

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

Camila Berger

**EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS
QUÍMICOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DA CASCA DE *Acacia*
mearnsii De Wild.**

Santa Maria, RS
2021

Camila Berger

**EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS
ANTIOXIDANTES A PARTIR DA CASCA DE *Acacia mearnsii* De Wild.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), na Área de Tecnologia de Produtos Florestais, como requisito parcial para obtenção do Título de **Doutora em Engenharia Florestal**.

Orientador: Prof. Dr. Darci Alberto Gatto
Coorientador: Prof. Dr. Clovis Roberto Haselein

Santa Maria, RS
2021

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pela autora.

Berger, Camila

Extração supercrítica para obtenção de compostos químicos antioxidantes a partir da casca de *Acacia mearnsii* De Wild. / Camila Berger.- 2021.

71 p.; 30 cm

Orientador: Darci Alberto Gatto

Coorientador: Clovis Roberto Haselein

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2021

1. Extração por gás carbônico supercrítico 2. Química verde 3. Tanino vegetal 4. Filmes a base de materiais sustentáveis 5. Embalagem ativa I. Gatto, Darci Alberto II. Haselein, Clovis Roberto III. Título.

© 2021

Todos os direitos autorais reservados a Camila Berger. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: camilaberger@live.com

Camila Berger

**EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS
ANTIOXIDANTES A PARTIR DA CASCA DE *Acacia mearnsii* De Wild.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), na Área de Tecnologia de Produtos Florestais, como requisito parcial para obtenção do Título de **Doutora em Engenharia Florestal**.

Aprovado em 30 de agosto de 2021:

**Darci Alberto Gatto, Dr. (UFSM/UFPel)- Videoconferência
(Presidente/Orientador)**

André Luiz Missio, Dr. (UFPel)- Videoconferência

Pedro Henrique Gonzalez de Cademartori, Dr. (UFPR)- Videoconferência

Silvia Helena Fuentes da Silva, Dra. (UFPel)- Videoconferência

Cristiane Pedrazzi, Dra. (UFSM)- Videoconferência

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças a muitas pessoas envolvidas direta e indiretamente e aos órgãos públicos federais.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal (PPGEF) pela oportunidade no desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento no período de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro do projeto de pesquisa.

Agradeço aos meus pais Rosane Berger e Mauri Berger e minha irmã Caroline Berger pela paciência, compreensão pelas minhas ausências, pela ajuda e apoio em todos os momentos e pelo amor incondicional.

Ao meu orientador, prof. Dr. Darci Alberto Gatto, pela grande oportunidade, confiança, ensinamentos e apoio na elaboração deste trabalho. Ao André Luiz Missio por ajudar com a elaboração do projeto, pela ajuda e compreensão, fundamentais para o início desta pesquisa.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, em especial ao Pedro Jorge Goes Lopes e Henrique Weber Dalla Costa por toda ajuda, principalmente nos momentos mais difíceis e decisivos, pelas conversas, pelo apoio, amizade e parceria. Ao Rodrigo Coldebella por toda parceria desde o início do mestrado e ajuda no início desta pesquisa, assim como a Marina Gentil pela sensibilidade, disponibilidade e amizade ao longo do doutorado. A Émilie Scheunemann e ao Estevan Cruz pela grande ajuda, gentileza e amizade durante os trabalhos no LAPAM.

As minhas amigas, Paula Kettenhuber, Carla Moro Bitencourt Sanfelice, pela amizade e pela ajuda nos dias mais difíceis e pelos momentos de alegria compartilhados desde a faculdade.

Ao Atahualpa Ayala, Fernanda Andrade e a Bianca Andreis da Cunha por todo suporte, carinho e amizade incondicional.

Aos meus avós, principalmente a minha avó Ivone Maria Berger e ao meu avô Bruno Oswaldo Scherwitz que hoje não se fazem mais presentes, mas que em todos os momentos da minha vida me apoiaram, me ajudaram e compreenderam minhas ausências. Juntamente de meus familiares tias, tios, primos e primas, que sempre torceram por essa conquista e se orgulham dela.

Muito Obrigada!

RESUMO

EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DA CASCA DE *Acacia mearnsii* De Wild.

AUTORA: Camila Berger

ORIENTADOR: Darci Alberto Gatto

Processos de extração de menor impacto ambiental e maior eficiência, aliados ao conceito da bioeconomia, vêm sendo estudados e aprimorados para a geração de compostos de alto valor biológico. Como é o caso da extração por gás carbônico supercrítico que pode ser utilizada como método de extração seletivo de compostos de interesse. Compostos esses, como os fenólicos, que atualmente tem aplicações desde área farmacológica e alimentícia, até materiais avançados, como filmes anti-UV e de alta capacidade antioxidante. Métodos de extração convencionais têm sido empregados, porém além do tempo de extração ser alto, certos compostos de interesse podem não ser extraídos totalmente ou degradados no processo, o que dificulta também a caracterização química e potencialidade. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi aliar a extração por gás carbônico supercrítico potencializado com etanol e água, com o intuito de melhorar o extrato advindo das cascas de acácia negra (*Acacia mearnsii*) quanto a compostos antioxidantes, fenólicos e taninos condensados. Assim como objetivou-se a aplicação deste extrato na produção de materiais mais específicos, como filmes à base de nanocelulose como potencial agente antioxidante. Os extratos de taninos em pó foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, atividade antioxidante, conteúdo de fenólicos e taninos. A eficácia e potencialidade do extrato de mimosa foi avaliada nos filmes através de suas propriedades físicas, químicas e mecânicas. A extração por gás carbônico supercrítico e etanol proporcionou diminuição do tempo de extração e aumento da concentração de fenólicos e tanino condensado em relação a extração industrial. Bem como, temperatura e consumo de solventes foram menores. A fração com água, utilizada como comparativo, apresentou maior rendimento de extração, já a fração com etanol maior capacidade antioxidante. Esses resultados mostram-se promissores na obtenção de compostos de alta capacidade antioxidante, conteúdo de fenólicos e taninos condensados em atmosfera sob pressão, ausência de luz e oxigênio em curto período de tempo e baixo consumo de solvente. A fração com água foi utilizada como agente antioxidante na formulação de filmes à base de nanocelulose e alginato. O extrato advindo da extração supercrítica diminuiu a hidrofobicidade desses filmes e pouco influenciou na resistência à tração (87 MPa). O alginato influenciou positivamente na matriz nanocelulósica conferindo maior resistência, porém aumentou a hidrofobicidade dos filmes. Contudo, os filmes produzidos apresentaram potenciais características e propriedades para aplicações como filmes ativos para embalagens temporárias, visando aumento no tempo de prateleira de alimentos secos e em embalagens de produtos farmacêuticos sensíveis a luz.

Palavras-chave: Gás Carbônico Supercrítico. Polifenólicos. Atividade Antioxidante. Filmes Ativos.

ABSTRACT

SUPERCRITICAL EXTRACTION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM *Acacia mearnsii* De Wild. BARKS

AUTHOR: Camila Berger
ADVISOR: Darci Alberto Gatto

Low environmental impact extraction process aligned to bioeconomy concepts have been recently applied to obtain high biological value products. One of them is supercritical carbon dioxide extraction, which can be used as a selective extraction method or as a pre-treatment for a wide range of analytes, such as phenolics. Phenolics are applied in the pharmacological and food industry, as well as recently in advanced materials field, such as biofilms, due to high antioxidant capacity and anti UV capacity. Conventional extraction methods have been used however, the extraction time is high and some interesting compounds may not be fully extracted or degraded in the process, which also makes chemical characterization difficult. So, the aim of this work was applying supercritical carbon dioxide extraction method aligned with ethanol and water to enhance *Acacia mearnsii* (black wattle or mimosa) bark extract regards to antioxidants, phenolic and condensed tannins compounds. Mimosa extract was incorporate as potential antioxidant agent in the production of more specific materials such as nanocellulose-based films. The tannin powder extracts were characterized by infrared spectroscopy, antioxidant activity, phenolic and tannin content. The effectiveness and potential of mimosa extract on films was evaluated through physical, chemical, thermal and mechanical properties. The extraction by supercritical carbon dioxide and ethanol resulted in decreased extraction time and increased concentration of phenolics and condensed tannin compared to industrial extraction. The water fraction extract used as a reference showed a higher extraction yield, while the ethanol fraction presented a higher antioxidant activity. Demonstrating promising results to extract high antioxidant compounds, phenolics and condensed tannins under pressure atmosphere with absence of light and oxygen. The water fraction was incorporate as antioxidant agent in the formulation of natural films based on nanocellulose and alginate. The supercritical extract decreased the hydrophilicity of these films and the tensile strength was not significantly affected (87 MPa). The alginate provided greater strength, but also increased hydrophilicity. Nanocellulose based supercritical tannin films showed potential characteristics and properties for applications as active films for temporary packaging to increase shelf life of dry foods or pharmaceutical light sensitive products.

Keywords: Supercritical Carbon Dioxide. Polyphenolics. Antioxidant Activity. Biofilms.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
3 ARTIGO 1 – ENHANCING PHENOLIC COMPOUNDS FROM SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION FROM <i>Acacia mearnsii</i> De Wild. BARK	17
Introduction	17
Material and methods	20
<i>Raw materials</i>	20
<i>Soxhlet extraction</i>	20
<i>Supercritical fluids extraction</i>	21
<i>Total phenolic content (TPC)</i>	22
<i>Total condensed tannin (TCT)</i>	22
<i>Infrared spectroscopy</i>	23
<i>Antioxidant activity</i>	23
<i>Data analysis</i>	23
Results and discussion	24
<i>Solvent extraction</i>	24
<i>Supercritical extraction</i>	25
<i>Ethanol as co-solvent</i>	25
<i>Ethanol × water as co-solvent</i>	29
<i>FT–IR analysis</i>	31
<i>Antioxidant activity</i>	33
Conclusion	35
References	36
Complementary materials	43
4 ARTIGO 2 - FILMES DE CELULOSE NANOFIBRILADA E TANINOS: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	44
Introdução	45
Material e métodos	47
<i>Matéria-prima</i>	48
<i>Fabricação dos filmes</i>	48
<i>Caracterização morfológica e física</i>	49

<i>Molhabilidade</i>	49
<i>FTIR-ATR</i>	50
<i>Análise termogravimétrica</i>	50
<i>Resistência mecânica</i>	50
Resultados e discussão.....	50
<i>Morfologia da superfície e interações químicas dos filmes</i>	51
<i>Estabilidade térmica</i>	56
<i>Comportamento mecânico</i>	57
Conclusão	59
Referências	59
5 DISCUSSÃO	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	69

1 APRESENTAÇÃO

A tese foi elaborada na forma de artigos científicos com o objetivo de destacar as principais contribuições sobre a pesquisa e facilitar melhor compreensão do trabalho pelo leitor. A tese tem como principais contribuições o aprofundamento científico sobre o tanino condensado obtido de biomassa renovável e abundante a partir de método de menor impacto ambiental e sobre a aplicação e comportamento do mesmo em filmes de nanocelulose.

