197.6	19.8	0.17
6	50°C – 200 bar	45.1	123.8	0.34	0.76	180.4	18.0	0.19
7	50°C – 200 bar	32.9	110.3	0.32	0.96	131.6	13.2	0.24
<b>Compressed LPG</b>								
1	25°C – 15 bar	6.1	12.8	0.58	9.45	24.4	2.4	2.36
2	25°C – 35 bar	6.1	12.9	0.54	8.89	24.4	2.4	2.22
3	45°C – 15 bar	4.5	11.4	0.46	10.22	18.0	1.8	2.56
4	45°C – 35 bar	4.6	12.6	0.61	13.31	18.4	1.8	3.33
5	35°C – 25 bar	3.0	12.1	0.49	16.26	12.0	1.2	4.07
6	35°C – 25 bar	7.2	13.5	0.93	12.91	28.8	2.9	3.23
7	35°C – 25 bar	2.7	12.7	0.38	14.14	10.8	1.1	3.54

Table 2. (Continued)

Assay		$t_{CER}$ (min)	$t_{FER}$ (min)	$R_{CER}$ (wt.%)	$M_{CER} \times 10^3$ (g/min)	$M_{Sol.CER}$ (g)	$S/F_{CER}$ (g solvent/g raw material)	$Y_{CER} \times 10^3$ (g extract/g sol)
<b>ROOTS</b>								
<b>Supercritical CO<sub>2</sub></b>								
1	40°C – 150 bar	12.1	30.8	0.08	0.68	48.4	4.8	0.17
2	40°C – 250 bar	16.8	32.6	0.17	1.00	67.2	6.7	0.25
3	60°C – 150 bar	16.0	26.7	0.07	0.44	64.0	6.4	0.11
4	60°C – 250 bar	21.2	30.5	0.32	1.53	84.8	8.5	0.38
5	50°C – 200 bar	15.7	29.8	0.15	0.93	62.8	6.3	0.23
6	50°C – 200 bar	10.7	26.8	0.10	0.90	42.8	4.3	0.22
7	50°C – 200 bar	11.1	27.5	0.12	1.05	44.4	4.4	0.26
<b>Compressed LPG</b>								
1	25°C – 15 bar	4.5	10.8	0.09	2.01	18.0	1.8	0.50
2	25°C – 35 bar	4.3	9.2	0.09	2.09	17.2	1.7	0.52
3	45°C – 15 bar	4.3	10.6	0.07	1.70	17.2	1.7	0.43
4	45°C – 35 bar	4.8	11.7	0.11	2.21	19.2	1.9	0.55
5	35°C – 25 bar	2.3	9.5	0.06	2.44	9.2	0.9	0.61
6	35°C – 25 bar	2.8	8.7	0.06	2.02	11.2	1.1	0.51
7	35°C – 25 bar	4.9	10.5	0.09	1.76	19.6	2.0	0.44

Table 2. (Continued)

Assay		$t_{CER}$ (min)	$t_{FER}$ (min)	$R_{CER}$ (wt.%)	$M_{CER} \times 10^3$ (g/min)	$M_{Sol.CER}$ (g)	$S/F_{CER}$ (g solvent/g raw material)	$Y_{CER} \times 10^3$ (g extract/g sol.)
<b>STALKS</b>								
<b>Supercritical CO<sub>2</sub></b>								
1	40°C – 150 bar	12.3	32.4	0.09	0.73	49.2	4.9	0.18
2	40°C – 250 bar	16.3	29.4	0.16	1.00	65.2	6.5	0.25
3	60°C – 150 bar	8.1	31.8	0.06	0.72	32.4	3.2	0.18
4	60°C – 250 bar	12.7	28.9	0.23	1.81	50.8	5.1	0.45
5	50°C – 200 bar	8.5	29.3	0.10	1.12	34.0	3.4	0.28
6	50°C – 200 bar	8.9	29.9	0.09	1.04	35.6	3.6	0.26
7	50°C – 200 bar	8.7	30.0	0.09	1.00	34.8	3.5	0.25
<b>Compressed LPG</b>								
1	25°C – 15 bar	4.4	12.4	0.12	2.78	17.6	1.8	0.70
2	25°C – 35 bar	6.1	9.4	0.13	2.17	24.4	2.4	0.54
3	45°C – 15 bar	7.0	10.0	0.09	1.30	28.0	2.8	0.33
4	45°C – 35 bar	6.7	14.2	0.11	1.60	26.8	2.7	0.40
5	35°C – 25 bar	11.5	14.0	0.19	1.61	46.0	4.6	0.40
6	35°C – 25 bar	8.2	13.0	0.18	2.20	32.8	3.3	0.55
7	35°C – 25 bar	8.2	10.8	0.17	2.07	32.8	3.3	0.52

CER; Constant Extraction Rate;  $t_{CER}$ : end of the CER period;  $t_{FER}$ : end of the FER period;  $R_{CER}$ : yield of extract for the CER period;  $M_{CER}$ : mass transfer rate for the CER period;  $M_{Sol.CER}$ : mass of solvent used in the CER period;  $S/F_{CER}$ : solvent to feed mass ratio in the CER period;  $Y_{CER}$ : mass ratio of solute in the fluid phase at the extraction vessel outlet for the CER period; sol.: solvent.

For all matrices, there were remarkable differences of  $t_{\text{CER}}$  between the solvents. It is mostly like associated with the higher capacity of LPG in the solubilization of extracts from *L. albescens*. It is possible to find reports in the literature that corroborate the findings shown in this work. For instance, as disclosed by Skerget et al. [29], solubilities of  $\alpha$ -tocopherol in propane (the major component of LPG) were approximately up to ten times higher than in  $\text{CO}_2$ . Solubilities of  $\alpha$ -tocopherol were from 38.9 to 171.9 mg/g propane and from 0.2 to 17.0 mg/g  $\text{CO}_2$ . Furthermore, the mass ratio of several solutes in the fluid phase at the extraction vessel outlet for the CER period was larger in LPG than  $\text{CO}_2$  in other reports [9, 14, 15].

When using supercritical  $\text{CO}_2$  and compressed LPG for the leaves, the  $t_{\text{CER}}$  ranged from 32.9 to 52.6 min and from 2.7 to 7.2 min, respectively. For the other matrices, the  $t_{\text{CER}}$  was lower, which is an interesting result. For the flowers, variations from 7.0 to 11.4 min (SFE- $\text{CO}_2$ ) and from 2.4 to 5.1 min (PLE-LPG) were observed for this parameter. The  $t_{\text{CER}}$  in the roots ranged from 10.7 to 21.2 min (SFE- $\text{CO}_2$ ) and from 2.3 to 4.9 min (PLE-LPG), and for the stalks, it ranged from 8.1 to 16.3 min (SFE- $\text{CO}_2$ ) and from 4.4 to 11.5 min (PLE-LPG). At the central point, the  $t_{\text{CER}}$  also differed among the different matrices (Table 2). Considering the three replicates, the extraction of compounds from the flowers in the mean  $t_{\text{CER}}$  period was  $9.3 \pm 1.9$  min and  $3.5 \pm 1.1$  min for SFE- $\text{CO}_2$  and PLE-LPG, respectively. Furthermore, the deviation of the spline model from experimental data was relatively low, as presented in Table 3.

In addition, the kinetic curves can be evaluated quantitatively in terms of  $M_{\text{CER}}$ . If the slope of the line in the first extraction period is increased, the  $M_{\text{CER}}$  is also increased. Consequently, the higher the  $R_{\text{CER}}$  and the lower the  $t_{\text{CER}}$ , the higher is the  $M_{\text{CER}}$  [15]. The flowers provided the highest yields, also including the first stage of extraction. Consequently, the  $M_{\text{CER}}$  was more pronounced for this matrix. For the flowers, this parameter ranged from  $1.67 \times 10^{-3}$  to  $7.30 \times 10^{-3}$  g/min and from  $9.08 \times 10^{-3}$  to  $17.64 \times 10^{-3}$  g/min when supercritical  $\text{CO}_2$  or compressed LPG was used, respectively. In the literature [9, 27], values of  $M_{\text{CER}}$  in similar scales are similar to those presented in this work.

The evaluation of the kinetic parameter  $Y_{\text{CER}}$  is also important because it means the amount of extract solubilized in the solvent. If  $Y_{\text{CER}}$  is high, it means that a large amount of solute has been reached by the solvent. In the extraction of

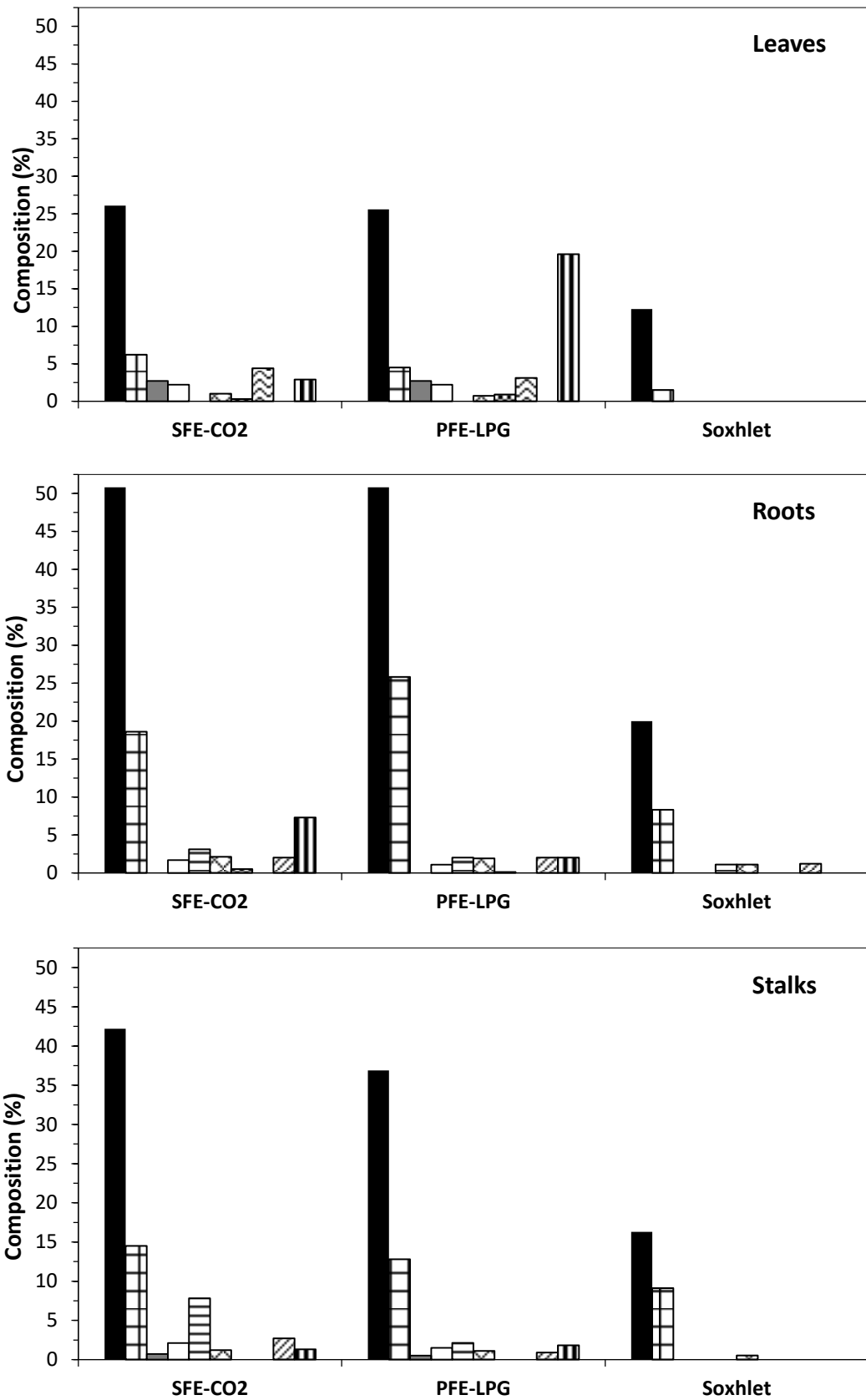
compounds from *L. albescens*, this parameter ranged depending on each matrix (Table 2). In the same trend, the flowers presented the highest values. In such matrix, the  $Y_{CER}$  ranged from  $0.42 \times 10^{-3}$  to  $1.83 \times 10^{-3}$  g/g CO<sub>2</sub> and from  $2.27 \times 10^{-3}$  to  $4.41 \times 10^{-3}$  g/g LPG. The remarkable difference that could be distinguished is the higher  $Y_{CER}$  for all the matrices when using compressed LPG, regardless the experimental condition. Overall, this kinetic parameter was approximately 3-5 times higher if LPG was used. The solubilization of compounds was favored as a function of the characteristics of the solvent. This parameter is rather dependent on the matrix structure. For easily accessible solutes, it can be a large value [30], while for solutes that undergo a long extraction period it can be a small value [11].