O Artigo 1 foi abordada a otimização ponto a ponto dos parâmetros do processo de extração por gás carbônico supercrítico e etanol para extrair compostos químicos antioxidantes utilizando etanol as cascas de *Acacia mearnsii*. Posteriormente a água foi utilizada como co-solvente para conjuntamente avaliar a eficácia deste método quanto ao rendimento da extração, bem como na extração de compostos químicos de alta capacidade antioxidante. Objetiva-se a máxima eficiência e qualidade a partir desta biomassa, a fim de encontrar extratos potenciais para diversas áreas de aplicações na área farmacológica, cosmética e de embalagens ativas.

O Artigo 2 utilizou-se então o extrato advindo da extração por gás carbônico supercrítico e água na produção de filmes a base nanocelulose com o objetivo de encontrar filmes potenciais para serem substitutos de filmes utilizados em embalagens não sustentáveis. Estudou-se a influência da incorporação de um extrato de tanino diferenciado como agente antioxidante nas características funcionais desses filmes, bem como nas propriedades físicas, térmicas e mecânicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Compostos fenólicos obtidos a partir de diferentes tipos de biomassa vêm sendo utilizados cada vez mais pelas indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias devido a suas propriedades antioxidantes. A exemplo disso, a extração de taninos (compostos fenólicos) a partir de cascas de acácia negra tem recebido grande interesse devido a sua abundância, baixo custo e multifuncionalidade. Contudo, alguns processos de extração comumente utilizados demandam tempo e acabam reduzindo essa capacidade antioxidante, o que poderia ser evitado com a extração por dióxido de carbono supercrítico. Uma vez que, na mesma a extração ocorre em extrator selado sem a presença de luz e oxigênio, diminuindo assim reações de degradação (FARIAS-CAMPOMANES et al. 2015). Além disso, é possível obter altos rendimentos de extração em curtos períodos de tempo aliado a alta qualidade dos extratos por também permitir trabalhar com temperaturas amenas, reduzindo assim a degradação de compostos termossensíveis (JAHROMI et al. 2019).

A extração de compostos orgânicos de interesse por meio de fluidos supercrítico, pode ser aplicada com foco em isolar certo componente químico dotado de propriedades com alto valor comercial, mas também para remover componentes indesejáveis dessa matéria-prima. Comumente é utilizada na extração da cafeína do café e chá, e mais recentemente na remoção de impurezas ou até mesmo extração de polímeros (CALGARO et al., 2017; IÇEN; GÜRÜ, 2009; KIRAN; BRENNECKE, 1992). Atualmente dentre os fluidos supercríticos, o dióxido de carbono (CO₂) vem sendo bastante utilizado na extração de substâncias com significativa capacidade antioxidante compostos de fenólicos e taninos, a partir de diversas partes de plantas e resíduos agroindustriais (MANJARE; DHINGRA, 2019), por exemplo desde madeira a cascas (OSTOLSKI et al. 2021), resinas (REIS et al. 2020) e folhas (LEYVA-JIMÉNEZ et al. 2020). Trata-se de um fluido de relativa abundância, baixo preço e que propriedades entre líquidos e gases em condições supercríticas (DESIMONE, 2002). Condições essas em que temperatura e pressão estão acima dos pontos críticos do solvente, no caso do CO₂ a pressão e temperatura crítica mínima é 73 bar e 31°C, respectivamente. Em outras palavras, apresenta densidade próxima à dos líquidos, viscosidade próxima a dos gases e coeficiente de difusão relativamente alto (AL JITAN; ALKHOORI; YOUSEF, 2018). Variando pressão e temperatura é possível variar a densidade do fluido e assim a solubilidade dos compostos de interesse (RAD; SABET; VARAMINIAN, 2019). Somado a isso, a difusividade dos solutos em fluidos supercríticos é maior do que nos líquidos o que facilita o transporte de massa do material em

estudo (JESSOP e LEITNER, 1999).

A extração supercrítica consiste basicamente de um cilindro geralmente de CO₂, de uma bomba de pressão com controle pra transportar o solvente até o vaso extrator (ou reator) e regular a pressão, um aquecedor que permite controlar a temperatura de extração e um recipiente coletor da amostra e ainda pode haver uma bomba para transferência de cossolventes. A extração pode ocorrer de maneira dinâmica, ou seja, há um fluxo contínuo do solvente e/ou do cossolvente sobre o material ou estática (CHAVES et al. 2020). Cossolventes como o etanol ou a água são empregados no processo para aumentar a solubilidade de compostos fenólicos, uma vez que o CO₂ é apolar. Esses cossolventes juntamente com o CO₂ como solvente são considerados ambientalmente corretos, o que torna a extração supercrítica uma alternativa de menor impacto ambiental. Ainda, o CO₂ pode ser reutilizado no processo, é atóxico, não inflamável, inerte e barato (ZHOU et al. 2021).

O custo de instalação da extração supercrítica é alto, o que pode ser atenuado quando a mesma é integrada a uma biorrefinaria, aliando a reutilização do CO₂ com matérias-primas baratas (CHAI et al. 2021). Biomassas abundantes e de baixo custo para a obtenção de produtos de maior qualidade tornam-se interessantes fontes de matéria-prima para serem maximizadas utilizando a extração supercrítica. Como é o caso das cascas de acácia negra (*Acacia mearnsii*), em que poderiam ser utilizadas pra obtenção de compostos fenólicos de alta capacidade antioxidante através deste método de extração. No Brasil e no mundo, a extração industrial desses compostos, ocorre em séries de autoclaves que utilizam água em contra-corrente como solvente sob ação controlada de calor e baixa pressão, durante um período pré-determinado (PIZZI 1994). Portanto no processo é aplicado grande volume de água e consumo de tempo para obtenção do extrato industrial concentrado a ser comercializado (na forma de pó), o que poderia ser evitado com o emprego da extração supercrítica. Uma vez que, a mesma tem mostrado eficiência na extração de compostos fenólicos a rendimentos e períodos de tempo interessantes aliado a alta qualidade dos extratos (SONG et al. 2018).

A extração supercrítica poderia ser uma alternativa mais eficiente e com menor impacto ambiental na extração de compostos fenólicos e taninos condensados, pois já são relatadas propriedades notáveis, como alta capacidade antioxidante (MISSIO et al., 2017; REIS et al. 2020), antimicrobiana e anticarcinogênica (SAMPATHKUMAR; KHACHATOURIANS; KORBER, 2006). Os taninos são compostos polifenólicos naturais, solúveis em água, conhecidos também como proantocianidinas, formados por unidades de flavonóides, principalmente flavan-3-ols de alto peso molecular (LEE; SCHWARTZ, 2006; RICHARDS,

2006; SIDHU; AL-ZENKI, 2006), os quais interagem e precipitam proteínas (HAGERMAN, 2002). São industrialmente comercializados, por exemplo, como agente base de adesivos madeireiros, tanagem do couro, agente floculante para tratamento de águas e efluentes. Esse tipo de extrato apresentando em sua maior composição taninos condensados e outros precursores fenólicos (VENTER et al., 2012). Além de apresentar açúcares, ácidos orgânicos, hidrocolóides e materiais inorgânicos (ARBENZ; AVÉROUS, 2015).

Devido a elevada variedade química do extrato da casca de mimosa e dificuldade de sua caracterização, diferentes técnicas de extração e posterior fracionamento ou purificação vem sendo utilizadas para aprofundar o conhecimento sobre o extrato, além de definir aprimorar aplicações de uso como por meio de métodos cromatográficos (XIONG et al., 2017) e extração sólido-líquido (MISSIO et al., 2017; SEPPERER et al. 2019). De fato, é possível melhor caracterização analítica do respectivo extrato, embora seja necessário a utilização de variadas técnicas, solventes, reagentes e processos em diferentes níveis de complexidade. Já os dois últimos envolvem uma purificação do extrato de acordo com o solvente, embora maior demanda de tempo e solventes, bem como solventes orgânicos inflamáveis e com algum grau de toxicidade seja necessário.

A extração por gás carbônico supercrítico utilizando água como cossolvente já foi realizada pela primeira vez em outro estudo (PANSERA et al. 2004). No entanto, sem o aprofundamento necessário da caracterização analítica dos extratos para conhecer e direcionar os mesmos com maior propriedade, como por exemplo: conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante e peso molecular. Outros métodos como extração por água pressurizada (EAP) e extração assistida por micro-ondas (EAM) que também requerem alto investimento, além da extração assistida por ultrassom (EAU) que é uma técnica barata (HOYOS-MARTÍNEZ et al. 2018) não foram testadas neste trabalho. As duas primeiras principalmente por também apresentarem alto custo de implementação assim como a extração supercrítica. A EAP trabalha com altas temperaturas, a partir da temperatura de ebulição da água (ERŞAN et al. 2018), o que pode causar degradação dos polifenóis presentes no extrato. Bem como a EAM, que mesmo baixa a degradação de taninos condensados ainda assim acaba ocorrendo (RHAZI et al. 2019). Já a EAU que é uma técnica mais barata que as demais como desvantagens a falta de adequado controle da potência e variação do efeito das ondas ultra-som conforme a posição do material dentro do banho (CARREITA-CASAS et al. 2021).

De todo modo, o custo da extração supercrítica pode ser minimizado e é um método que durante a extração não apresenta a influência da luz e oxigênio, além de permitir trabalhar com

temperaturas amenas. Assim, a degradação de compostos fenólicos termo-sensíveis é significativamente reduzida (CHAI et al. 2021). Além disso, há ainda muito o que ser explorado no sentido de também conhecer o comportamento das características peculiares do extrato de mimosa, sob determinado meio para a geração de produtos cada vez mais potencializados. Produtos esses como filmes de nanocelulose para geração de embalagens ativas, que aliem matérias-primas baratas, renováveis a uma produção de baixo impacto ambiental como a extração supercrítica do tanino. O extrato de mimosa funcionando como um agente antioxidante e protetivo da matriz nanocelulósica, natural e biodegradável, para a formação de materiais mais tecnológicos com multifuncionalidades.

A versatilidade da nanocelulose juntamente com um extrato de alta capacidade antioxidante como é o extrato de acácia negra, ambos advindos de fontes naturais e renováveis, vem sendo estudados como potenciais filmes substitutos de filmes sintéticos de baixa biodegradabilidade e a base do petróleo (LI et al.2019; MISSIO et al. 2018). Uma vez que, o extrato de mimosa pode conferir proteção contra a oxidação causada pelos raios ultravioleta (UV), bem como apresenta potencial antimicrobiano podendo melhorar a vida útil de materiais sensíveis a oxidação e a microorganismos. Além disso, apesar de o tanino apresentar coloração escura (marrom-avermelhada) através dos filmes resultantes quando em contato com algum objeto ainda assim é possível observá-lo (MISSIO et al. 2020; LI et al. 2019).