Regarding the  $S/F_{CER}$ , it was approximately 2-4 times lower if LPG was used. This behavior was expected because  $S/F_{CER}$  is associated with  $t_{CER}$ ,  $M_{CER}$  and  $M_{Sol.CER}$  (mass of solvent used in the CER period). In a broad evaluation, if the extracts are obtained faster, the extraction time in the first stage is reduced and, consequently, the consumption of solvent is also reduced. This information is important in the economic viewpoint because higher consumption of solvent means higher expenditures for the manufacturer. For the flowers, the  $S/F_{CER}$  did not exceed 2.0 g LPG/g flowers, which is in accordance with other consumptions reported elsewhere [10, 15].

**Table 3.** Correlation of data predicted by the spline model with the experimental data for the extraction of compounds from *Lupinus albescens*

Solvent	Assay	Roots	Stalks	Leaves	Flowers
		R <sup>2</sup>			
CO <sub>2</sub>	1	0.980	0.967	0.957	0.987
	2	0.978	0.972	0.958	0.978
	3	0.993	0.975	0.977	0.964
	4	0.996	0.981	0.986	0.987
	5	0.991	0.963	0.983	0.976
	6	0.988	0.966	0.973	0.986
	7	0.959	0.952	0.967	0.992





Almost all the identified compounds were found in all the morphological parts studied. However, the percentage is different for some of them. The major compound

for both solvents and all matrices was stigmasterol, highlighting the root matrix where it represents around 50% of the total peak area. This compound was also identified by Silva et al. [31] in extractions from different matrices (flowers, leaves, roots, and stalks) of *Eichhornia crassipes*, displaying high concentrations in weight. Fernandes et al. [32] identified this compound through a phytochemical characterization of extracts from *Ilex paraguariensis* fruits obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and compressed propane extractions. The stigmasterol is a focus of study and it is reported elsewhere because it is considered a phytochemical with anti-inflammatory action and antioxidant activity [33]. It is used as input in several chemical processes to produce synthetic and semisynthetic compounds for the pharmaceutical industry [34].

Another aspect to be highlighted regards to the highest yields and target compounds. The results presented (Fig. 2) mean the areas for the assays that displayed the highest yields of extracts (Table 1). When comparing the solvents (CO<sub>2</sub> or LPG), only for the roots and stalks the findings of composition were in the same trend regarding the yields and composition. According to Capeletto et al. [35], it may be thought at first glance that the higher extraction yield the more interesting the process becomes in an extraction plant. However, if the extract associated to the highest yield results in a decreased biological activity (or weak composition of bioactive compounds), it means that the target compounds are not being extracted in an efficient manner. Interfering compounds or inhibitors can be extracted by a large amount, thus reducing the extract's quality.

When comparing the extension of the columns (Fig. 2), it is evident that the supercritical CO<sub>2</sub> or compressed LPG overcame the conventional Soxhlet extraction method. Although Soxhlet technique can provide higher yields, the bulk extract can be contaminated with undesired compounds, as supposed cellulose or its derivatives, thus influencing on the identification of bioactive compounds. For example, in the extracts obtained from the leaves using n-hexane (Soxhlet), only two compounds were identified: stigmasterol (12.9%) and ergosterol (1.5%). Otherwise, in the extracts obtained from the roots using LPG, stigmasterol (50.8%), ergosterol (25.8%), tetracosanol (2.0%), pentadecanoic acid (2.0%), epiergostanol (2.0%), eicosanol (1.9%), methyl commate (1.1%) and octadecanoic acid (0.1%) were identified. For the CO<sub>2</sub> the behavior was almost similar. This observation suggests that SFE-CO<sub>2</sub> or PLE-LPG are efficient for the extraction of bioactive compounds.



However, other undesirable compounds are also co-extracted from plants, such as waxes. Extracts obtained from Soxhlet technique presented in its composition higher percentage of waxes (for all matrices) when compared to supercritical CO<sub>2</sub> and LPG. The results of waxes in extracts obtained from leaves were 32.4 wt.% for Soxhlet, 21.1 wt.% for LPG, and 15.8 wt.% for supercritical CO<sub>2</sub>. Therefore, an SFE processing strategy involving fractionation is required to obtain a waxes-free extract and to reduce the amount of undesired compounds [36].

#### 4. Conclusion

This work presented data regarding the extractions of compounds from *L. albescens* using supercritical CO<sub>2</sub> and compressed LPG as solvents. With CO<sub>2</sub>, the highest yields were obtained from the flowers (0.8 wt.%). With LPG, the highest yields were obtained from the leaves (1.3 wt.%). The Soxhlet technique using n-hexane had a significant effect on the extract yields than the supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized LPG did. However, in the chemical composition regarding phytochemicals, its contribution was weak. SFE-CO<sub>2</sub> and PLE-LPG provided more than 50% stigmasterol and 18% ergosterol in the extracts. When evaluating the mass transfer mechanism, especially the constant extraction rate period, mass transfer rates were approximately 2-14 times higher for PLE-LPG than SFE-CO<sub>2</sub>. Also,  $t_{CER}$  was lower for PLE-LPG. Overall, the results provided a relevant contribution to the recovery of compounds from *L. albescens*. We consider that this article is the first report using supercritical CO<sub>2</sub> and compressed LPG for the extraction, evaluation of kinetic parameters and chemical characterization of extracts obtained from all morphological parts of *L. albescens*. Following the recent trend, supercritical and/or compressed extractions can represent a technical, environmentally correct and economically viable alternative to conventional extraction methods.

#### References

- [1] M. Herrero, A.P. Sánchez-Camargo, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction, Trends Anal. Chem. , 71 (2015) 26-38.

- [2] M.M.R. Melo, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva, Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology, *J. Supercrit. Fluids*, 92 (2014) 115-176.
- [3] G.L. Zabet, E.K. Silva, V.M. Azevedo, M.A. A.Meireles, Replacing modified starch by inulin as prebiotic encapsulant matrix of lipophilic bioactive compounds, *Food Research International*, 85 (2016) 26-35.
- [4] K.H.C. Baser, G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*, CRC Press, Boca Raton, USA, 2010.
- [5] D. Durán, L. Rey, C. Sánchez-Cañizares, A. Navarro, J. Imperial, T. Ruiz-Argueso, Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain, *Syst. Appl. Microbiol.*, 36 (2013) 128-136.
- [6] B. Naganowska, B.S. Wolko, E. Liwinska, Z. Kaczmarek, M.T. Schifino-Wittmann, 2C DNA variation and relationships among New World species of the genus *Lupinus* (Fabaceae), *Plant Syst. Evol.*, 256 (2006) 147-157.
- [7] A.M. Planchuelo, D.B. Dunn, The simple leaved lupines and their relatives in Argentina, *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 71 (1984) 92-103.
- [8] C.E. Granada, A. Beneduzi, B.B. Lisboa, A.C. Turchetto-Zolet, L.K. Vargas, L.M.P. Passaglia, Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among *Bradyrhizobium* sp. Symbionts of *Lupinus albescens* plants growing in arenized and non-arenized areas, 38 (2015) 323-329.
- [9] E.R. Abaide, G.L. Zabet, M.V. Tres, R. F.Martins, J.L. Fagundez, L.F. Nunes, S. Druzian, J.F. Soares, V.D. Prá, J.R.F. Silva, R.C. Kuhn, M.A. Mazutti, Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids, *Food Bioprod. Process.*, 102 (2017) 289-298.
- [10] J.F. Soares, G.L. Zabet, M.V. Tres, F.C. Lunelli, V.M. Rodrigues, M.T. Friedrich, C.A. Pazinato, D. Bilibio, M.A. Mazutti, N. Carniel, W.L. Priamo, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of black poplar (*Populus nigra* L.) extract: Experimental data and fitting of kinetic parameters, *J. Supercrit. Fluids*, 117 (2016) 270-278.
- [11] M.N. Moraes, G.L. Zabet, M.A.A. Meireles, Extraction of tocotrienols from annatto seeds by a pseudo continuously operated SFE process integrated with low-pressure solvent extraction for bixin production, *J. Supercrit. Fluids*, 96 (2015) 262-271.

- [12] J.W. King, Modern supercritical fluid technology for food applications, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 5 (2014) 215-238.
- [13] J. Hu, Z. Guo, M. Glasius, K. Kristensen, L. Xiao, X. Xu, Pressurized liquid extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) with bioethanol: an efficient and sustainable approach, *J. Chromatogr.*, 1218 (2011) 5765-5773.
- [14] J.F. Soares, V.D. Prá, M. Souza, F.C. Lunelli, E. Abaide, J.R.F. Silva, R.C. Kuhn, J. Martínez, M.A. Mazutti, Extraction of rice bran oil using supercritical CO<sub>2</sub> and compressed liquefied petroleum gas, *J. Food Eng.*, 170 (2016) 58-63.
- [15] D. Sallet, E. Abaide, C. Marcuz, G. Ariotti, V.D. Prá, G. Ugalde, G.L. Zabet, M.A. Mazutti, R.C. Kuhn, Obtaining fatty acids from *Mortierella isabellina* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas, *J. Supercrit. Fluids*, 122 (2017) 79-87.
- [16] NIST - Chemistry WebBook. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>, 2017 05 May 2017.
- [17] M.A.A. Meireles, Extraction of bioactive compounds from Latin American plants, in: J. Martinez (Ed.), *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*, CRC Press – Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2008, pp. 243-274.
- [18] V. Dal Prá, J.F. Soares, D.L. Monego, R.G. Vendruscolo, D.M.G. Freire, M. Alexandri, A. Koutinas, R. Wagner, M.A. Mazutti, M.B.d. Rosa, Extraction of bioactive compounds from palm (*Elaeis guineensis*) pressed fiber using different compressed fluids, *J. Supercrit. Fluids*, 112 (2016) 51-56.
- [19] Z. Novello, J. Scapinello, J.D. Magro, G. Zin, M.D. Luccio, M.V. Tres, V.J. Oliveira, Extraction, chemical characterization and antioxidant activity of andiroba seeds oil obtained from pressurized n-butane, *Ind. Crops Prod.*, 76 (2015) 697-701.
- [20] M. Paliga, Z. Novello, R.M. Dallago, J. Scapinello, J.D. Magro, M.D. Luccio, M.V. Tres, J.V. Oliveira, Extraction, chemical characterization and antioxidant activity of *Litchi chinensis* Sonn. and *Avena sativa* L. seeds extracts obtained from pressurized n-butane, *J. Food Sci. Tech.*, 54 (2017) 846-851.
- [21] G.L. Zabet, M.N. Moraes, P.I.N. Carvalho, M.A.A. Meireles, New proposal for extracting rosemary compounds: Process intensification and economic evaluation, *Ind. Crops Prod.*, 77 (2015) 758-771.
- [22] G.L. Zabet, M.A.A. Meireles, On-line process for pressurized ethanol extraction of onion peels extract and particle formation using supercritical antisolvent, *J. Supercrit. Fluids*, 110 (2016) 230-239.

- [23] M.C. Ribas, D. Mantovani, J.A. Awadallak, R.L. Canevesi, N.M. Tazinafo, L. Cardozo-Filho, F. Palú, E.A. Silva, Study of candeia oil extraction using pressurized fluids and purification by adsorption process, *J. Supercrit. Fluids*, 92 (2014) 177-182.
- [24] N. Mezzomo, J. Martínez, S.R.S. Ferreira, Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up, *J. Supercrit. Fluids*, 51 (2009) 10-16.
- [25] G.L. Zobot, M.N. Moraes, M.A.A. Meireles, Influence of the bed geometry on the kinetics of rosemary compounds extraction with supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Supercrit. Fluids*, 94 (2014) 234-244.
- [26] P.I.N. Carvalho, J.F. Osorio-Tobón, M.A. Rostagno, A.J. Petenate, M.A.A. Meireles, Techno-economic evaluation of the extraction of turmeric (*Curcuma longa* L.) oil and ar-turmerone using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids*, 105 (2015) 44-54.
- [27] P. Santos, A.C. Aguiar, J. Viganó, J.S. Boeing, J.V. Visentainer, J. Martínez, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of cumbaru oil (*Dipteryx alata* Vogel) assisted by ultrasound: Global yield, kinetics and fatty acid composition, *J. Supercrit. Fluids*, 107 (2016) 75-83.
- [28] J. Viganó, G.L. Zobot, J. Martínez, Supercritical fluid and pressurized liquid extractions of phytonutrients from passion fruit by-products: Economic evaluation of sequential multi-stage and single-stage processes, *J. Supercrit. Fluids*, 122 (2017) 88-98.
- [29] M. Skerget, P. Kotnik, Z. Knez, Phase equilibria in systems containing a-tocopherol and dense gas, *J. Supercrit. Fluids*, 26 (2003) 181-191.
- [30] G.L. Zobot, M.N. Moraes, A.J. Petenate, M.A.A. Meireles, Influence of the bed geometry on the kinetics of the extraction of clove bud oil with supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Supercrit. Fluids*, 93 (2014) 56-66.
- [31] R.P. Silva, M.M.R.d. Melo, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva, Polar and lipophilic extracts characterization of roots, stalks, leaves and flowers of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), and insights for its future valorization, *Ind. Crops Prod.*, 76 (2015) 1033-1088.
- [32] C.E.F. Fernandes, J. Scapinello, A. Bohn, A.A. Boligon, M.L. Athayde, J.D. Magro, M. Paliga, J.V. Oliveira, M.V. Tres, Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit

using compressed propane and supercritical CO<sub>2</sub>, J. Food Sci. Tech., 54 (2017) 98-104.

[33] D. Hamdan, M.Z. El-Readi, A. Tahrani, F. Herrmann, D. Kaufmann, N. Farrag, A. El-Shazly, M. Wink, Secondary metabolites of ponderosa lemon (*Citrus pyriformis*) and their antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities, Z. Naturforsch C. , 66 (2011) 385-393.

[34] N. Kaur, J. Chaudhary, A. Jain, L. Kishore, Stigmasterol: a comprehensive review, Int. J. Pharm. Sci. Res., 2 (2011) 2259-2265.

[35] C. Capeletto, G. Conterato, J. Scapinello, F.S. Rodrigues, M.S. Copini, F. Kuhn, M.V. Tres, J.V. Oliveira, J.D. Magro, Chemical Composition, antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) seed extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and compressed n-butane, J. Supercrit. Fluids, 110 (2016) 32-38.

[36] L. Baldino, E. Reverchon, G.D. Porta, An optimized process for SC-CO<sub>2</sub> extraction of antimalarial compounds from *Artemisia annua* L., J. Supercrit. Fluids, 128 (2017) 89-93.

## CAPÍTULO 4- ARTIGO 2

### **Title: Extracts from *Lupinus albescens*: antioxidant power and antifungal activity *in vitro* against phytopathogenic fungi**

#### **ABSTRACT**

Fungi are considered one of the most damaging microorganisms in agriculture. The indiscriminate use of chemical treatments in agricultural products allows pest resistance and affects human health. An alternative method for synthetic fungicides is the use of natural products such as plant extracts for the management of fungal diseases in plants. In this sense, extracts from different parts of *Lupinus albescens* (roots, stalks, leaves and flowers) were obtained by extractions with supercritical carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and compressed liquefied petroleum gas (LPG). Thereafter, the antioxidant activity of each extract was measured and the antifungal activity *in vitro* of extracts was evaluated against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticillioides*. The antifungal tests showed that all matrices provided inhibitory effect against both fungi tested. The extracts obtained from roots by CO<sub>2</sub> and LPG presented 70.1% and 65.1% inhibition against *F. oxysporum* and 67.8% and 61.2% inhibition against *F. verticillioides*, respectively. Furthermore, the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) ranged from 29.25 µg/ml to 192.96 µg/ml. The results of this study suggest that the extracts obtained from *L. albescens* by extractions using supercritical CO<sub>2</sub> and compressed LPG might be a potential source of antioxidants and natural fungicides.

**Keywords:** *Lupinus albescens*; antioxidant power; antifungal activity; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium verticillioides*.

## 1. Introduction

The intensification of agricultural production to attend food requirements is increasing the importance of reducing fungal diseases that attack cultivated crops. Species of the genus *Fusarium* are well known as one of the most widespread plant pathogens that cause food spoilage and loss of productivity. Furthermore, they are associated with human and animal diseases through contaminated foods because they produce mycotoxins.[1] *Fusarium* is a large genus of filamentous fungi that is widely distributed in soil, plants, and other organic substrates. This genus comprises many species, as *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticillioides*, and causes severe infections in plants and humans. [2]

In the development of agro-food chain, the use of synthetic chemical fungicides to protect post-harvest grains, vegetables and fruits raises environmental and human health concerns.[3] However, in consideration of this and of antifungal resistance, novel alternatives, such as physical treatments, natural extracts, and biocontrol microbes are used instead to control the post-harvest diseases.[4] Currently, many researchers have concentrated their attention on the use of natural products from plants for protecting crops from various diseases, minimizing the negative effects on human health and environmental safety.[3,5,6]

Plant secondary metabolites have great potential as a source of effective antifungal agents.[7] These compounds derived from plants have demonstrated several antimicrobial activities, including antifungal activities.[8] In addition, botanical fungicides are considered more selective and abundant.[9] For the management of phytopathogenic fungi some botanical fungicides are marketed as: curcuminoids, cinnamaldehyde, neem and pyrethins.[9,10]

The genus *Lupinus* belongs to the Fabaceae family and it is composed of approximately 300 species divided into "Old World" and "New World".[11] *L. albescens* is a leguminous plant that belongs to "New World" lupine species, which is native from southern Brazil. This Brazilian region is characterized by poor degraded soils with low organic matter and is designated as a sandstone area.[12] Botanical parts of *L. albescens*, such as roots, stalks, leaves, and flowers, contain antioxidant and antifungal compounds, as stigmasterol and ergosterol.[13] However, none report could be found in the scientific literature up to now that evaluates the antifungal properties of the extracts obtained from this leguminous plant.

Therefore, taking into account the antioxidant power and the potential inhibitory effects of such extracts against the growth of pathogenic fungi, the objective of this work was to evaluate the effect of *L. albescens* extracts on the mycelial growth *in vitro* of *F. oxysporum* and *F. verticillioides*.

## 2. Methodology

### 2.1 Plant material

Samples of roots, stalks, leaves, and flowers of *L. albescens* were randomly collected from São Francisco de Assis, Brazil (S: 29° 43' 23,2"/ W: 053° 43' 03.4"). The samples were identified by the Herbarium of the Federal University of Santa Maria (UFSM, Brazil) under certificate number 15.447.

### 2.2 Obtaining the extracts

Extracts were obtained from different parts of *L. albescens* by supercritical fluid extraction with CO<sub>2</sub> and pressurized liquid extraction with liquefied petroleum gas (LPG). Conditions of pressure and temperature were evaluated, which yielded a different amount of extracts and different composition of phytochemical compounds.[13] Based on this, for each matrix was selected the condition that presented the highest amount of compounds of interest (stigmasterol and ergosterol), for each of solvents (CO<sub>2</sub> and LPG), totaling eight samples of extracts were obtained (Table 1) and used for determining their bioactivities.

**Table 1.** Extraction conditions and yields of extracts from different parts of *L. albescens*: roots, stalks, leaves, and flowers

Botanical part	Solvent	Temperature (°C)	Pressure (bar)	Yield (g kg <sup>-1</sup> )
Roots	CO <sub>2</sub>	40	150	0.0014
	LPG	45	35	0.0019
Stalks	CO <sub>2</sub>	60	250	0.0040



	LPG	45	35	0.0017
Leaves	CO <sub>2</sub>	50	200	0.0051
	LPG	25	35	0.0079
Flowers	CO <sub>2</sub>	50	200	0.0046
	LPG	25	35	0.0083

### 2.3 Antioxidant activity

Antioxidant activity of *L. albescens* extracts was performed by 1,1 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) method [14] with minor modifications (adapted for microplates). The method consisted in adding 98.662 µL of DPPH• (Sigma Aldrich, Brazil) and 1.34 µL of ethanol p.a. to 100 µL of sample. The solution was agitated and incubated in the dark for 30 min at room temperature (25°C). 100 µL of ethanolic solution was used as a reference. The reduction of the DPPH• radical was measured in Sense Microplate Reader (Hidex, Turku, Finland) by continuous monitoring of the decrease in absorption at 522 nm. Ascorbic acid was used as a positive control (standard). The assays were measured in triplicate. The antiradical activity against DPPH• (AA) was calculated as Eq. (1).

$$AA(\%) = \left( \frac{AA_{DPPH} - (A - A_B)}{AA_{DPPH}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Where:  $AA_{DPPH}$  is the absorbance of the DPPH• solution; A is the absorbance of the test sample at different concentrations;  $A_B$  is the absorbance of the control.

The  $IC_{50}$  values (µg/ml) (concentrations of test and standard antioxidant samples that provide 50% inhibition of DPPH• radicals) which were calculated from the DPPH• absorption curve at 522 nm.

### 2.4 Antifungal activity

Ethanolic solutions of extracts were prepared at a concentration of 5000 mg/l. The control sample consisted of ethanol and distilled water in the same volumetric concentration. Fungi toxic effect of extracts was evaluated on the development of two important phytopathogens: *F. oxysporum* and *F. verticillioides*, assigned by the Department of Phytosanitary Defense of the Federal University of Santa Maria

(UFESM, Brazil). The culture medium used in the experimental assays was Potato Dextrose Agar (abbreviated as “PDA”, trademark HiMedia®, USA).

Inhibitory effect of ethanolic extracts from *L. albescens* matrices on the growth of fungi was carried out by the agar disk-diffusion method.[15] Petri dishes were completed with PDA culture medium and, after solidification of the medium, a 7 mm diameter mycelium disc of the test microorganism was transferred from a pure culture of 7 days to the center of the dishes. Then, two paper disks (approximately 5 mm diameter) were placed on each side of each dish containing 25 µL of extract at a concentration of 5000 mg/l. Thereafter, the Petri dishes were inoculated at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  during 7 days. Diameter of the mycelial growth was measured through of two diametrically opposite measurements of the colonies when the control reached its maximum growth. Percentage of inhibition of mycelial growth was determined using the control concentration growth (Petri dish with only PDA medium) as a reference, and calculated as Eq. (2):[16]

$$\text{Inhibition (\%)} = \left( \frac{DC-DT}{DC} \right) \times 100 \quad (2)$$

Where: DC is the colony diameter (mm) of the control concentration; DT is the colony diameter (mm) of the different concentrations evaluated.