Embalagens ativas são materiais que apresentam componentes ou aditivos que interagem com o alimento ou com o meio entorno do mesmo, além conferirem proteção externa, para proporcionar aumento da vida útil e assim evitar o desperdício de alimentos (VILELA et al 2018). O objetivo é aumentar a vida útil do alimento ou mantê-lo e até mesmo melhorá-lo, exemplo: i) absorventes de umidade (carnes), sachês (capturam oxigênio residual como o etileno); ii) materiais que liberam substâncias como antioxidantes; e também iii) aqueles que não liberam substâncias intencionalmente no alimento, ou seja, ficam imobilizados na embalagem, protegendo o estado do alimento (embalagem antimicrobiana) (EU 2009). Além das embalagens ativas existem as embalagens inteligentes e embalagens bioativas. A primeira está ligada a uma interação do alimento com a embalagem (sem liberar o aditivo ou substância) ou do entorno do mesmo para permitir o monitoramento da qualidade e segurança, como por exemplos indicadores de tempo e temperatura ou amadurecimento, entre outros (MAJID et al. 2018). Já a segunda contempla a inserção controlada de compostos bioativos na embalagem ou revestimento para dar funcionalidade ao alimento ou até mesmo absorver/capturar substâncias geradas pelo alimento ou presentes no mesmo (SALGADO et al. 2019).

A incorporação de tanino condensado em matriz nanocelulósica para formação de filmes funcionais ou embalagens ativas tem sido recentemente estudada (MISSIO et al. 2020) resultando em filmes antioxidantes e com barreira UV. Porém, há ainda o que ser explorado para entender melhor as interações entre esses polímeros (nanocelulose e tanino), bem como melhorá-las para a geração de materiais como filmes funcionais. A utilização de extratos mais “puros”, ou seja, que representem melhor o material de origem pode melhorar funcionalidades como ação antioxidante e foto-protetiva desses filmes. O que pode ser possível utilizando o extrato da acácia a partir da extração por dióxido de carbono supercrítico e água, em que o rendimento de extração permite obter frações com maior concentração de tanino do que o extrato industrial. Extratos de tanino condensado de acácia tem sido fracionado para geração de materiais mais com características químicas mais definidas como baixo peso molecular e de alta capacidade antioxidante (MISSIO et al. 2017) para incorporação em matriz nanocelulósica, mas utilizando solventes tóxicos como o acetato de etila (MISSIO et al. 2020).

Por outro lado, já foram produzidos filmes nanocelulósicos com extrato da indústria utilizando água como solvente (MISSIO et al. 2018). No entanto, esse extrato pode apresentar outros compostos indesejáveis em maior concentração do que um extrato fracionado. Compostos esses como açúcares livres e gomas hidrolizáveis que podem representar até 25% do extrato (SEPPERER e TONDI, 2018). A partir da maximização de uma biomassa renovável, abundante e barata através da extração supercrítica para a formação de produtos com maior valor agregado variando dois solventes considerados ecológicos como a água e etanol, está aliado aos princípios da biorrefinaria. A fração solúvel em etanol poderia ser utilizada como fonte de antioxidante assim como a fração solúvel em água, mas em aplicações como filmes ativos ou funcionais. Principalmente porque a água é um solvente mais barato, embora ambas as frações possam ser utilizadas para esse fim.

Nesse contexto, a partir da extração por dióxido de carbônico supercrítico e com a variação dos parâmetros do processo buscou-se frações com maior reatividade da casca de acácia. Bem como, aplicando-as como agente antioxidante na geração de bioprodutos como filmes ativos e temporários. Visou-se aumentar a versatilidade e potencialidade do produto final, com possibilidade de substituição de filmes derivados do petróleo.

Hipóteses

Extração utilizando dióxido de carbono supercrítico e cossolventes mostra-se eficiente como método de obtenção de frações com alta capacidade antioxidante, alto conteúdo de fenólicos e taninos condensados.

Incorporação de fração com alta capacidade antioxidante advinda da extração supercrítica em matriz nanocelulósica pra formação de filmes ativos e temporários como substitutos a filmes sintéticos derivados do petróleo.

Objetivo Geral

Verificar se a extração por dióxido de carbono supercrítico e cossolventes foi eficiente na obtenção de compostos químicos antioxidantes, fenólicos e taninos condensados advindos da casca de *Acacia mearnsii* De Wild. Além da incorporação de fração com alta capacidade antioxidante a partir desta extração na produção e caracterização de filmes ativos a base de celulose nanofibrilada.

3 ARTIGO 1 – ENHANCING PHENOLIC COMPOUNDS FROM SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION FROM *Acacia mearnsii* De Wild. BARK

Abstract: Supercritical carbon dioxide extraction (ScCO₂) has been studied to extract phenolic compounds with high antioxidant capacity from renewable resources. Short time extraction, low solvent consumption and higher yields are possible to obtain with this extraction method. Extractives from biomasses as mimosa or black wattle (*Acacia mearnsii*) bark are known as one of the highest phenolic compounds resources and so in the last decade has been demonstrating promisor results for a wide range of new applications. So, this work performed an optimization of supercritical carbon dioxide extraction along with ethanol mixtures to enrich phenolic and condensed tannin compounds extracts from mimosa bark. Water was also used as co-solvent with ScCO₂, but with ethanol optimized process parameters as comparative. Soxhlet extraction was also used as comparative. Supercritical carbon dioxide extraction along with ethanol extracted higher total phenolic and tannin content at lowest temperature (50 °C) and time (20 min) than Soxhlet and industrial extraction. Water was the best co-solvent regards to yield extraction, which was also higher than industrial extraction (27%). ScCO₂ and ethanol extraction showed great results to extract high antioxidant compounds (76.4 mmol g⁻¹) at low time, temperature and solvent consumption. Increasing pressure did not promote higher yields. Temperature, solid-liquid ratio and time were more influent to enrich phenolic and condensed tannin extracts.

Keywords: Polyphenols. Tannins. Antioxidant activity. Black wattle.

Introduction

In 2050 world's population will be around 10 billion and, as population increase, the demand for food and durable goods will increase as well environmental impact upon natural resources by petroleum-based products. Thus, green alternatives through extraction methods and biomasses resources are highly important. Plant metabolites aligned to green chemistry is one of these alternatives. Sustainable exploration of an abundant biomass, low price, and renewable to extract condensed tannin is an opportunity to obtain phenolic compounds for food antioxidants, pharmaceutical purposes and advanced materials. Antioxidants has a powerful ability to prevent many diseases as obesity and diabetes (Fraga-Corral et al. 2020; Ogawa et al. 2018). Many techniques and methods have been used to efficiently extract antioxidants from plant materials, one of the promisor alternative method is supercritical carbon dioxide extraction (ScCO₂), which advantages were not clearly tested with mimosa barks (*Acacia mearnsii* De Wild). And one of the promisor biomasses is mimosa or black wattle extracts, which recently in Japan start to be commercially produced as nutritional supplement

(ACAPOLIA[®]), due to remarkable antioxidant properties and safety for human consumption (Yazaki 2015).

Tannins are plant secondary metabolites and are divided in two groups, hydrolysable tannins, such as presented in oak and chestnut, and condensed tannins, as mimosa and quebracho (Hagerman 2002). They are natural water-soluble polyphenolic compounds of high antioxidant capacity and high molecular weight (Lee and Schwartz 2006; Richards 2006; Sidhu and Al-Zenki 2006). Can be found in leaves, fruit peel, seeds, wood and bark tree. Due to high amounts of condensed tannin and phenolics, mimosa bark extracts were mostly explored for leather tanning, wood adhesives (Pizzi et al. 2018), flocculant agent in wastewater treatment e.g., removal of dyes (Grenda et al. 2018) and heavy metals (Lugo et al. 2020), in advanced materials as films (Missio et al. 2018), pharmacological purposes (Ali 2012) and highly potential functional food component to suppress sugar and lipid uptake (Kusano et al. 2011).

Mimosa extract is composed mostly of proanthocyanidin oligomers of 5-deoxyflavan-3-ol units, as robinetinidol and fisetinidol (Kusano et al. 2011), which can represent most of industrial extract that also has sugars, organic acids, hydrocolloids and inorganic materials (Arbenz and Avérous 2015). Fractionate and isolate plant extracts allows to characterize and identify promising compounds as proanthocyanidins from mimosa bark extract by e.g., chromatography (Kusano et al. 2011). On the other hand, simple solid-liquid extraction methods as Soxhlet (Missio et al. 2017; Sepperer et al. 2019) have been shown good alternatives to purify mimosa extract. Purify a natural plant extract as mimosa bark with organic solvents can improve a phenolic like product and then its applicability e.g., bioactive films and thermal insulating tannin-based foams (Missio et al. 2018, 2020; Sepperer and Tondi 2018). However, some drawbacks as expensiveness yet highly efficiency of the chromatography methods and hours to obtain a separate tannin product for the latter, lead to finding other strategies. Mostly to reduce time, solvent consumption and find more green solvents to extracts phenolics at least with the same quality.

Indeed, tannin industrial extraction has economical advantage at the same time high yields of mimosa extract are achieve. However, huge amounts of water are need to obtain an enriched extract. Besides, industrial extract is mostly produced for adhesive and leather tanning industry and just recently was explore for other applications. So, ScCO₂ extraction emerges as potential method to obtain extracts with higher phenolic and tannin content and with economic advantages to compensate high investment costs. Plus, when integrated to biorrefinery concepts, CO₂ reutilization along with cheap raw materials and increase production capacity,

cost of manufacturing can be reduced (Chai et al. 2021). Also, polyphenol degradation or alterations by light and oxygen are avoided as this method perform without the presence of these factors (Fariás-Camponeses et al. 2015). So, it is possible provide optimum conditions for polyphenol extraction.

Supercritical condition is achieved when temperature and pressure are above critical points, for CO₂ is 31 °C and 74 bar, respectively (Chaves et al. 2020). This phase has properties from liquid and gas, low viscosity as in gases and high density as in liquids, but greater diffusivity rates than organic solvents, which allows easy mass transport of the compounds being extracted (Al Jitan et al. 2018; Capuzzo et al. 2013; Cerón-Martinez et al. 2021). At this point, changing temperature and pressure density is modified as well dissolution power, so it is possible to extract selectively target compounds with minimized degradation (Khaw et al. 2017). For example, literature have shown a wide range of natural substances extracted with interesting yields as phenolics from leaves (Garmus et al. 2014), barks (Santos et al. 2012; De Melo et al. 2014; Veggi et al. 2014) and agricultural residues, which was possible extract selectively and efficiently proanthocyanidins and other antioxidants compounds (Da Porto et al. 2014). The plant matrix is highly influent, great yields of tannins and other phenolics compounds are possible through carbon dioxide extraction with high antioxidant properties (Talmaciu et al. 2016) or even not aiming yields, it is possible selectively extract compounds as lupenone (triterpenoid) than Soxhlet extraction (Rodrigues et al. 2021).

CO₂ is a green solvent, non-flammable, non-toxic, odorless, cheap, easily extractable, can be recycled and reused in the system, leaves no trace in the material being extract and also has low critical conditions (Talmaciu et al. 2016). For extraction of polyphenolic compounds there is the need of a polar solvent in the system, known as co-solvent, once CO₂ has non-polar nature (Hoyos-Martínez et al. 2019). However, supercritical extraction with CO₂ can be realized faster than traditional extraction process and possibly lower amount of organic solvent is required to obtain high yields (Bogdanovic et al. 2016). Ethanol has been utilized as co-solvent to extract phenolic compounds in supercritical extraction and others pressure systems (Cea Pavez et al. 2019; Huaman-Castilla et al. 2019; Pilařová et al. 2019), once is able to increase solvation power of the ScCO₂ (Uwineza and Waśkiewicz 2020). Besides, is a greener solvent, once has a renewable origin and low impact production (Tekin et al. 2018).

Due to huge amount of condensed tannins in mimosa bark, they are considered the most abundantly extracted natural substances (Pizzi 2008). Although there is a study about mimosa bark extraction through ScCO₂ by Pansera et al (2004), they did not clearly explore this extract

quality, which require several analytical characterizations to fulfill literature gaps. Thereby, effectively exploitation through supercritical fluid extraction to obtain phenolic-rich extracts from mimosa barks are needed for applications in high advanced materials as active packaging and coating films and as food antioxidant resources. In this context, ScCO₂ and ethanol binary mixture was performed to enhance phenolic compounds from mimosa bark. So, ScCO₂ effectiveness was verified by total phenolic and condensed tannin content, FT-IR, and antioxidant activity.

Material and methods

Raw materials

The mimosa barks (*A. mearnsii*) and industrial tannin were supplied by SETA S/A industry (Estância Velha, Brazil). After harvesting, tree barks were dry at mild temperature for a few hours. Posteriorly, they were dried in an oven with forced air circulator at 35 °C for 24 h, and they were milled with a cutting Wiley mill. Particles which pass through 40 and 60 mesh screen ($0.425 < \varnothing < 0.250$ mm) were utilized for phenolic extraction. Industrial tannin extract was characterized regards to total phenolic and condensed tannin content, resulting in 773 mgGAE g⁻¹ and 680 mgCE g⁻¹, respectively.

Solvents and reagents were supplied by different places as: CO₂ (99.5%) (White Martins, Brazil); ethanol (99.8%) (Êxodo, Brazil); Folin-Ciocalteu reactant (Sigma-Aldrich, Brazil); tetrahydrofuran (THF), 2,2'-Azobis (2 methylpropionamidine) dihydrochloride, gallic acid and catechin (Sigma-Aldrich, USA); monobasic and dibasic potassium phosphate and sodium carbonate (Synth, Brazil).

Soxhlet extraction

Soxhlet extraction was performed for comparison purposes. Mimosa bark powder were extracted for 6 h with ethanol boiling temperature in a solid-liquid weight ratio of 1:20, 1:30 and 1:40. These solid-liquid concentrations were chosen based on total phenolic and condensed tannin content of this work. Six replicates were performed for each extraction. The solvent from soluble fractions were evaporated in a rotary evaporator and then dried in an oven at 70 °C until constant mass. The yield was registered as in **Eq. 1**, beyond total phenolic and condensed tannin

content were assessed. After that, best solid-liquid ratio to extract phenolic compounds were used to study time effect in 2 and 4 h of extraction.

$$Y = \left(\frac{Me}{Mb} \right) \times 100 \quad (1)$$

where Y is the yield extract [in %], Me, and Mb are the final mass of the extract, initial dry mass of bark [in g], respectively.

Supercritical fluids extraction

The extractions were performed with CO₂ at supercritical conditions and ethanol as co-solvent. Temperature (35, 40, 50, 60, 70, 80, and 90 °C), bark:ethanol ratio (g:mL, 1:10, 1:20, 1:30, and 1:40), pressure (75, 100 and 125 bar) and time (10, 20, 30 and 50 min) were evaluate, based on others studies (Reisdorfer et al 2020; Argenta et al. 2017; Pansera et al. 2004).

The parameter process was chosen according to total phenolic content. First of all, the initial extraction started with 20 minutes, 1:20 solid:liquid ratio and 75 bar pressure were fixed while temperature varied. 20 min were chosen to start as a lower time than industrial process and Soxhlet extraction. Solid:liquid of 1:20 were chosen from Soxhlet extraction for comparison purposes. Finally, 75 bar were initially applied as a slightly higher pressure to CO₂ become supercritical (73.8 bar) only to ensure supercritical condition. Nevertheless, the best temperature was chosen according to phenolic content. After fix the best temperature, which extracted higher phenolic concentration extract, solid:liquid ratio was varied, as the other parameters were fixes. Same for the pressure and time.

Fig. 1 shows supercritical system used to extract phenolic and condensed tannin compounds from mimosa bark under supercritical CO₂. The extraction process starts with 2.0 g of mimosa bark powder and co-solvent ethanol loaded into a 304 stainless steel reactor of a 98 mL. The reactor is jacketed and connected to an oil heating bath (model Q213–22, Quimis) allowing temperature control. The pressure was controlled through a high-pressure syringe pump (model 500D, Teledyne ISCO), flow rate of CO₂ was fixed to 205 mL min⁻¹ to all the experiments. At the end of extraction process, gas was separate from the ethanol-tannin solution, which was collected in a flask. The extracts then were dried in an oven at 50 °C until constant weight. Yield was calculated as Eq. 1.

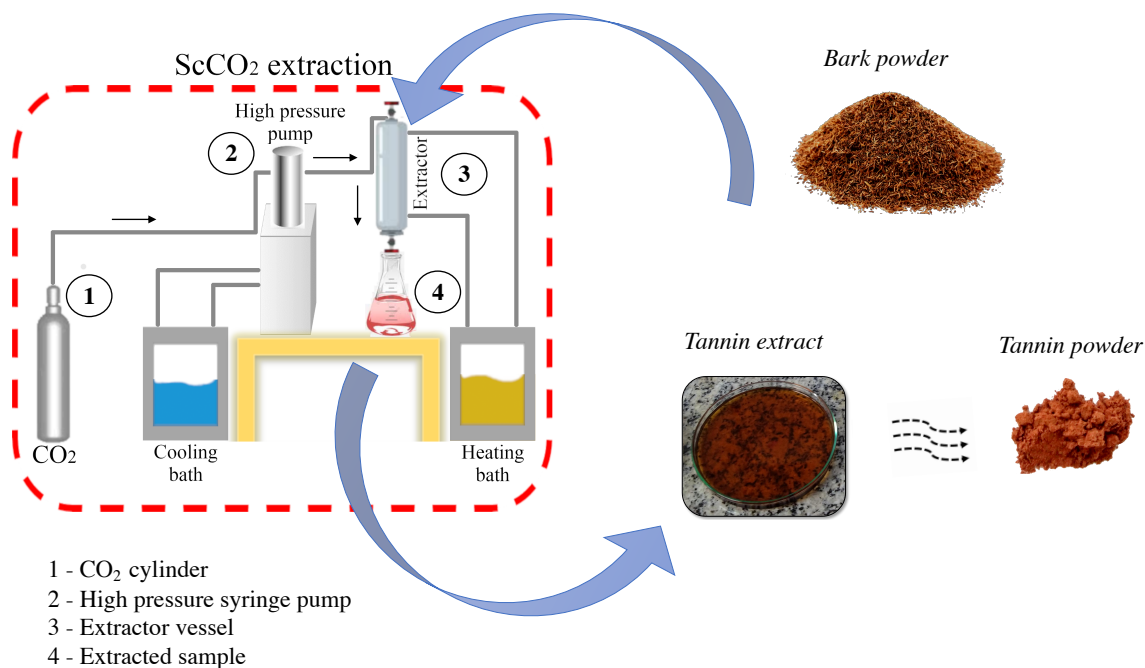


Fig. 1 Supercritical CO₂ extraction of mimosa barks and extract produced.

Total phenolic content (TPC)

The TPC was determined by Folin–Ciocalteu method (Chandra and Mejia 2004; Missio et al. 2017). Briefly, 0.25 mL of 2N Folin–Ciocalteu reagent was added to 1 mL of each sample (0.025 mg mL⁻¹), which were mixed and kept in reaction for 5 min before 2 mL of 20% sodium carbonate was added. After more 10 min stored the absorption was measured with UV-visible spectrophotometer IL–592–LC (Kazuaki) at 730 nm. The TPC was expressed in milligram equivalents of gallic acid per gram of extract (mgGAE g⁻¹) and the quantifications was used the equation obtained with the standard gallic acid: $y = 23.578x + 0.0164$ ($r = 0.9995$). For each sample three replicates were performed.

Total condensed tannin (TCT)

The TCT was determined by vanillin method (Morrison et al. 1995). Briefly, to each sample (1 mL) at 0.95 mg mL⁻¹ was added 0.9 mL of methanol, 2.5 mL solution A (8.0 mL of concentrated HCl in 100 mL methanol) and 2.5 mL of solution B (1.0 g of vanillin in 100 mL methanol). The solution was kept in the immersion in a water bath (30 °C) for 20 min, after that

absorbance at 500 nm was recorded. The TCT was expressed in milligram equivalents of catechin per gram of extract (mgCE g⁻¹) and for the quantifications was used the equation obtained with the standard: $y = 2.7107x + 0.0193$ ($r = 0.9977$). This analysis was performed in triplicate.

Infrared spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection (ATR–FTIR) analysis of the tannin powders obtained from supercritical extraction and industrial tannin were analyzed with a Shimadzu IRSpirit. The powders were laid on the diamond crystal surface of the ATR device. The extracts spectra were recorded in the range of 4000–600 cm⁻¹ (resolution of 4 cm⁻¹ and 32 scans). The area of the spectra was normalized and the baseline were corrected to study the fingerprint region (between 1800 and 600 cm⁻¹).

Antioxidant activity

The antioxidant activities of all extracts were determined using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method, using fluorescein as the fluorescent probe (Ou et al. 2001). Briefly, the reaction was carried out at 37 °C in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4), and the final assay mixture was 200 µL. Totally 25 µL of antioxidant (trolox or sample) and 150 µL of fluorescein (81 nM, final concentration) were placed in the well of the black 96-well microplates. The mixture was pre-incubated for 10 min at 37 °C. AAPH solution (25 µL; 152 mM) was added rapidly using a multichannel pipet. The plate was automatically shaken before the first reading, and the fluorescence was recorded every minute for 90 min. For the determination of the optimal extract concentration for analyze, preliminary tests were made with known concentrations ranging from 0.5 to 25 mg L⁻¹ and the optimal concentration was determined to be 0.5 mg L⁻¹. Fluorescence ($\lambda_{exc} = 485$ nm and $\lambda_{em} = 528$ nm) was measured using a Hidex Sense plate reader (Hidex, Finland). The ORAC values were calculated by a regression equation obtained with Trolox solutions (0–128 µM) and area under curve (AUC) of the fluorescein decay. This analysis was performed in triplicate and were expressed as mmol of Trolox equivalents (TE) per g of extract in dry weight.

Data analysis

Homogeneity of variances and normality of the data were verified, after analysis of variance (ANOVA) was performed. When the null hypothesis was rejected ($p < 0.05$), the mean values were compared using the Fisher's LSD test at 5% of probability of error.