### **2.5 Statistical analysis of antifungal activity**

Statistical analysis was performed using a completely randomized design with 3 replicates. For both fungi, *F. oxysporum* and *F. verticillioides*, 8 treatments (four plant matrices × two solvents × one concentration) were evaluated. Data analysis was performed using the Tukey test ( $p < 0.05$ ) in the software Statistica 8.0 (Statsoft Inc., USA). The  $\text{IC}_{50}$  values were calculated through linear regression analysis.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **3. Results and Discussion**

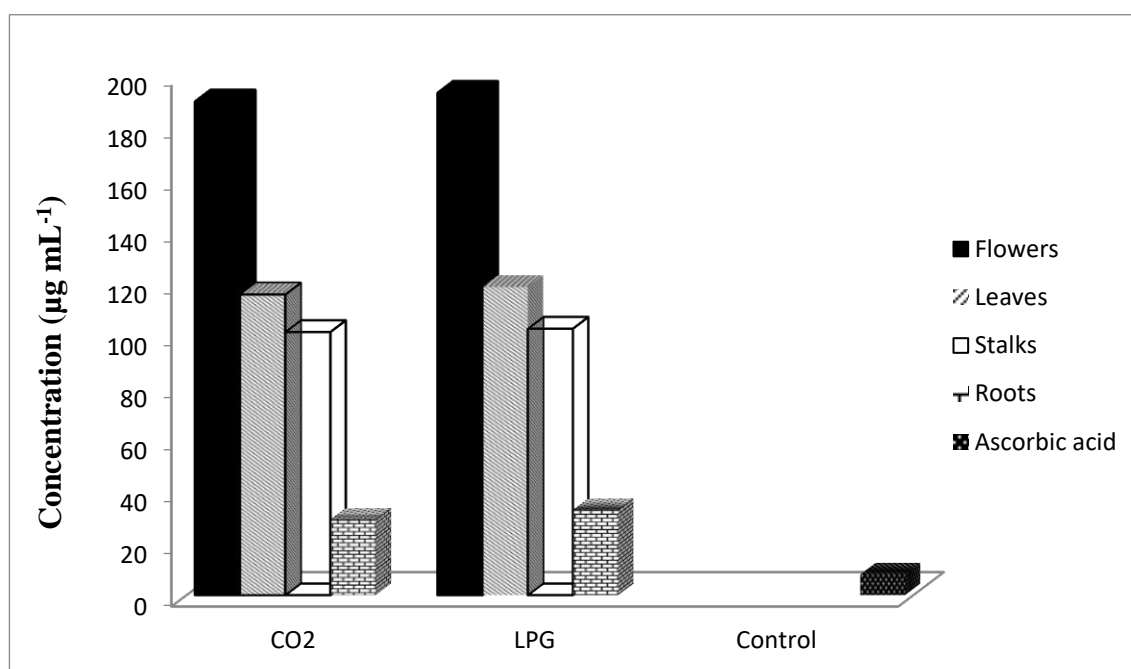
#### **3.1 Antioxidant activity**

Antioxidant capacity is widely used as a parameter for measure the quality of bioactive and functional components in food. The quality of natural antioxidants is

closely related to their functionalities.[17–19] In such way, the DPPH method is an easy, rapid, stable, and sensitive method to determine the antioxidant activity where the reaction results in the decrease in the absorbance of free radical species, visible as the change of color from purple to yellow.[20,21]

In this work, the antioxidant power of the extracts is presented in terms of  $IC_{50}$ . Ascorbic acid was used as a standard antioxidant and presented  $IC_{50}$  of 8.0  $\mu\text{g/ml}$ , that is, a referenced minimum concentration used as oxidant control for comparison purposes. A lower  $IC_{50}$  value indicates a higher antioxidant activity [22]. Therefore, the results obtained for  $IC_{50}$  using DPPH method are presented in Fig. 1.

**Figure 1.**  $IC_{50}$  of extracts from *L. albescens* obtained by supercritical fluid extraction with carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) and pressurized liquid extraction with compressed liquefied petroleum gas (LPG)



In this work, the  $IC_{50}$  values ranged from 29.3  $\mu\text{g/ml}$  to 193.0  $\mu\text{g/ml}$ . The lowest values of  $IC_{50}$  were observed when the extracts obtained from the roots were used. In such case, the values of  $IC_{50}$  were 29.3  $\mu\text{g/ml}$  for extracts obtained by  $\text{CO}_2$  and 32.9  $\mu\text{g/ml}$  for extracts obtained by LPG. Otherwise, the highest values of  $IC_{50}$  were observed when the extracts obtained from the flowers were tested. These values were 189.7  $\mu\text{g/ml}$  and 193.0  $\mu\text{g/ml}$  for extracts obtained by  $\text{CO}_2$  and LPG, respectively. This trend is most likely as a consequence of waxes that are also

extracted from this matrix.[13,23] When more waxes are extracted, the proportion of bioactive compounds in the extracts, as sterols and phenolic acids, is reduced because they are diluted in the bulk extract.

In general, the  $IC_{50}$  of root extracts from *L. albescens* were only approximately 3.6 times higher than the value presented by ascorbic acid. This is a promising result which corroborates with studies reported elsewhere.[24–26] Generally, natural extracts present values of  $IC_{50}$  larger than control substances do. In some cases, the  $IC_{50}$  can reach high values. For example,  $IC_{50}$  ranged from 2364  $\mu\text{g/ml}$  to 11984  $\mu\text{g/ml}$  for extracts obtained from coriander seeds with supercritical  $\text{CO}_2$ . [24]

It is important to point out that different extraction conditions and different extraction techniques for a same vegetal matrix provide extracts with different  $IC_{50}$ . In this work, the  $IC_{50}$  were slightly larger for LPG than  $\text{CO}_2$  (Fig. 1). However, in the case of extracts from coriander seeds, the  $IC_{50}$  ranged from 24.8  $\mu\text{g/ml}$  to 41.8  $\mu\text{g/ml}$  when using ultrasound extraction with ethanolic solution (700 g/l ethanol and 300 g/l water), [25] while it ranged from 75.0  $\mu\text{g/ml}$  to 100.1  $\mu\text{g/ml}$  when using ultrasound extraction with pure water and from 17.1  $\mu\text{g/ml}$  to 63.4  $\mu\text{g/ml}$  when using supercritical water. [26]

Furthermore, when comparing the findings presented in this work with results reported for other vegetal extracts, it is possible to observe that *L. albescens* extracts exhibited a higher antioxidant power in relation to the radical DPPH $\cdot$ . Considering that the values of  $IC_{50}$  for the leaves did not exceed 120  $\mu\text{g/ml}$ , they were at least 9 times lower than those presented for extracts obtained from *Sapindus mukorrosi* Gaertn. The leaf and fruit extracts presented  $IC_{50}$  equal to 1114  $\mu\text{g/ml}$  and 1127  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. [17] Likewise, Abdel-Farid [27] evaluated metabolomic profiling of different parts of *Acacia* species and found different  $IC_{50}$  of methanol extracts. *Acacia laeta* leaves and pods, *Acacia nilotica* pods, *Acacia seyal* leaves and pods, and *Acacia nilotica* leaves presented  $IC_{50}$  of 130.6, 145.2, 76.1, 76.9, 77.1, and 78.2  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.

The promising values of  $IC_{50}$  presented in this work are associated with the bioactive compounds extracted from the matrices of *L. albescens*. [13] The major compounds found in the roots, stalks, leaves, and flowers were stigmasterol, ergosterol, and eicosanol. All these compounds are reported as potential antioxidants [28–30] and antifungals. [31,32]

### 3.2 Antifungal activity

*In vitro* antifungal activity of extracts obtained from *L. albescens* by supercritical fluid and pressurized liquid extractions against *F. oxysporum* and *F. verticillioides* are shown in Table 2. All matrices presented antifungal activity against both species of fungi, ranging from 53.9% to 70.1% inhibition against *F. oxysporum* and from 53.5% to 67.8% inhibition against *F. verticillioides*.

**Table 2.** Mycelial growth inhibition (percentage of *F. oxysporum* and *F. verticillioides*) by *L. albescens* extracts

	% inhibition			
	Roots	Stalks	Leaves	Flowers
<i>F. oxysporum</i>				
CO <sub>2</sub>	70.1± <0.001 <sup>a</sup>	66.0±0.1 <sup>b</sup>	60.5±0.2 <sup>c</sup>	60.9±0.2 <sup>c</sup>
LPG	65.1±0.1 <sup>a</sup>	57.8±0.5 <sup>bc</sup>	60.3±0.3 <sup>b</sup>	53.9±0.2 <sup>c</sup>
<i>F. verticillioides</i>				
CO <sub>2</sub>	67.8±0.2 <sup>a</sup>	59.3±0.2 <sup>b</sup>	55.0±0.3 <sup>c</sup>	55.0±0.1 <sup>c</sup>
LPG	61.2±0.1 <sup>a</sup>	54.9±0.4 <sup>bc</sup>	57.2±0.1 <sup>b</sup>	53.5±0.3 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Different letters in the same column represent a significant difference at 95% (*p*-value < 0.05 - Tukey test) among the assays for each solvent and for each fungus.

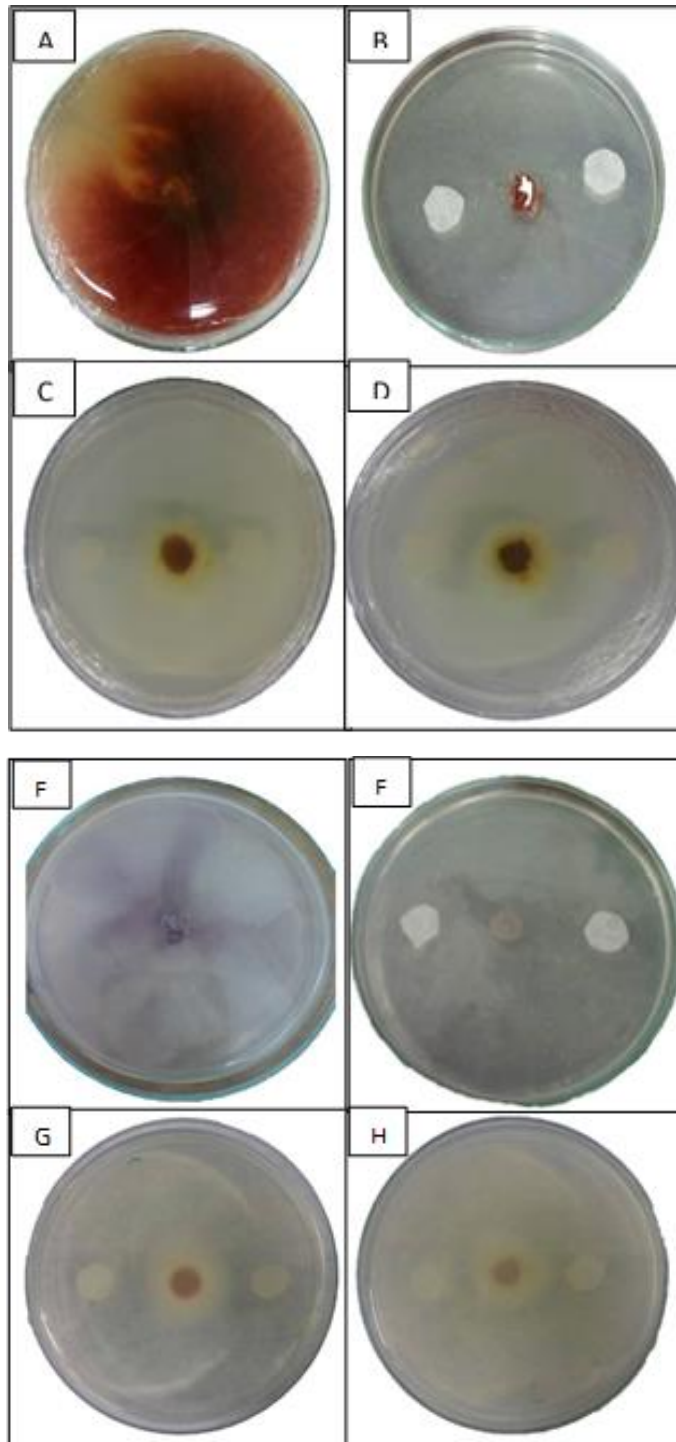
The matrix that presented the highest inhibition percentage for both fungi tested was the roots, with 70.1% and 67.8% inhibition for *F. oxysporum* and *F. verticillioides*, respectively. These data are corroborated by the bioactivities presented by the roots in terms of antioxidant power. Most likely the phytochemicals extracted from this matrix were more concentrated while less numbers of interfering compounds were present in the extracts, which enabled larger *in vitro* activity against these two fungi. The inhibition percentage presented (Table 2) are in accordance with the inhibition presented by extracts from other vegetal matrices, but with the advantage of the *L. albescens* extracts being obtained by recent and promising technologies, especially the supercritical technology. The residual of solvents is practically null in the extracts, which permits a broader application of plants, including those are consumed as a crude plant (lettuce, chard, tomato, carrot, chicory, spinach, etc).