Results and discussion

Solvent extraction

Solid-liquid extraction by Soxhlet Apparatus was performed (**Fig. 2**). First of all, bark:ethanol ratio of 1:20, 1:30, and 1:40 for six hours was tested, Fig. 2b. After choose best solid-liquid ratio regards to TPC time kinetics was studied, Fig. 2a. After 6 hours extraction all solid-liquid ratio showed similar TPC (Fig 2b). Demonstrating that increasing ethanol amount did not improve phenolic solubilization. However, 1:20 ratio was not enough to extract all condensed tannin. Yield extraction was improved from 1:30 and did not significantly varied with 1:40, as well regards to TPC and TCT. Thereby, 1:30 ratio was chosen as solubilized great amount of phenolic and tannins at lower ethanol amount possible. After that, time effect was studied for 2, 4 and 6 h extraction, Fig. 2a. As it is noticed, time can slightly improve yield extraction, but total phenolic and tannin content decrease. Mimosa extract was exposed to high temperature for long time (slightly above ethanol boiling point – 78.3 °C), which can cause phenol degradation (Liu et al. 2007).

Phenolic and tannin content after 6 h decrease 12.5% and 5.3%, respectively, while yield extraction increase 4.6%. Bark compounds are not only composed by condensed tannins and phenolic monomers, but also of carbohydrates (as hemicelluloses) and inorganic compounds (Bianchi et al 2015), which are also extracted and thus increase yield extraction.

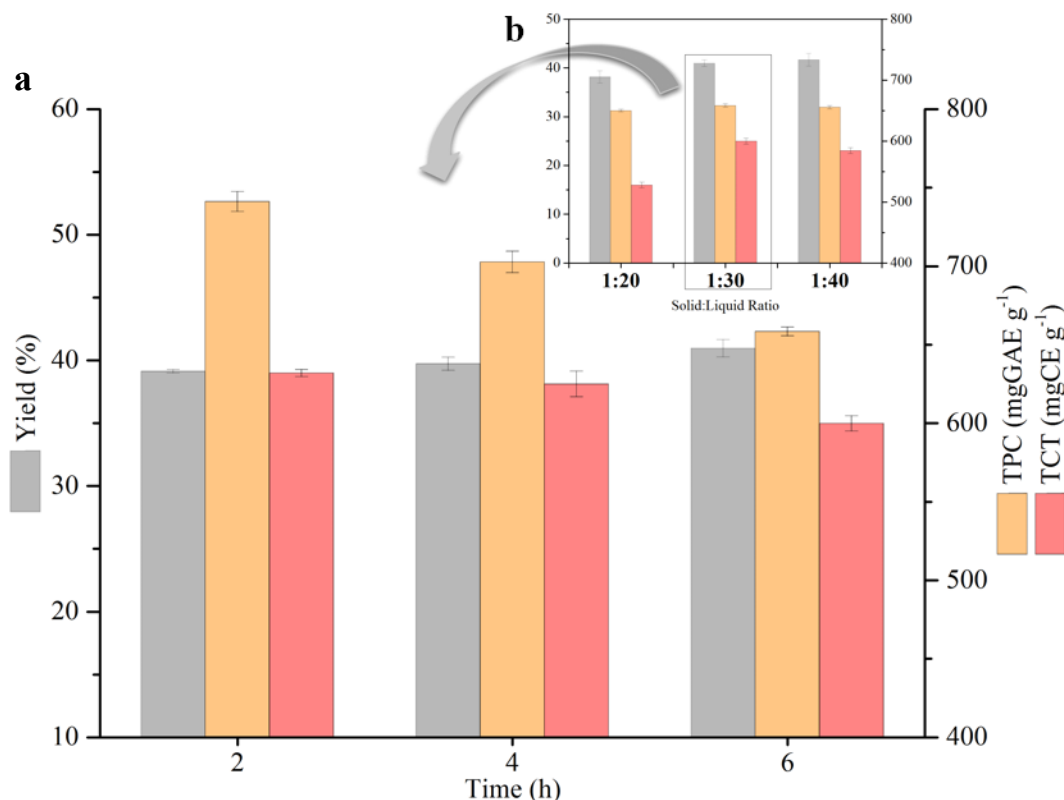


Fig. 2 Ethanol extracts of mimosa bark by soxhlet extraction: a, time effect; and b, solid-liquid ratio effect at different response.

Supercritical extraction

Ethanol as co-solvent

Simple optimization process was performed (**Fig. 3**). Barks particles were first subject to temperature variation, the other parameters were fixed, namely pressure (75 bar), solid-liquid ratio (1:20) and time (20 min). After that, bark:ethanol ratio was study, following pressure and time. All the statistical analysis is summarized in Complementary materials (**Table C1**).

Temperature has a major effect in yield extraction, as temperature increases yield extraction also increases extracted (Fig. 3a₁–a₂). Higher temperatures improve wetting of the bark and initial desorption of tannin compounds from bark particles by breaking dipole-dipole forces, mostly hydrogen bonds (Plaza and Turner 2015). Besides, polar molecules of ethanol are able to interact with free tannin powder and with bark particles (which is not only composed of cellulose and extractives, but hemicelluloses and lignin), then facilitating desorption by also

diffusion, which can facilitate CO₂ supercritical also penetrate (Cardoso et al. 2013; Al-Hamimi et al. 2016), which is noted when comparing low and high temperatures (35 °C and 90 °C).

Furthermore, cosolvent viscosity and density decrease at higher temperature, which increase mass transfer (Da Porto et al. 2015). Further, the tannins are abundant in mimosa bark, so when milled wooden tissues are crushed and then an amount of tannin ends up getting off, this amount is directly able to interact with ethanol, increasing extraction solubility. Higher temperatures than 90 °C were not chosen, although extraction yield can be improved, it allows extraction of nonphenolic materials as polymeric carbohydrates without significant improvement in phenolic compounds extraction (Pizzi 1994). Besides, higher temperatures than this it is associate with higher degradation of phenolics (Zeng et al. 2016).

Regards to TPC and TCT, as temperature increases TPC and TCT increases. Condensed tannins in general were improved at high temperatures, but a slightly decrease of 5.25% is observed at 70 °C. On the other hand, at 60 °C total phenolic content started to decrease, reaching an improvement at 90 °C, which is associate to TCT increasement. Condensed tannin was more soluble at higher temperature and then were more easily extracted, differently for other phenolic compounds. These others phenolic compounds (e.g., as flavan-3-ols, flavan-3,4-diols), although are presents in low amount in mimosa bark, also contribute to TPC (Pizzi 2017). So, although high TPC is detected at 90 °C, it was expected that this content should be higher at the highest temperature, as tannin content is higher, but it is possible that others phenolics undergo thermal degradation.

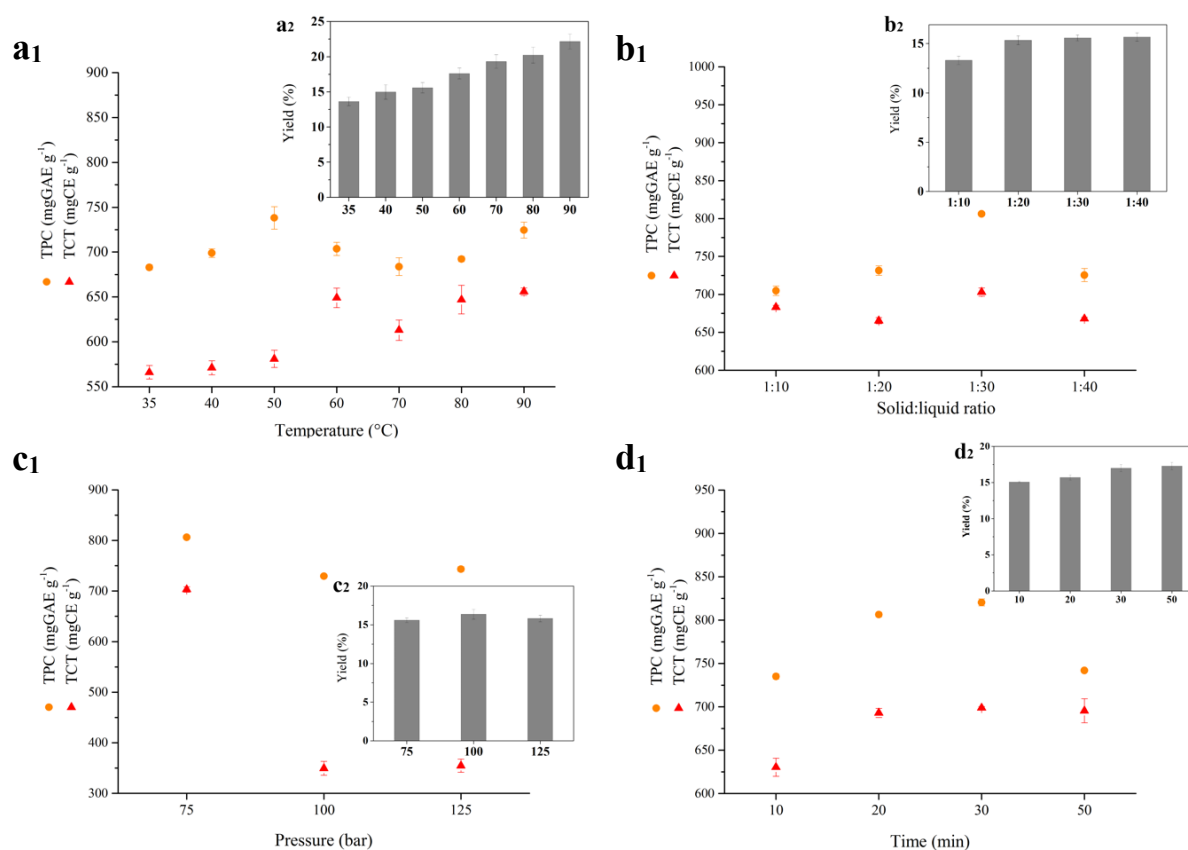


Fig. 3 Ethanol extracts of mimosa bark by supercritical extraction: a₁, temperature extraction, a₂, yield of temperature extraction; b₁, solid:liquid ratio, b₂, yield of solid:liquid ratio; c₁, pressure extraction, c₂, yield of pressure extraction; and d₁, time extraction, d₂, yield time extraction.

Furthermore, 50 °C fraction and 90 °C presented similar phenolic content, but highly different yields. High extraction yields do not represent higher TPC and TCT, which was also found by Tyśkiewicz et al. (2018). And actually, high temperatures might favor others barks compounds extraction. Kazan et al. (2014) also found a decrease in phenolic concentration above 60 °C. So, it was selected 50 °C as best temperature to avoid phenolic degradation and to decrease the extraction of other bark compounds. Solid-liquid ratio then were varied as the other parameters were fixed.

Regards to solid-ethanol ratio (Fig. 3b₁–b₂), an optimal state is reached as ethanol content increases until 1:30, after that although more ethanol is available in 1:40 total yield extraction and total phenolic and tannin content did not improve. Higher solvent amount to interact with phenolic compounds molecules increase phenolic compounds solubility until an equilibrium is reach, which was achieved then with 1:30. Higher ethanol concentration did not

promote higher phenolic extraction, on the contrary, phenolic and condensed tannins amount decrease. It is possible that the system did not produce enough energy to facilitate hydrogen-bonded ethanol molecules to fully interact with bark compounds (Manna, Bugnone and Banchero 2015). Therefore, 1:30 ratio was chosen to change pressure and the time, once promoted higher phenolic content extraction and also higher tannin content (Fig. 3b₁).

After that, three different pressures were studied, namely 75, 100 and 125 bar, keeping constant all the others parameters as temperature, time and solid-liquid ratio (Fig. 3c₁-c₂). Pressure effect promoted a minor improvement on extraction yield from 75 bar (15.58%) to 100 bar (16.35%) and slightly decreases by 0.55% when pressure was increased to 125 bar (highest pressure used). Similar results were found by Talmaciu et al. (2016), which extracted condensed tannins from spruce bark through supercritical carbon dioxide. As pressure increases at a constant temperature, CO₂ density also increases and so mass transfer (Careri et al. 2001), resulting in higher yield extraction, which did not occur in this case. Mimosa bark extract is rich in condensed tannin, which is located in intercellular spaces and into specialized cells (Marchiori 1996). Therefore, simple grinding is able to partially free mimosa extract from dry bark. Thus, when in contact with ethanol molecules great amount of the polyphenolics are directly solubilized at low pressure. So, increasing pressure it will not promote higher phenolic yields.

Besides, as can be noted total phenolic and condensed tannin content decreases as pressure increases, extraction yield slightly increase to 100 bar, but overall did not changed. Possible that the system was unbalance between solvent (CO₂) and co-solvent (ethanol) to extract phenolics, i.e., bark particles were not in an optimum equilibrium phase between ethanol and CO₂ at higher densities, which did not allow ethanol interact fully with phenolic compounds. The system acted more like a binary one, where a liquid-gas phase is present with possible low amounts of ethanol dissolved in CO₂ and vice versa, as CO₂ is in a supercritical state, whereas ethanol is in a subcritical state (temperature and pressure above critical points) (Maeta et al. 2015; Talmaciu et al. 2016). Although there is indeed an interaction between CO₂ and ethanol molecules by ethanol hydrogen-bond ability, which increase solvation power of supercritical carbon dioxide (Pérez-Pérez and Suleiman 2017) and results in higher capacity of the fluid phase, at higher pressure this effect is minor and even negative to extract phenolics and condensed tannins compounds.

Furthermore, as pressure increase at constant temperature CO₂ diffusivity decrease, which at some extent is the reason to phenolic and tannins concentration decrease (Kazan

et al. 2014). Thereby, 75 bar pressure was chosen not only economically, but also and mainly because promoted highest phenolic and tannin content extraction from mimosa bark. It was studied the best conditions to enrich mimosa extract in low time and solvent consumption considering dry and milled bark. So, indeed, dry and mill it is not industrially feasible, but before industrial scale, pilot experiments are needed to better understand mimosa bark particles behavior under supercritical CO₂ atmosphere.

Finally, four different time was chosen: 10, 20, 30 and 50 min to study time effect, Fig. 3d₁. As time increases TPC and TCT increases, reaching a stabilization at 30 minutes. After that, total condensed tannin did not improve and phenolic content decreases in 9.5%. Thus, some thermal sensitive phenolics undergo thermal degradation as the extract is keeping under moderate temperature (50 °C) for more time, which is also verified by-solid liquid extraction results as well and by Silva et al. (2017). Besides, no extraction yield variation was detected between 30 and 50 min, which also may corroborate that indeed some phenolics were degraded. Thus, just 20 min of extraction were able to solubilize high phenolic and condensed tannin yields (806 mgGAE g⁻¹ and 693 mgCE g⁻¹, respectively). Time and solvent consumption are highly cost important factors, supercritical extraction with ethanol as co-solvent was able to extract at low time and also low ethanol consumption fractions with high phenolics and condensed tannins content.

Ethanol × water as co-solvent

After find optimum process parameters conditions, which was able to enrich mimosa bark extract, water as co-solvent was used for comparison purposes with industrial extraction. Supercritical extraction along with water as co-solvent was not optimized because other non-phenolic compounds it would be also extracted. Besides, the aim was first to enhance mimosa bark extract regards to phenolic compounds, which is possible with ethanol as co-solvent (Braga et al. 2008; Yakaki 2015). **Fig. 4** shows yield extraction, total phenolic and condensed tannin content of both co-solvents from mimosa bark.

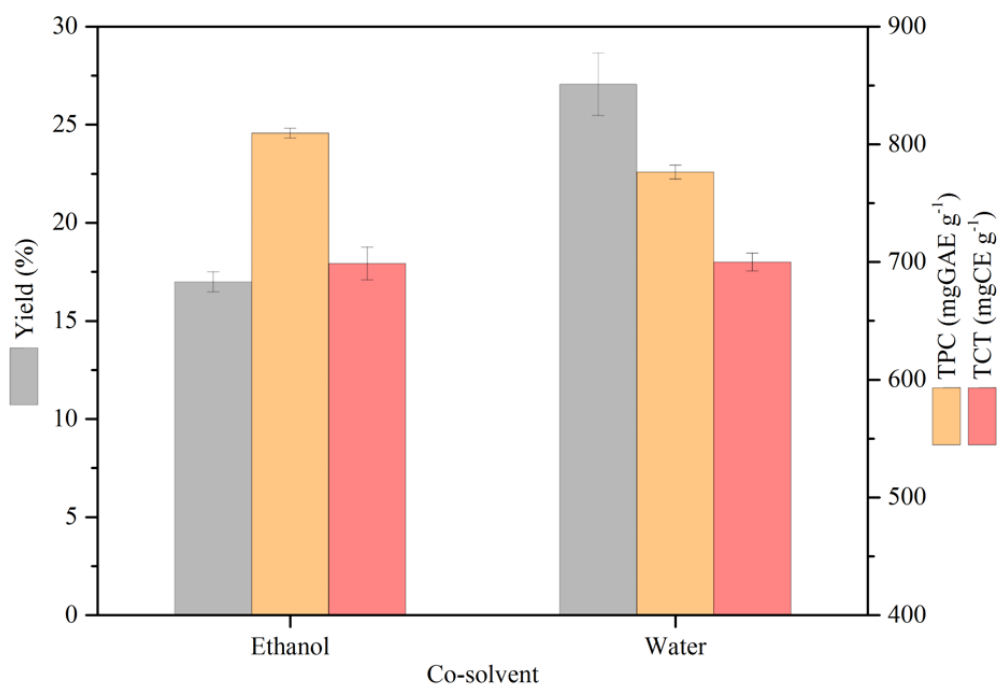


Fig. 4 Ethanol and water as co-solvent over ScCO₂ extraction of mimosa bark tannin.

Ethanol and water fraction were extracted at 50 °C, solid-liquid ratio of 1:30 at 75 bar for 30 minutes. Yield extraction is highly dependent of co-solvent polarity, as can be observed between ethanol fraction (polarity = 5.2) and water fraction (polarity = 9.0) (Monroy et al. 2016). Water was able to improve yield extraction, but ethanol fraction presented slightly higher total phenolic content. Hot water can extract free sugars and others water-soluble compounds e.g., hydrocolloid gums and oligomers from hemicelluloses hydrolysis and traces of aliphatic acids (Bianchi et al. 2015; Pizzi 1994, 2019; Rowell et al. 2013), which increase total mass extraction. Although, ethanol fraction presents slightly higher total phenolic, but similar total condensed tannin content, water fraction possibly presents more amount of other bark compounds.

Regards to yield extraction, indeed water fraction resulted in higher yields (c.a. 27%), than ethanol (c.a. 16%). Regards to solid-liquid extraction Soxhlet apparatus extracted higher yields, of about 39% using ethanol as solvent. Higher temperature (78 °C) and time (2 h) as ethanol pass repeatedly through the same barks allows to concentrate tannin extract. High temperatures can increase solubility of the extraction compounds, which can increase mass

transfer, so yield extraction is improved (Al-Hamimi et al. 2016). However, ethanol soluble extracts from ScCO₂ extraction presented higher total phenolic (10.57%) and condensed tannin (10.60%) than Soxhlet extraction. Also, higher temperature and time can cause thermal stress over thermally unstable compounds, which may be degraded (Ren et al. 2020). And as mentioned, other bark compounds are extracted, so yield extraction it would be higher.

Typically, industrial mimosa extract is obtained from a series of autoclaves and countercurrent hot water around 80 °C is used, as pass through one to other bark extract is enriched, yielding between c.a. 20% of tannin extract for about 30 min (Pansera et al. 2004). Mild temperature (50 °C), less time (20 min) and single step were used to obtain 27% (water) or 17% (ethanol) from mimosa barks with 6.11% and 2.76% higher total phenolic and condensed tannin, respectively, than tannin industrial extract (TPC 773 mgGAE g⁻¹ and TCT 680 mgCE g⁻¹). Higher yields from CO₂ supercritical extraction with ethanol were possible to achieve increasing temperature until 90 °C, reaching c.a. 22%. However, the mainly aim of this work was to obtain extracts with highest phenolic content and antioxidant activity, so yield extraction were not the main factor used for selection. Chen et al. (2018) found for *A. mearnsii* ethanolic bark extracts total phenolic content of 589 mg g⁻¹, which is lower than found from this work. However, indeed within same species yield and phenolic compounds can vary significantly, as well extract quality and non-extractives compounds (Bianchi et al. 2015; Rowell et al. 2013; Sakai 2001).

The yields for *A. mearnsii* (between 15-24% by g of barks) were obtained between 20 and 30 minutes of one step extraction, yielding great amount of phenolics and condensed tannin, even greater than industrial extracts and Soxhlet extraction. The latter resulted in higher yields ethanolic extracts, but lower TPC and TCT concentration were obtained. Possible at the same time some thermolabile compounds went degradation and also non phenolic compounds were extracted. However, with ScCO₂ optimization this was avoided, phenolics and tannins were extracted in higher concentrations at lower time and temperature. Water fraction showed great yields and extract quality and, thus, a promisor cosolvent for ScCO₂ optimization of such biomass. Possible others bark compounds were extracted in this fraction, which for applications as adhesives it would interesting. Nevertheless, these fractions have high potential for new industrial applications as e.g, cosmetic, textile, and packaging industries.