For example, extracts obtained from roots, leaves, and flowers of *Amaranthus spinosus* by low-pressure extraction with methanol and n-hexane presented efficacy against spore germination of *Phakopsora pachyrhizi*. Furthermore, extracts obtained from pomegranate peels by low-pressure extraction with butanol inhibited 69.2% of growth of *F. verticillioides*. [33] Likewise, essential oil from *Santolina chamaecyparissus* L. presented 68% inhibition of *Trichophyton rubrum*. [34] However, residual of solvents can remain in the extracts (methanol, n-hexane, butanol, etc.), which prevents its application in some cultures used in food-related areas.

Regarding the statistical evaluation (Table 2), there were differences in the inhibitions in most of the conditions. When testing the extracts against *F. oxysporum* and *F. verticillioides*, no significant differences ( $p < 0.05$ ) for each fungus (each row) were observed for the extracts obtained from leaves and flowers by supercritical CO<sub>2</sub> and for the extracts obtained from leaves and stalks by compressed LPG. However, in all the situations, the roots from the extracts were different from the other extracts. The inhibition provided by these extracts was approximately 15-20% higher than that provided by the others. The results are also linked with the remarkable content of stigmasterol in the extracts obtained from the roots, which reached more than 50% (mass basis) of the total composition of the extracts. [13]

The antifungal activity of *L. albescens* extracts is also presented in a qualitative description. Taking into account the extracts from the roots presented more quantity of stigmasterol than the other matrices did, the qualitative description is presented for the extracts obtained from the roots (Fig. 2). When comparing the first and seventh days of application of the extracts, the differences in the inhibition are visible. The extracts could inhibit the growth of both fungi, reducing the size of the fungal colonies during the time course. The reduction is observed for extracts obtained by using both solvents (CO<sub>2</sub> or LPG), but with a few larger reduction for the extracts obtained by LPG.

**Figure 2.** Inhibition of roots extracts obtained from *L. albescens* against *F. oxysporum* and *F. verticillioides*; A: Control; B: 1<sup>st</sup> day of application; C: CO<sub>2</sub> roots extract after 7 days; D: LPG roots extract after 7 days; E: Control; F: 1<sup>st</sup> day of application; G: CO<sub>2</sub> roots extract after 7 days; H: LPG roots extract after 7 days



*F. oxysporum* and *F. verticillioides* are widespread fungi that attack several cultures. Therefore, among other extracts that present antifungal activity against them [16], extracts from *L. albescens* have been demonstrated to be another alternative. The extracts from the roots, stalks, leaves, and flowers can be used. Considering each specific purpose, the extracts can be used in different dilution levels, which assure their use for different percentages of inhibition. In some cases, dose dependence is displayed. For instance, diluted extracts from *Rosmarinus officinalis* were evaluated to inhibit the growth of *F. verticillioides*. At a concentration of 150 µg/ml, there was 17% inhibition, while at 300 µg/ml and 600 µg/ml, 29.7% and 67% inhibition, respectively, were reported.[35] Taking into account extracts from *Curcuma longa* L., the *in vitro* antifungal activities (inhibition) against *F. verticillioides* were 56.0% and 79.3% when applying the extracts at 17.9 µg/ml and 294.9 µg/ml, respectively.[36] Overall, the inhibition reported against *F. oxysporum* and *F. verticillioides* using natural extracts are similar to those reported in this work.

Therefore, different antifungal activities of *L. albescens* extracts against *F. oxysporum* and *F. verticillioides* can be attributed to the different quantity of compounds identified in the four matrices, such as stigmasterol, ergosterol, vitamin E, methyl commate, pentadecanoic acid, eicosanol, octadecanoic acid, neophytadiene, epiergosterol and tetracosanol.<sup>10</sup> Despite the fact that different antimicrobial natural compounds usually occur together within plant tissues, most researches present only the antifungal activity of single molecules.[37] Nevertheless, it should be pointed out that the toxicity of antimicrobial molecules can be enhanced synergically when they work in combination.[38]

Stigmasterol and ergosterol are reported as compounds with antifungal effects by Mbambo et al.[31], when tested as the control standards for fungi *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum* and *Fusarium verticillioides*, ergosterol presented greater zone of inhibition, followed by stigmasterol and to extract compounds of *B. natalensis*, this one has an antifungal potential, for the same fungi. Choi et al. [32] evaluated the *in vivo* antifungal activity of crude extracts of *Dipsacus asper* roots against phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, *Blumeria graminis f. Sp. Hordei*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* and *Rhizoctonia solani* using an entire plant assay method. Among the compounds isolated from the roots, campesterol, β-sitosterol and stigmasterol were emphasized and had positive effect for antifungal activity.



This work highlights at the first time the bioactivity of plant extracts from *L. albescens* matrices, as antifungal and antioxidant activities. Consequently, further studies should be performed for evaluating different concentrations for all *L. albescens* matrices, determining the doses of extracts, assessing the toxicology of plants, and evaluating extracts in terms of toxicity to the environment and human health. In some cases, the antifungal and antioxidant activities can be combined with an insecticide, anti-inflammatory, antimicrobial, and antibacterial activities through synergistic or antagonistic interactions. Then, the compounds extracted from *L. albescens* by supercritical CO<sub>2</sub> or compressed LPG can act in some directions within the food and agricultural science in order to have a biological product.

#### 4. Conclusion

Extracts obtained from roots, stalks, leaves, and flowers of *L. albescens* by supercritical fluid extraction (SFE) with CO<sub>2</sub> and pressurized liquid extraction with compressed LPG presented antioxidant and antifungal activities. The antioxidant activity was expressed in terms of IC<sub>50</sub>. Ascorbic acid, a control antioxidant substance, presented IC<sub>50</sub> equal to 8.0 µg/ml, while the extract obtained from the roots by SFE with CO<sub>2</sub> presented IC<sub>50</sub> equal to 29.3 µg/ml as the highest antioxidant power. Overall, the values of IC<sub>50</sub> were slightly lower when the extracts obtained by SFE with CO<sub>2</sub> were tested. Regarding the antifungal activity, the extracts from the roots provided 70.1% and 67.8% inhibitions against *F. oxysporum* and *F. verticillioides*, respectively, which indicates these extracts as useful agents to control agricultural diseases caused by these phytopathogenic fungi.

#### REFERENCES

- [1] Watanabe M, Yonezawa T, Lee K ichi, et al. Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. *J. Sci. Food Agric.* 2011;91:2500–2504.
- [2] Hsu L, Wang H, Sun P, et al. International Journal of Antimicrobial Agents The antibiotic polymyxin B exhibits novel antifungal activity against *Fusarium* species. 2017;49:740–748.
- [3] Juárez ZN, Hernández LR, Bach H, et al. Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens. *Ind. Crops Prod.* 2015;74:178–182.

- [4] Xu S, Yan F, Ni Z, et al. In vitro and in vivo control of *Alternaria alternata* in cherry tomato by essential oil from *Laurus nobilis* of Chinese origin. *J. Sci. Food Agric.* 2014;94:1403–1408.
- [5] Matusinsky P, Zouhar M, Pavela R, et al. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. *Ind. Crops Prod.* 2015;67:208–215.
- [6] Jasso De Rodríguez D, Salas-méndez E de J, Rodríguez-García R, et al. Antifungal activity in vitro of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp . against postharvest fungi. 2017;
- [7] Rocha AD, Braga De Oliveira A, Dias De Souza Filho J, et al. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phyther. Res.* 2004;18:463–467.
- [8] Galván IJ, Mir-Rashed N, Jessulat M, et al. Antifungal and antioxidant activities of the phytomedicine pipsissewa, *Chimaphila umbellata*. *Phytochemistry.* 2008;69:738–746.
- [9] Copping LG, Duke SO, Natural products that have been used commercially as crop protection agents, *Pest Manag. Sci.* 2007; 63:524–554.
- [10] Yoon MY, Cha B, Kim JC. Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *Plant Pathol. J.* 2013;29:1–9.
- [11] Durán D, Rey L, Sánchez-Cañizares C, et al. Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 2013;36:128–136.
- [12] Granada CE, Beneduzi A, Lisboa BB, et al. Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *Lupinus albescens* plants growing in arenized and non-arenized areas. *Syst. Appl. Microbiol.* 2015;38:323–329.
- [13] Confortin TC, Todero I, Ferreira JS, et al. Extraction and composition of extracts obtained from *Lupinus albescens* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas. *J. Supercrit. Fluids.* 2017;
- [14] Al-Fatimi M, Wurster M, Schröder G, et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacol.* 2007;111:657–666.
- [15] Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review Author ' s Accepted Manuscript. *J. Pharm. Anal.* [Internet]. 2015;6:71–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [16] Zabka M, Pavela R, Gabrielova-Slezakova L. Promising antifungal effect of some Euro-Asiatic plants against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *J. Sci. Food Agric.* 2011;91:492–497.
- [17] Singh R, Kumari N. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of *Sapindus mukorrossi* Gaertn. - A valuable medicinal tree. *Ind. Crops Prod.* 2015;73:1–8.
- [18] Silva EK, Zobot GL, Cazarin CBB, et al. Biopolymer-prebiotic carbohydrate blends and their effects on the retention of bioactive compounds and

- maintenance of antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.* [Internet]. 2016;144:149–158. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.045>.
- [19] Bravi E, Perretti G, Falconi C, et al. Antioxidant effects of supercritical fluid garlic extracts in sunflower oil. *J. Sci. Food Agric.* 2017;97:102–107.
- [20] Koleva II, Van Beek TA, Linssen JP, et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 2002;13:8–17.
- [21] Bączek KB, Kosakowska O, Przybył JL, Pióro-Jabrucka E, Costa R, Mondello L, Gniewosz M, Synowiec A and Węglarz Z, Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Ind Crops Prod.* 2017; 102:154-163 .
- [22] Sowndhararajan K, Kang SC. Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. *Saudi J. Biol. Sci.* 2013;20:319–325.
- [23] Baldino L, Reverchon E, Della Porta G. An optimized process for SC-CO<sub>2</sub> extraction of antimalarial compounds from *Artemisia annua* L. *J. Supercrit. Fluids* [Internet]. 2017;128:89–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.018>.
- [24] Zekovic Z, Pavlic B, Cvetanovic A, et al. Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Process optimization, chemical profile and antioxidant activity of lipid extracts. *Ind. Crops Prod.* 2016;94:353–362.
- [25] Zeković Z, Bušić A, Komes D, et al. Coriander seeds processing: Sequential extraction of non-polar and polar fractions using supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction. *Food Bioprod. Process.* 2015;95:218–227.
- [26] Zeković. Z, Vidović S, Vladić J, Radosavljević R, Cvejic A, Elgndi MA and Pavlić B, Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *J Supercr Fluids* 2014; 95:560-566.
- [27] Abdel-Farid IB, Sheded MG, Mohamed EA. Metabolomic profiling and antioxidant activity of some *Acacia* species. *Saudi J. Biol. Sci.* 2014;21:400–408.
- [28] Hamdan D, El-Readi MZ, Tahrani A, et al. Secondary metabolites of ponderosa lemon (*Citrus pyriformis*) and their antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 2011;66 C:385–393.
- [29] Venkata Raman B, Samuel LA, Pardha Saradhi M, et al. Antibacterial, antioxidant activity and GC-MS analysis of *Eupatorium odoratum*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2012;5:99–106.
- [30] Abaide ER, Zabot GL, Tres M V., et al. Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids. *Food Bioprod. Process.* 2017;102:289–298.
- [31] Mbambo B, Odhav B, Mohanlall V, Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (*Asphodelaceae*). *J. Med. Plants Res.* 2012; 6(38):5135-5141.