FT-IR analysis

Fig. 5 shows a typically flavonoid-like tannins spectra. All ethanol powders profiles from ScCO₂ extraction are very similar, although there are differences in signals intensities between them and some signals shift are detected for water extract. There is a small sign at around 1720–1700 cm⁻¹ for ethanolic extracts, but this weak peak does not occur in water extract. This signal can be assigned to carbonyl groups (C=O stretching vibration) (Grasel et al. 2016). However, an increasement of intensity at this band could be relate to hydroxyl groups which undergo oxidation to carbonyl groups (Ogata and Nakano 2005). The next signal a strong one at 1605 cm⁻¹ relates to C=C stretching vibrations and benzene ring in-plane vibrations of the resorcinol moieties (A-ring) (Ricci et al. 2015) has highest intensities for T3 fraction. Still, following the aromatic region, water extract did not present a signal at 1535 cm⁻¹ showed by a shoulder, just a strong and sharp one at 1507 cm⁻¹. There is a possibility that the 1535 cm⁻¹ signal for water extract was shifted to a low wave number at 1510 cm⁻¹, as can be seen by a small shoulder. These two signals (1535 cm⁻¹ and 1507 cm⁻¹) are in the region related to aromatic vibrations, mostly C=C stretching of aromatic rings (Falcão and Araújo 2014) and they are present in gallocatechin-based compounds (Ricci et al. 2015).

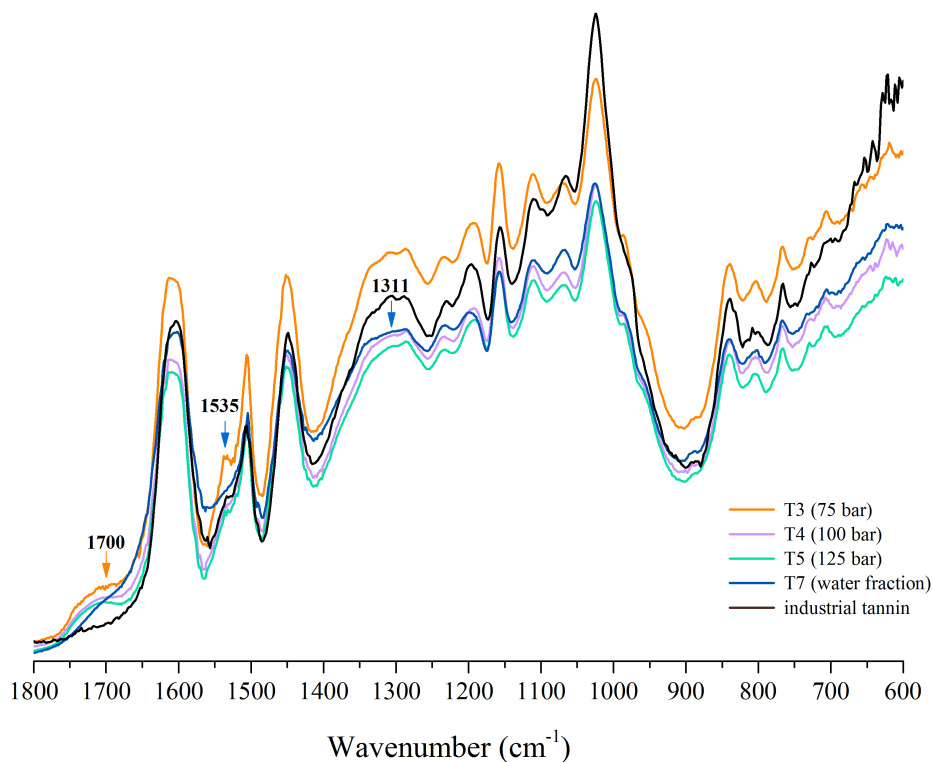


Fig. 5 FT–IR spectra of the mimosa extract fractions.

The region mastered of C–O stretching vibrations, between 1350 and 1100 cm^{-1} , the small signal at 1311 cm^{-1} relate to pirogallic B–ring (Tondi 2017) does not appear for water extract. The signals between 1300 and 1200 cm^{-1} corresponding to B–ring vibrations for condensed tannin. Specifically, the fraction ethanol 20 (orange) has the highest intensity at the medium signal of 1285 cm^{-1} between the others extracts, this signal is related to catechol B–ring vibrations (Tondi and Petutschnigg 2015). The latter were obtained at the minimum pressure to CO_2 becomes in fact a supercritical fluid. Still, at the same signal, on the other hand, 125 bar extract (green) (highest pressure) showed the lowest intensity, followed by 100 bar and water extracts. Also, another medium signal, but relate to resorcinolic A–ring vibrations, which is at 1157 cm^{-1} , 75 bar fraction again showed highest intensities. At the low wavenumber (1100 and 600 cm^{-1}), specifically between 840 and 600 cm^{-1} it is possible to note higher differences of intensities for the fraction from high pressure (green) and low pressure (orange and red) used. This region is related to aromatic torsions, mostly C–H bending out of molecular plane (Basso et al. 2017; Grasel et al. 2016).

Furthermore, a major peak at 1025 cm^{-1} presenting higher intensities for mimosa bark extract regards to CO_2 supercritical fractions. This peak can be related to hydroxyl stretching of the flavonoids (Thébault et al. 2017). It is also noted how water extract profile it is closer to those ethanolic extracts obtained from higher pressure (violet and green) than from the fraction T3 with the same process parameter (orange). In general, these profiles corroborate to total phenolic and condensed tannin content of the extracts Fig. 3c₁, in which was higher for the T3 than T4, T5 and water fraction.

Antioxidant activity

Results of antioxidant activity (ORAC method) from ScCO_2 extraction are in **Table 2**. Industrial tannin extract was used as comparative. All the fractions presented higher antioxidant activity than Vitamin E, a synthetic antioxidant commercially available (53.6 mmol TE g^{-1}).

Phenolic antioxidants act through its hydroxyl groups and H-atom-transfer mechanisms preventing that free radicals cause degradation reactions in lipids, fats, and proteins (Wright et al. 2001). And so, they have strong capacity against reactive oxygen species, which are associate with several diseases (Legault et al. 2013). Mimosa extract is highly composed of tannins that presents remarkable antioxidant properties (Szczurek 2021). Aligning to supercritical extraction, which has an advantage over others extractions methods when phenolic

compounds are target: the absence of light and oxygen inside the extractor vessel, so oxidations and others reactions can be avoided (Fariás-Campomanes et al. 2015). Besides, as polyphenols are generally extracted between 40-60 °C (Bianchi et al. 2015; Pinelo et al. 2006; Veggi et al. 2014; Yesil-Celiktas et al. 2009) degradation is even more reduced and, thus, higher antioxidant capacity can be reached.

The results show remarkable antioxidant activity, mainly for T3 fraction, which is the best fraction from supercritical extraction optimization. Lowest time, pressure and temperature were able to enrich mimosa extract. Comparing to other supercritical extraction from literature using *A. mearnsii* bark (Pansera et al. 2004) higher phenolic content were achieved, and higher antioxidant activity than other solid-liquid extraction (Missio et al. 2017), even higher than other plant materials as *Pinus maritima* bark, which is a pine extract commercially available for nutraceutical purposes (Dudonné et al. 2009).

Table 2 Antioxidant activity of the mimosa extract fractions.

Fraction	Parameters	mmol TE g ⁻¹ dry extract
T3	50°C/75 bar/1:30/20 min	76.48 ± 1.88 ^a
T4	50°C/100 bar/1:30/20 min	67.00 ± 2.08 ^{bc}
T5	50°C/125 bar/1:30/20 min	67.53 ± 2.39 ^{bc}
T6	50°C/75 bar/1:30/30 min	69.37 ± 1.45 ^b
T7	Water fraction	64.27 ± 2.64 ^c
	Industrial extract	77.82 ± 2.09 ^a

Increasing pressure decrease antioxidant activity, but no significant differences were found at the high pressures between fraction T4 and T5 (100 and 125 bar, respectively), which presented distinct total phenolic and condensed tannin content. Literature point that there is a correlation between phenolic content and antioxidant activity (Shan et al. 2005), but regards to supercritical extraction it is not totally clear. Water fraction among the other fractions presented lower antioxidant activity when comparing with industrial extract, which is also mimosa water soluble extract, although both presents similar phenolic content. In this case as the bark solutions were oven dried for some hours after extraction process some oxidations may occur and at some extent decrease phenolics reactivity. Industrially mimosa extract is oven dried at higher temperatures within few minutes, differently for these supercritical extracts. Nevertheless, lower solvent consumption is possible through supercritical extraction, on the contrary for industrial process, which great amount of water are spent to obtain mimosa extract.

When comparing fraction T3 and T6, both presented similar phenolic and tannin content, but the former presented the best results. Fraction T3 was produced in 20 min extraction, while fraction T6, with the same process parameters, were produced in 30 min. Co et al. (2011) reported that post-heated spruce bark extracts decrease antioxidant activity. Nevertheless, even better results it is possible to achieve for mimosa bark extracts through short time drying process.

In general, ethanol as co-solvent was the best to extract antioxidants, if comparing to industrial extract, both indeed presented greatest antioxidant activity, but supercritical extraction was able to generate interesting extraction yields, possible purest fractions, at lowest time. Nevertheless, if the aim is high condensed tannin mass extraction, supercritical extraction with water as co-solvent is even more interesting. This fraction presented slightly higher condensed tannin content and global yields than industrial tannin extraction, which makes ScCO₂ a promisor extraction method for antioxidant compounds.

Conclusion

Supercritical carbon dioxide extraction and ethanol binary mixtures were performed to extract phenolic and condensed tannin compounds from mimosa barks. Temperature, solid-liquid ratio and time affected supercritical carbon dioxide, while pressure was not statistically significant. Moderate temperature (50 °C), low barks:ethanol ratio (1:30), minimal pressure (75 bar) to CO₂ became supercritical and low time extraction (20 minutes) were enough to enrich mimosa extract to higher phenolic and condensed tannin content fraction, with remarkable antioxidant activity in a single extraction step.

Water and ScCO₂ mixture extracted higher yields and slightly higher condensed tannin content than industrial process extraction. Although, Soxhlet extraction showed higher yields, phenolic and tannin content was higher for ethanol and ScCO₂ mixture, which was able to concentrate great antioxidant compounds from a renewable and abundant resource as mimosa barks.