- [32] Choi NH, Jang JY, Choi GJ, et al. Antifungal activity of sterols and dipsacus saponins isolated from *Dipsacus asper* roots against phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2016;
- [33] Yusnawan E. Inhibition of Spore Germination of *Phakopsora Pachyrhizi* Using Crude Extracts of *Amaranthus Spinosis*. *Procedia Food Sci.* [Internet]. 2015;3:340–347. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X15000383>.
- [34] Bel Hadj Salah-Fatnassi K, Hassayoun F, Cheraif I, et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of flowerhead and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia. *Saudi J. Biol. Sci.* 2017;24:875–882.
- [35] Da Silva Bomfim N, Nakassugi LP, Faggion Pinheiro Oliveira J, et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chem.* 2015;166:330–336.
- [36] Avanço GB, Ferreira FD, Bomfim NS, et al. *Curcuma longa* L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. *Food Control* [Internet]. 2017;73:806–813. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351630531X>.
- [37] Lanzotti V, Romano A, Lanzuise S, et al. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. *Phytochemistry* [Internet]. 2012;74:133–139. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.11.008>.
- [38] Wittstock U, Gershenzon J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002;5:300–307.

## CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1 DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos neste trabalho demonstram que o extrato de ambas as matrizes de *L. albescens*, associado ao rendimento mais elevado, não é considerado sempre como melhor opção de extração. Pois estes podem resultar em diminuição da atividade biológica (ou baixa composição de compostos bioativos) significando que os compostos alvo não estão sendo extraídos de forma eficiente (CAPELETTO et al., 2016), com ressalvo para a extração da raiz utilizando o GLP como solvente e caule com o solvente CO<sub>2</sub>. Em relação ao rendimento, utilizando GLP comprimido a matriz folha apresentou o maior rendimento, nas condições de 45°C e 35 bar, utilizando o CO<sub>2</sub> como solvente, obteve-se o maior rendimento na matriz flor, na condição de 60°C e 250 bar. Da mesma forma para as matrizes raízes e caules os maiores rendimentos foram na condição de 60°C e 250 bar, respectivamente, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico. Ao avaliar o mecanismo de transferência de massa, especialmente o período da taxa de extração constante, as taxas de transferência de massa foram aproximadamente 2 à 14 vezes superiores para o GLP do que para o CO<sub>2</sub> supercrítico, além disso,  $t_{CER}$  foi menor para o GLP.

Quando comparadas as condições de extração em relação ao rendimento e a composição química, elas se apresentam de forma independente. Os resultados mais promissores, em que se obteve compostos de importância foram encontrados nas condições de 50°C e 200 bar e 25°C e 35 bar para CO<sub>2</sub> e GLP, respectivamente, para as flores e folhas; para as raízes utilizando CO<sub>2</sub> foi a condição 40°C e 150 bar e GLP 45°C e 35 bar; já para caules foi 60°C e 250 bar para CO<sub>2</sub> e 45°C e 35bar para GLP. A extração tradicional Soxhlet apresentou rendimentos superiores quando comparados com a EFS utilizando CO<sub>2</sub> e com GLP, porém estas técnicas possuem vantagens quanto a composição química dos extratos. A técnica Soxhlet apresentou efeito negativo para extração de compostos de interesse, extraíndo maiores porcentagens de ceras vegetativas, enquanto os dois métodos estudados (CO<sub>2</sub> supercrítico e GLP comprimido) foram eficientes para extração de compostos bioativos, fornecendo mais de 50% de estigmasterol e 18% de ergosterol nos extratos.

A atividade antioxidante dos extratos foi realizada na condição ideal de extração em relação a maior concentração de composto alvo encontrada na análise cromatográfica. O maior valor da atividade antioxidante foi observado na matriz de raízes (29,25 a 32,94  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\text{CO}_2$  e GLP, respectivamente), enquanto a atividade antioxidante mais baixa foi detectada na matriz de flores (189,66 a 192,96  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\text{CO}_2$  e GLP, respectivamente). A atividade antifúngica está diretamente correlacionada a estes resultados, pois a matriz raízes destacou-se com inibição de 70,12% para *F. oxysporum* e 67,76% para *F. verticillioides*, utilizando  $\text{CO}_2$  como solvente. Esta também apresentou porcentagem superior de compostos alvos, contendo 50% em sua composição do composto estigmasterol, considerado um fitoquímico com ação anti-inflamatória e antioxidante (HAMDAN et al., 2011) e um  $\text{IC}_{50}$  de 29,25 e 32,94  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\text{CO}_2$  e GLP.

## 5.2 CONCLUSÕES GERAIS

Com os resultados obtidos neste trabalho sobre extração e caracterização de compostos bioativos de *L. albescens* utilizando fluidos supercríticos e/ou pressurizados, foi possível concluir que:

- Os métodos extrativos se diferenciam entre si nos rendimentos das matrizes de *L. albescens* e os diferentes valores de pressão e temperatura testados no planejamento influenciaram de forma diferenciada para cada solvente. Nas extrações com  $\text{CO}_2$  supercrítico a pressão e a temperatura apresentaram efeito positivo e negativo sobre o rendimento global e as interações entre elas apresentam efeitos positivos. Para o solvente GLP a pressão, temperatura e a interação entre as mesmas não foram estatisticamente significativas (Anexo 1). Quanto ao tempo de extração para o GLP foi menor quando comparado ao  $\text{CO}_2$  supercrítico, para ambas as matrizes. O modelo utilizado para descrever as curvas de extração, representou adequadamente os dados experimentais. Em geral, os resultados proporcionaram contribuição relevante para a recuperação de compostos de *L. albescens*.
- A variação dos métodos extrativos ( $\text{CO}_2$  supercrítico e GLP comprimido) comparados com a extração convencional Soxhlet

influenciou consideravelmente para a identificação dos compostos. Quando se analisa os resultados tomando como critério a qualidade do extrato obtido, pode se observar que a extração que utilizou CO<sub>2</sub> como solvente foi a que apresentou melhor valor com relação à atividade antioxidante e inibição antifúngica.

- Todas as matrizes de *L. albescens* apresentaram atividade antifúngica para os dois fungos estudados: *F. oxysporum* e *F. verticillioides*. Destaca-se a matriz raízes, a qual apresentou resultados positivos tanto para composição química, atividade antioxidante e antifúngica.
- Finalmente pode-se concluir que as extrações utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico e GLP comprimido podem ser boa alternativa em relação aos métodos convencionais de extração. Os extratos de *L. albescens* apresentaram resultados promissores para um fungicida botânico que pode ser útil no controle de doenças agrícolas causadas por *F. oxysporum* e *F. verticillioides*.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a extração utilizando juntamente um co-solvente, para observar se há aumento no rendimento e na quantidade de compostos de diferentes polaridades a serem obtidos nas extrações;
- Avaliar a extração assistida por ultrassom utilizando solventes com diferentes polaridades;
- Avaliar a concentração inibitória mínima para os fungos *F. oxysporum* e *F. verticillioides*;
- Testar os extratos em outros fungos de interesse agrícola.



## REFERÊNCIAS

- ABAIDE, E. R. et al. Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 289-298, 2017.
- ABE, L. T. et al. Compostos Fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. *Vitis vinifera* L. **Cienc. Tecnol. Alimentos**. Campinas, v. 2, n. 27, p. 394-400, abr./jun. 2007.
- ALAM, S. B. et al. Antifungal activity of essential oils of three aromatic plants from western Algeria against five fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 87, p. 56-61, 2014.
- ANARAT-CAPPILLINO, G.; SATTELY, E. S. The chemical logic of plant natural product biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 51-58, 2014.
- ARZOO, K.; BISWAS, S. K.; RAJIK, M. Biochemical evidences of defence response in tomato against *Fusarium* wilt induced by plant extracts. **Plant Pathology Journal**, v. 11, p. 42- 50, 2012.
- BACKES, A.; Nardino, M. **Nomes Populares e Científicos de Plantas do Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Ed. Unisino, p. 164, 1999.
- BAJEROVÁ, P. et al. Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. **Journal of Separation Science**. v. 37, p. 835–844, 2014.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, A. C. L. et al. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante as soja e produtos derivados. **Cienc. Tecnol. Alimentos**. Campinas, v. 4, n. 26, p. 921-926, out./dez. 2006.
- BARBOSA, C. S. et al. **Potencial herbicida do extrato diclorometanólico da folha da lixeira (*Curatella americana* L.)**. In: Seminário de iniciação científica, XII. Uberlândia, Minas Gerais, MG, Universidade Federal de Uberlândia, p. 1-10, 2008.
- BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Development of a novel methodology for the analysis of ergosterol in mushrooms. **Food Analytical Methods**. v. 7, p. 217-223, 2014.
- BARROS, H. D. F. Q. et al. Simultaneous extraction of edible oil from avocado and capsanthin from red bell pepper using supercritical carbon dioxide as solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 315-320, 2016.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p 15-100, 1991.

BASER, K.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**, second ed. CRC Press. 994 p., 2009.

BATTILANI, P. et al. Logistic regression modeling of cropping systems to predict fumonisin contamination in maize. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10433–10438, 2008.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas. Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 332 p. 2009

BENICIO, V. et al. Identificação e características culturais de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de sementes de feijão no Estado da Paraíba. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 2, p. 180-183, 2003.

BIER, M. C. J. et al. Liquefied gas extraction: A new method for the recovery of terpenoids from agroindustrial and forest wastes. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 97-102, 2016.

BIGATON, D. et al. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. *Revista Ciência Agrônômica*, v. 44, n. 4, p. 757-763, 2013.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BOZAN, B.; TEMELLI F. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of flaxseed. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 79, p. 231-235, 2002.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21-33, 2005.

BULLEY, N. R. et al. Supercritical Fluid Extraction of Vegetable Oil Seeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 8, p. 1362-1365, Aug. 1984.

CAPASSO, F.; PASQUALE, R.; GRANDOLINI, G. **Farmacognosia: Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali**. 2. ed. Itália: Springer Science & Business, 490 p. 2011.

CAPELETTO, C. Chemical Composition, antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) seed extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and compressed n-butane, **Journal Supercritical Fluids**, v. 110, p. 32-38, 2016.

CARNELOSSI, P. R. et al. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 399-406, 2009.

CHOHAN, S. et al. Efficacy of few plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, the cause of corm rot of *Gladiolus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 3887-3890, 2011.

COELHO, R. A. **Obtenção de óleo de sementes de quiuí (*actinidia deliciosa*) utilizando extração com solvente pressurizado e extração assistida com ultrassom**. 2015. 76 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, SC, 2015.

CORDOVA-ALBORES, L. C. et al. Chemical compounds of a native *Jatropha curcas* seed oil from Mexico and their antifungal effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. **Industrial Crops Products**, v. 62, p. 166-172, 2014.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CREMONEZ, P. A. et al. Tremoço: Manejo e Aplicações. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 2, p. 98-108, 2013.

CRUZ, M. E. S.; et al., Plant extracts for controlling the post-harvest anthracnose of banana fruit - **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 4, supl.I, p. 727-733, 2013.

Dal Prá, V. et al. Extraction of bioactive compounds from palm (*Elaeis guineensis*) pressed fiber using different compressed fluids, *J. Supercrit. Fluids*, 112, p. 51-56, 2016

DAMBOLENA, J. S. et al. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 410–414, 2010.

DANANJAYA, S. H. S. *In vitro* and *in vivo* antifungal efficacy of plant based lawsone against *Fusarium oxysporum* species complex. **Microbiological Research**, v. 201, p. 21-29, 2017.

DE CAL, A. et al. Management *Fusarium* wilt on melon and watermelon by *Penicillium oxalicum*. **Biological Control**, v. 51, p. 480–486, 2009.

DOMINGUES, R. J.; et al., Potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Summa phytopathol.** [online], v. 37, n. 3, p. 149-151, 2011.

DOUSSEAU, S. et al. Germinação de sementes de Tanchagem (*Plantago tomentosa* Lam.): influência da temperatura, luz e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 443-438, 2008.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Rev. Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 26, , n. 2, p.446-452, abr./jun. 2006.

ETHUR, L. Z. et al. Presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico cultivado com tomateiro e pepineiro, em horta e estufa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 19-26, jan./fev. 2008.

FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. B. de; SOARES, G. L. G. Potencial alelopático do Capim-Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Revista Brasileira de Semente**, Porto Alegre, v. 30, p. 43-50, 2008.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of Black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 263-269, 2002.

FUENTES, E.; PLANCHUELO, A. M. Wild lupins as pioneers on riverside sandbanks. In: VAN SANTEN, E. et al. *Lupin, an Ancient Crop for the New Millenium*. Proceedings of the 9th International Lupin Conference, 20–24 Jun., 1999, Klink/Müritz, pp. 316–319.

GARCIA, R. Á. et al. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.

GLADSTONE, J. S. Distribution, origin, taxonomy and importance. In: GLADSTONES, J. S.; ATKINS, C. A.; HAMBLIN, J. *Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization*. **CAB. International**. Cambridge, UK, p. 1–37, 1998.

GOUFO, P.; TRINDADE, H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and phytic acid. **Food Science & Nutrition**, v. 2, p. 75–104, 2014.

GRANADA, C. E. Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among Bradyrhizobium sp. symbionts of *Lupinus albescens* plants growing in arenized and non-arenized áreas. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 323–329, 2015.

GRUS, V. M. Germinação de sementes de Pau-ferro e Cassia javanica submetidas a tratamentos para quebra de dormência. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 2, n. 6, p. 29-35, 1990.

GULLINO, L.M. et al. Fusarium wilts of ornamental crops and their management. **Crop Protection**, v. 73, p. 50-59, jul. 2015.

HAMDAN, D. et al. Secondary metabolites of ponderosa lemon (*Citrus pyriformis*) and their antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. **Z Naturforsch C** **66**:385-393 (2011).

HASHEM, M. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. **Crop Protection**, v. 29, p. 1111–1117, oct. 2010.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M. G. et al. Estudo Fitoquímico e Alelopático do Extrato de Caule de Sucupira-Branca (*Pterodon emarginatus*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 25, n. 4, 2007.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2495-2511, 2010.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, Lyon, France: IARC., v. 82, p. 301-366, 2002.

ÍNDICE FUNGORUM - Landcare Research e RBG. Kew : Mycology, 2016. Disponível em: Acesso em 25.05.2017. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012. Improving public health through mycotoxin control. IARC Scientific Publication nº158, Lyon, France.

JABRAN, K. et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Crop Protection**, v. 72, p. 57-65, 2015.

JIMENÉZ, M. et al. Sugars and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 185–193, 2003.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grapeskin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5207–5213, 2003.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663 p.

KLEIN, A. P. P. **Estudo fitoquímico das folhas de capim annoni-2 (Eragrostis plana Nees) coletadas no inverno e verão**. 2015. 103 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2015.

KNEZ, Z. et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235-243, 2014.

KOONA, S.; BUDIDA, S. Antibacterial Potential of the Extracts of the Leaves of *Azadirachta indica* Linn. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 3, n. 1, p. 65-69, 2011.

- KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, out./dez. 2005.
- LAOKULDILOK, T. et al. Antioxidants and Antioxidant Activity of Several Pigmented Rice Brans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 193–199, 2011.
- LARENA, I. et al. Biocontrol of Fusarium and Verticillium wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. **Journal of Phytopathology**, v.151, p. 507–512, 2003.
- LEMOS, T. L. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory manual**. Ames: Blackwell, 388 p., 2006.
- LI, J. et al. Potential allelopathic effects of volatile oils from *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl on wheat. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39 p. 56-63, 2011.
- Li, R. Y. et al. Naturally produced citral can significantly inhibit normal physiology and induce cytotoxicity on *Magnaporthe grisea*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 118, p. 19-25, 2015.
- LICATA, M. et al. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian oregano biotypes. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, p. 293-306, 2015.
- Lupinus in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29743>>. Acesso em: 09 Jun. 2017
- MACÍAS, F. A. et al. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 179–194, 2008.
- MEDEIROS, C. A. M.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; TORRES, A. L. **Efeito de extratos aquosos de plantas na oviposição da traçadas-crucíferas, em couve**. Bragantia, v. 64, n. 2, p. 227-232, 2005.
- MANTELL, C. et al. Supercritical fluid extraction. In: RAMASWAMY, S.; HUANG, H. J.; RAMARAO, B. V. **Separation and Purification Technologies in Biorefineries**. First ed. John Wiley & Sons, Ltda, p. 79–100, 2013.
- MARANGONI, C.; MOURA, N. F.; GARCIA, F. R. M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 6, n. 2, p. 95-112, 2012.

MARCHIORI, J. N. C. Vegetação e areais no sudoeste rio-grandense. **Ciência e Ambiente**, Santa Maria, n. 11. p. 81-92. 1995.

MARTÍNEZ, J. et al. Multicomponent Model to Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 5, p. 1057-1063, 2003.

MARTÍNEZ-ALCALÁ, I.; WALKER, D. J.; BERNAL, M. P. Chemical and biological properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* alter soil heavy metal fractionation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 595–602, 2010.

MASCHIETTO, V. et al. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins and antioxidant enzyme activities triggers maize resistance towards *Fusarium verticillioides*. **Journal of Plant Physiology**, v. 200, p. 53-61, Aug. 2016.

MASCHIETTO, V. et al. Resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin accumulation in maize inbred lines involves an earlier and enhanced expression of lipoxygenase (LOX) genes. **Journal of Plant Physiology**, v. 188, p. 9-18, 2015.

MASHESHWAR, P. K.; MOHARRAM, S. A.; JANARDHANA, G. R. Detection of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* in paddy (*Oryza sativa*. L) using polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 134–138, 2009.

MAZZONI, E. et al. Field control of *Fusarium* ear rot, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), and fumonisins in maize kernels. **Pest Management Science**, v. 67, p. 458–465, Apr. 2011.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 51, p. 10-16, 2009.

MOGHADDAM, M.; MEHDIZADEH, L. Variability of total phenolic, flavonoid and rosmarinic acid content among Iranian basil accessions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, p. 535-540, 2015.

MONTEIRO, R.; MONTEIRO, R. T. R. Wotes na the economic aspects of *Lupinus* L. (Leguminosae) – case for studies with Brazilian species. **Arquivos Biology Technology**, v. 29, p. 685-694, 1986.

MORAES, M. N. et al. Extraction of tocotrienols from annatto seeds by a pseudo continuously operated SFE process integrated with low-pressure solvent extraction for bixin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 262-271, 2015.

MOURA, L. S. **Obtenção por extração supercrítica do extrato de Funcho (*Foeniculum vulgare*): determinação das isothermas de rendimento global, de**

**parâmetros cinéticos e do equilíbrio de fases.** 2004. 141 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NOBRE, B.P. et al. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Pigments From *Bixa Orellana* Seeds (Experiments and Modeling). Brazilian. **Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 2, p. 251-258, 2006.

OKWU, D. E.; AWURUM, A. N.; OKORONKWO, J. I. Phytochemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of extracts from *Citrus* plants against *Fusarium oxysporum* of okra plant (*Hibiscus esculentus*). **African Crop Science Society Conference**, v. 8, p. 1755-1758, 2007.

OLIVEIRA, D. A. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinífera*) das variedades merlot e syrah.** 2010. 211 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

OLIVEIRA, S. C. C. et al. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta botânica brasileira**, v. 26 n. 3, 2012.

PAVARINI, D. P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, 2012.

PERREIRA, M. J. Z. **Resistência do feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** 2007. 115 p. Tese (doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2007.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1287-1296, 2008.

PERRUT, M. Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issues. **Industrial Engineering Chemical Research**, v. 39, p. 4531-4535, 2000.

PIANTINO, C. R. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **Journal of Fluids**, New York, v. 47, p. 209-214, 2008.

PINHEIRO, M. **O gênero *Lupinus* L. (leguminosae-faboideae) no Rio Grande do Sul, Brasil.** 2000. 120p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

PINHEIRO, M.; MIOTTO, S. T. S. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul. Fasc. 27. Leguminosae: Forbideae, gênero *Lupinus* L. **Boletim do Instituto de Biociências**, n.60. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 100 p. 2001.



PITAROKILI, D. et al. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3294-3301, 2003.

PLANCHUELO, A. M.; DUNN, D. B. The simple leaved lupines and their relatives in Argentina. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 71, n. 1, p. 92–103, 1984.

PLODPAI, P. et al. *Desmos chinensis*: a new candidate as natural antifungicide to control rice diseases. **Industrial Crops and Products**, v.42, p. 324-331, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.05.038.

PONTIN, M. et al. *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. **Phytochemistry**, v. 115, p. 152-160, 2015.

POULIOT, Y.; CONWAY, V.; LECLERC, P. Separation and Concentration Technologies in Food Processing. In: CLARK, S.; JUNG, S.; LAMSAL, B. **Food Processing: Principles and Applications**. Second ed. John Wiley & Sons, Ltda, p. 33–60, 2014.

QUISPE-CONDORI, S. et al. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 40-48, 2005.

RAEISI, S. et al. Variability in the essential oil content and composition in different plant organs of *Kelussia odoratissima* Mozaff. (Apiaceae) growing wild in Iran. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, p. 283-288, 2015.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RAZAVI, S. M. et al. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 18, n. 1, p. 1-5, jan./mar. 2008.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146-166, 2006.

REVERCHON, E.; DONSI, G.; SESTI OSSÉO, L. Modeling of Supercritical Fluid Extraction from Herbaceous Matrices. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 32, p. 2721-2726, 1993.

RIBAS, M.C. et al. Study of candeia oil extraction using pressurized fluid and purification by adsorption process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 177-182, 2014.

ROMBAUT, N. et al. Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, n. 4, p. 530-544, 2014.

ROMERO, A. L. et al., Atividade do Óleo Essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) Contra Fungos Fitopatogênicos - UNOPAR Cient., **Ciênc. Biol. Saúde**, v. 11, n. 4, p. 15-8, 2009.

ROVEDDER, A. P. M. et al. Análise da composição florística do campo nativo afetado pelo fenômeno da arenização no sudoeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 501-503, out./dez., 2005.

ROVEDDER, A. P. M. **Potencial do *Lupinus albescens* Hook. & Arn. Para recuperação de solos arenizados do Bioma Pampa**. 2007. 145p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, p. 167–174, 2000.

SAGARAM, U. S.; KOLOMIETS, M.; SHIM, W. B. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*-maize system. **The Plant Pathology Journal**, v. 22, p. 203–210, 2006.

SAHENA, F. et al. Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 240-253, 2009.

SALLET, D. et al. Obtaining fatty acids from *Mortierella isabellina* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 79-87, 2017.

SAMSUDIN, N. I. Efficacy of fungal and bacterial antagonists for controlling growth, FUM1 gene expression and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* on maize cobs of different ripening stages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 246, p. 72-79, Apr. 2017.

SANDLER, S. I. **Chemical and Engineering Thermodynamics (second edition)**. New York: Wiley Inter Science, p. 622, 1989.

SANTIAGO, R.; CAO, A.; BUTRÓN, A. Genetic factors involved in fumonisin accumulation in maize kernels and their implications in maize agronomic management and breeding. **Toxins**, v. 7, p. 3267–3296, 2015.

SANTOS, P. L. et al. **Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas**. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17, p. 2563, 2013.

SARGENTI, S. R.; LANÇAS, F. M. Influence of the extraction mode and temperature in supercritical fluid extraction of brazilian *citrus*. Part I. Riva Del Garda. **International Symposium on Capillary Chromatography**, Riva Del garda, p.1800-1812, 1994.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 125-138, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v. 30, p. 129-137, 2000.

SCOPEL, R. **Incorporação de modelos termodinâmicos na modelagem matemática de processos de extração supercrítica**. 2013. 84 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013.

SILVA, G. F. **Extração Supercrítica de *Lycopodium clavatum* L.** 2014. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014a.

SILVA, J. L. et al. Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. *Revista brasileira plantas medicinais*, Botucatu, v.16, n.3, July/Sept. 2014b.

SILVA, J. L. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. **Revista Verde**. Mossoró – RN – Brasil, v.7, n.1, p. 80-86, jan./mar. 2012.

SILVA, J. R. F. et al. Influence of ultrasound and compressed liquefied petroleum gas on xylanase activity – **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, p. 109-116, 2014c.

SILVA, J. R. F. et al. Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity - **Biocatalysis Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 102-107, Apr. 2013.

SILVA, M. B. et al. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 57-60, set. 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª edição, Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000.

SIMÕES, M. C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2002

SOARES, J. F. et al. Extraction of rice bran oil using supercritical CO<sub>2</sub> and compressed liquefied petroleum gas. **Journal of Food Engineering**, v. 170, p. 58-63, 2016a.

SOARES, J. F. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of black poplar (*Populus nigra* L.) extract: Experimental data and fitting of kinetic parameters. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 117, p. 270-278, 2016b.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>-I: Modeling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, p. 409-414, 1994.

SPARKS, D. et al. Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 83, p. 885-891, 2006.

SPRENT, J. I. Nodulation as a taxonomic tool. In: HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A. eds. **Advances in legume Systematics**. Kew: Royal botanic gardens, p. 21-44, 2000.

STĘPKOWSKI, T. et al. Diversification of Lupine Bradyrhizobium strains: Evidence from nodulation gene trees. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3254-3264, 2007.

SUKORINI, H.; SANGCHOTE, S.; KHEWKHOM, N. Control of postharvest green mold of citrus fruit with yeasts, medicinal plants, and their combination. **Postharvest Biology and Technology**, v. 79, p. 24-31, 2013. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2013.01.001.

TALAMINI, V.; STADNIK, M.J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. (eds). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: UFSC, p. 143-157, 2004.

TUR, C. M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 2, 2010.

TZIA, C.; LIADAKIS, G. **Extraction optimization in food engineering**. New York: Marcel Dekker, 442p., 2003.

VAISHNAV, P.; DEMAIN, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223-229, 2010.

VÁZQUEZ, S. et al. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 177, p. 349-365, 2006.

VENTUROSOSO, L. D. R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VENTUROSO, L. R. et al. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 499-505, 2010.

VIDAL, R. **Interação Negativa entre Plantas: Inicialismo, Alelopatia e Competição**. Porto Alegre: Evangraf, 130 p. 2010.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Documento: Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, n. 316, p. 7-15, 2010.

WANG, Y. et al. First report of *Fusarium oxysporum* causing stem rot on *Philodendron oxycardium* in China. *Plant Disease*, v. 100, n 3 650 p., 2016.

WOLOSHUK, C. P.; SHIM, W. B. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 94–109, 2013.

Yusnawan E, Inhibition of Spore Germination of *Phakopsora Pachyrhizi* Using Crude Extracts of *Amaranthus Spinosisus*. *Procedia Food Sci* **3**:340-347 (2015).

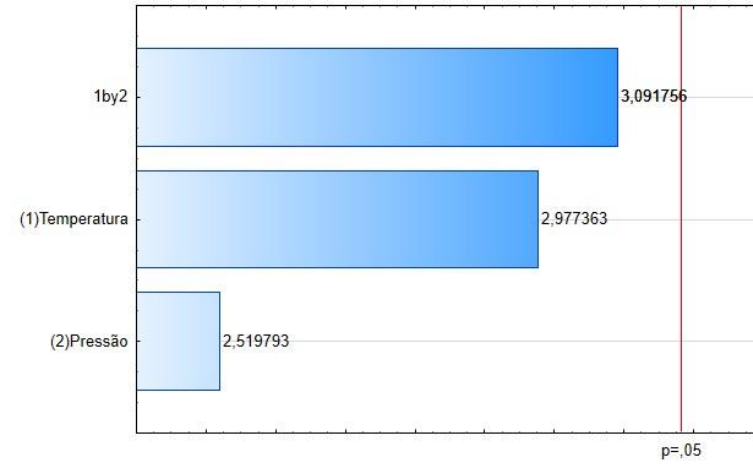
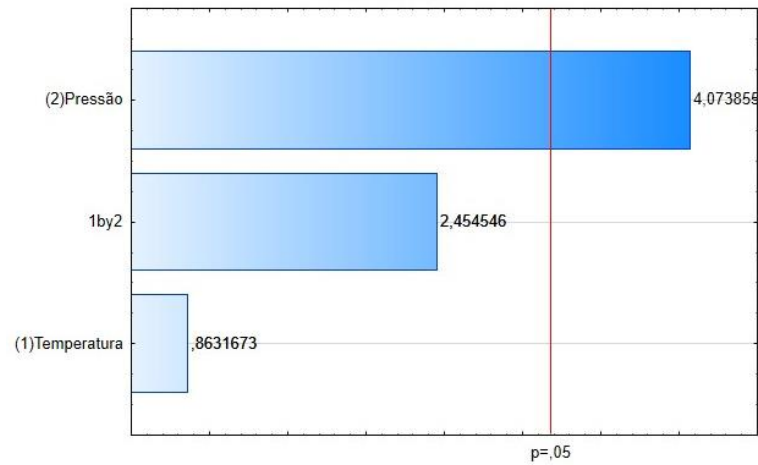
YANG, C.; TEO, K. C.; XU, Y. R. Butane extraction of model organic pollutants from water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 108, p. 77-83, 2004.

YIN, J.Z. et al. Analysis of the operation conditions for supercritical fluid extraction of seed oil. **Separation and Purification Technology**, v. 43, p.163-167, 2005.

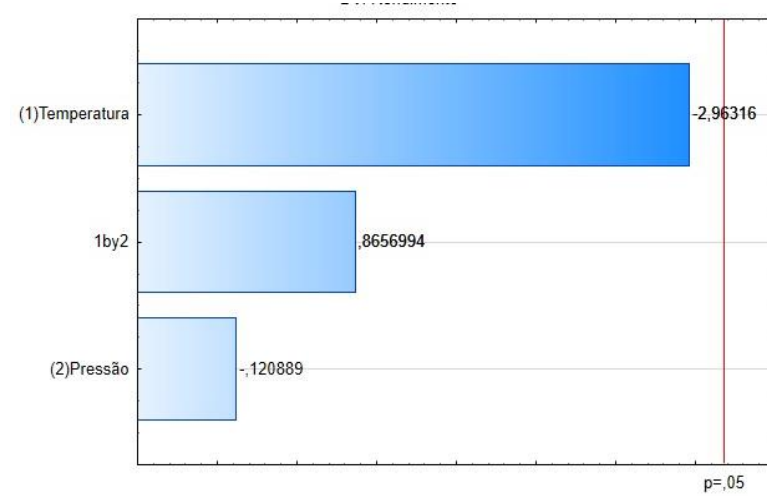
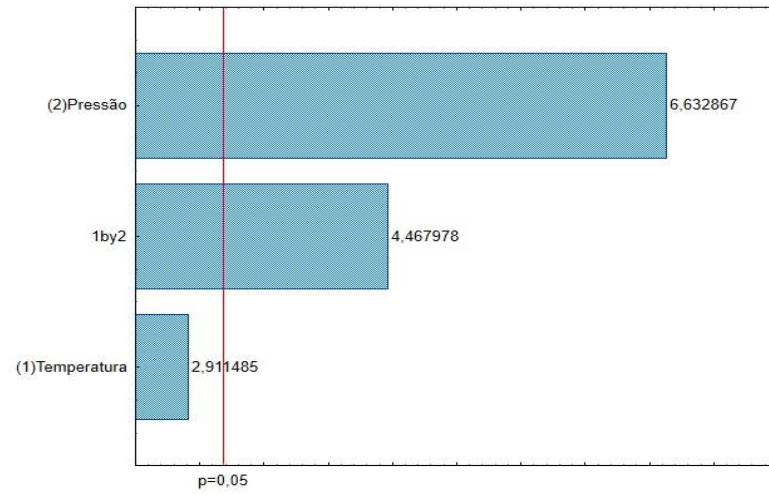
ZABOT, G. et al. Influence of the bed geometry on the kinetics of the extraction of clove bud oil with supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 56-66, Sep. 2014.

**ANEXOS**

Anexo A- Efeito para as variáveis, temperatura e Pressão, estudadas nas matrizes Folhas, utilizando CO2 supercrítico e GLP comprimido, respectivamente.

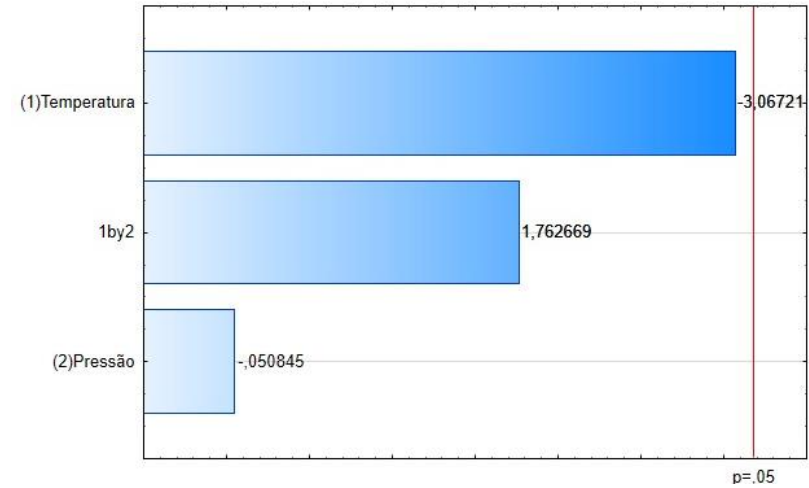
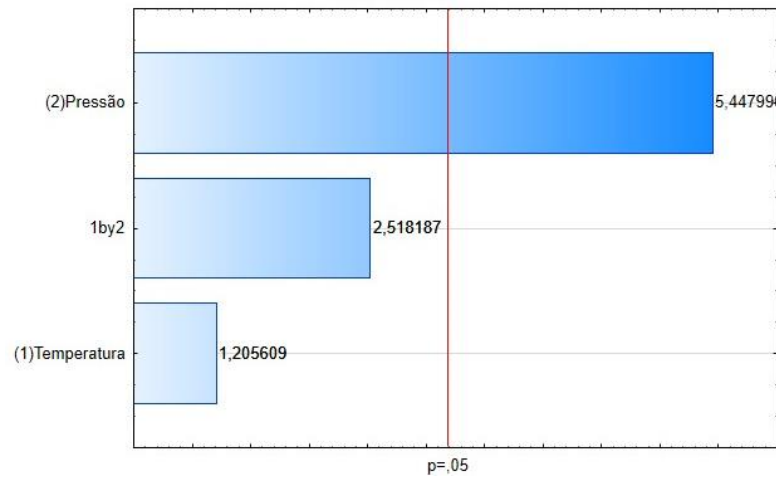


Anexo B- Efeito para as variáveis, temperatura e Pressão, estudadas nas matrizes Flores, utilizando CO2 supercrítico e GLP comprimido, respectivamente.





Anexo C- Efeito para as variáveis, temperatura e Pressão, estudadas nas matrizes Caules, utilizando CO2 supercrítico e GLP comprimido, respectivamente.



Anexo D- Efeito para as variáveis, temperatura e Pressão, estudadas nas matrizes Raízes, utilizando CO2 supercrítico e GLP comprimido, respectivamente.