References

- Al-Hamimi, S.; Mayoral, A. A.; Cunico, L. P.; Turner, C. (2016). Carbon dioxide expanded ethanol extraction: solubility and extraction kinetics of α -pinene and cis-verbenol. **Analytical Chemistry**, 88(8), 4336–4345.
- Ali, A. (2012). *Acacia nilotica*: a plant of multipurpose medicinal uses. **Journal of Medicinal Plants Research**, 6(9), 1492–1496.
- Al Jitan, S.; Alkhoori, S. A.; Yousef, L. F. (2018). Chapter 13 – Phenolic acids from plants: extraction and application to human health. **Studies in Natural Products Chemistry**, 58, 389–417.
- Arbenz, A.; Avérous, L. (2015). Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures. **Green Chemistry**, 17(5), 2626–2646.
- Argenta, A. B., Reis, C. M., Mello, G. P., Dotto, G. L., Tanabe, E. H., & Bertuol, D. A. (2017). Supercritical CO₂ extraction of indium present in liquid crystal displays from discarded cell phones using organic acids. **The Journal of Supercritical Fluids**, 120, 95–101.
- Basso, M. C.; Pizzi, A.; Polesel Maris, J.; Delmotte, L.; Colin, B.; Rogaume, Y. (2017). MALDI-TOF, ¹³C NMR and FTIR analysis of the cross-linking reaction of condensed tannins by triethyl phosphate. **Industrial Crops and Products**, 95, 621–631.
- Bianchi, S.; Krosiakova, I.; Janzon, R.; Mayer, I.; Saake, B.; Pichelin, F. (2015). Characterization of condensed tannins and carbohydrates in hot water bark extracts of European softwood species. **Phytochemistry**, 120, 53–61.
- Bogdanovic, A.; Tadic, V.; Arsic, I.; Milovanovic, S.; Petrovic, S.; Skala, D. (2016). Supercritical and high pressure subcritical fluid extraction from Lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). **The Journal of Supercritical Fluids**, 107, 234–242.
- Braga, M. E. M.; Santos, R. M. S.; Seabra, I. J.; Facanali, R.; Marques, M. O. M.; Sousa, H. C. de. (2008). Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark. **The Journal of Supercritical Fluids**, 47(1), 37–48.
- Capuzzo, A.; Maffei, M. E.; Occhipinti, A. (2013). Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. **Molecules**, 18(6), 7194–7238.
- Cardoso, L. C.; Serrano, C. M.; Quintero, E. T.; López, C. P.; Antezana, R. M.; Martínez de la Ossa, E. J. (2013). High pressure extraction of antioxidants from *Solanum stenotomun* peel. **Molecules**, 18(3), 3137–3151.
- Careri, M.; Furlattini, L.; Mangia, A.; Musc, M.; Anklam, E.; Theobald, A.; von Holst, C. (2001). Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach. **Journal of Chromatography A**, 912(1), 61–71.

Cea Pavez, I.; Lozano-Sánchez, J.; Borrás-Linares, I.; Nuñez, H.; Robert, P.; Segura-Carretero, A. (2019). Obtaining an extract rich in phenolic compounds from olive pomace by pressurized liquid extraction. **Molecules**, 24(17), 3108.

Cerón-Martínez, L. J.; Hurtado-Benavides, A. M.; Ayala-Aponte, A.; Serna-Cock, L.; Tirado, D. F. (2021). A pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction to valorize Colombian mango seed kernel. **Molecules**, 26(8), 2279.

Chai, Y. H.; Yusup, S.; Kadir, W. N. A.; Wong, C. Y.; Rosli, S. S.; Ruslan, M. S. H.; Yiin, C. L. (2020). Valorization of Tropical Biomass Waste by Supercritical Fluid Extraction Technology. **Sustainability**, 13(1), 233.

Chandra, S.; Mejia, E. G. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(11), 3583-3589.

Chaves, J. O.; Souza, M. C. de; Silva, L. C. da, Lachos-Perez, D.; Torres-Mayanga, P. C.; Machado, A. P. da F.; Forster-Carneiro, T.; Vázquez-Espinosa, M.; González-de-Peredo, A. V.;

Barbero, G. F.; Rostagno, M. A. (2020). Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. **Frontiers in Chemistry**, 8, 507887.

Chen, X.; Xiong, J.; Huang, S.; Li, X.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Wang, F. (2018). Analytical profiling of proanthocyanidins from *Acacia mearnsii* bark and in vitro assessment of antioxidant and antidiabetic potential. **Molecules**, 23(11), 2891.

Co, M.; Fagerlund, A.; Engman, L.; Sunnerheim, K.; Sjöberg, P. J. R.; Turner, C. (2011). Extraction of antioxidants from spruce (*Picea abies*) bark using eco-friendly solvents. **Phytochemical Analysis**, 23(1), 1–11.

Da Porto, C.; Natolino, A.; Decorti, D. (2014). Extraction of proanthocyanidins from grape marc by supercritical fluid extraction using CO₂ as solvent and ethanol–water mixture as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, 87, 59–64.

Da Porto, C.; Natolino, A.; Decorti, D. (2015). The combined extraction of polyphenols from grape marc: ultrasound assisted extraction followed by supercritical CO₂ extraction of ultrasound-raffinate. **LWT - Food Science Technology**, 61(1), 98–104.

De Melo, M. M. R.; Domingues, R. M. A.; Sova, M.; Lack, E.; Seidlitz, H.; Lang Jr., F.; Silvestre, A. J. D.; Silva, C. M. (2014). Scale-up studies of the supercritical fluid extraction of triterpenic acids from *Eucalyptus globulus* bark. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 44–50.

Dudonné, S.; Vitrac, X.; Courière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(5), 1768–1774.

Falcão, L.; Araújo, M. E. M. (2014). Application of ATR–FTIR spectroscopy to the analysis of tannins in historic leathers: the case study of the upholstery from the 19th century Portuguese Royal Train. **Vibrational Spectroscopy**, 74, 98–103.

Fárias-Campomanes, A. M.; Rostagno, M. A.; Coaquira-Quispe, J. J.; Meireles, M. A. A. (2015). Supercritical fluid extraction of polyphenols from lees: overall extraction curve, kinetic data and composition of the extracts. **Bioresources and Bioprocessing**, 2(1), 45.

Fraga-Corral, M.; García-Oliveira, P.; Pereira, A. G.; Lourenço-Lopes, C.; Jimenez-Lopez, C.; Prieto, M. A.; Simal-Gandara, J. (2020). Technological application of tannin-based extracts. **Molecules**, 25(3), 614.

Garmus, T. T.; Paviani, L. C.; Queiroga, C. L.; Magalhães, P. M.; Cabral, F. A. (2014). Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, 86, 4–14.

Grasel, F. dos S.; Ferrão, M. F.; Wolf, C. R. (2016). Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 153, 94–101.

Grenda, K.; Arnold, J.; Hunkeler, D.; Gamelas, J. A. F.; Rasteiro, M. G. (2018). Tannin-based coagulants from laboratory to pilot plant scales for coloured wastewater treatment. **Bioresources**, 13(2), 2727–2747.

Hagerman, A. E. (2002). **Tannin handbook**. Oxford: Miami University.

Hoyos-Martínez, P. de; Merle, J.; Labidi, J.; Charrier-El Bouhtoury, F. (2019). Tannins extraction: a key point for their valorization and cleaner production. **Journal of Cleaner Production**, 206, 1138-1155.

Huaman-Castilla, N. L; Martínez-Cifuentes, M.; Camilo, C.; Pedreschi, F.; Mariotti-Celis, M.; Pérez-Correa, J. R. (2019). The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLC/RP process on carménère pomace extracts. **Molecules**, 24(17), 3145.

Kazan, A.; Koyu, H.; Turu, I. C.; Yesil-Celiktas, O. (2014). Supercritical fluid extraction of *Prunus persica* leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, 92, 55–59.

Khaw, K.-Y.; Parat, M.-O.; Shaw, P. N.; Falconer, J. R. (2017). Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: a review. **Molecules**, 22(7), 1186.

Kusano, R.; Ogawa, S.; Matsuo, Y.; Tanaka, T.; Yazaki, Y.; Kouno, I. (2011). α -Amylase and lipase inhibitory activity and structural characterization of acacia bark proanthocyanidins. **Journal of Natural Products**, 74(2), 119–128.

- Lee, J. H.; Schwartz, S. J. (2006). Pigments in plant foods. In: (Ed.). Huy, Y. H. **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 1, Chap. 14, 14.
- Legault, J.; Girard-Lalancette, K.; Dufour, D.; Pichette, A. (2013). Antioxidant potential of bark extracts from boreal forest conifers. **Antioxidants**, 2(3), 77–89.
- Liu, C.-m.; Zhao, J.-m.; Li, H.-m.; Song, F.-r. (2007). Supercritical fluid extraction of total flavonoids from leaves of *Acanthopanax senticosus* harms. **Chemical Research in Chinese Universities**, 23(2), 233–236.
- Lugo, L.; Martín, A.; Diaz, J.; Pérez-Flórez, A.; Celis, C. (2020). Implementation of modified *Acacia* tannin by Mannich reaction for removal of heavy metals (Cu, Cr and Hg). **Water**, 12(2), 352.
- Maeta, Y.; Ota, M.; Sato, Y.; Smith Jr.; R. L.; Inomata, H. (2015). Measurements of vapor–liquid equilibrium in both binary carbon dioxide–ethanol and ternary carbon dioxide–ethanol–water systems with a newly developed flow-type apparatus. **Fluid Phase Equilibria**, 405, 96–100.
- Manna, L.; Bugnone, C. A.; Banchemo, M. (2015). Valorization of hazelnut, coffee and grape wastes through supercritical fluid extraction of triglycerides and polyphenols. **The Journal of Supercritical Fluids**, 104, 204–211.
- Marchiori, J. N. C. (1996). Anatomia da madeira de *Acacia bonariensis* Gill. ex Hook. et Arn. **Ciência Rural**, 26(2), 209–216.
- Missio, A. L.; Tischer, B.; Santos, P. S. B. dos; Codevilla, C.; Menezes, C. R. de; Barin, J. S.; Haselein, C. R.; Labidi, J.; Gatto, D. A.; Petutschnigg, A.; Tondi, G. (2017). Analytical characterization of purified mimosa (*Acacia mearnsii*) industrial tannin extract: single and sequential fractionation. **Separation and Purification Technology**, 186, 218–225.
- Missio, A. L.; Mattos, B. D.; Ferreira, D. F.; Magalhães, W. L. E.; Bertuol, D. A.; Gatto, D. A.; Petutschnigg, A.; Tondi, G. (2018). Nanocellulose-tannin films: from trees to sustainable active packaging. **Journal of Cleaner Production**, 184, 143–151.
- Missio, A., Mattos, B. D., Otoni, C. G., Gentil, M., Coldebella, R., Khakalo, A., Gatto, D. A.; Rojas, O. J. (2020). Cogrounding wood fibers and tannins: surfactant effects on the interactions and properties of functional films for sustainable packaging materials. **Biomacromolecules**, 21(5), 1865–1874.
- Monroy, Y. M.; Rodrigues, R. A. F.; Sartoratto, A.; Cabral, F. A. (2016). Influence of ethanol water, and their mixtures as co-solvents of the supercritical carbon dioxide in the extraction of phenolics from purple corn cob (*Zea mays* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, 118, 11–18.
- Morrison, I. M.; Asiedu, E. A.; Stuchbury, T.; Powel, A. A. (1995). Determination of lignin and tannin contents of cowpea seed coats. **Annals of Botany**, 76(3), 287–290.

National Institute of Standards and Technology. (2021). **Standard reference database number 69**. <https://doi.org/10.18434/T4D303> (accessed March 1, 2021).

Ogata, T.; Nakano, Y. (2005). Mechanisms of gold recovery from aqueous solutions using a novel tannin gel adsorbent synthesized from natural condensed tannin. **Water Research**, 39(18), 4281–4286.

Ogawa, S.; Yazaki, Y. (2018). Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. bark: tannin determination and biological activities. **Molecules**, 23(4), 837.

Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(10), 4619–4626.

Pansera, M. R.; Iob, G. A.; Atti-Santos, A. C.; Rossato, M.; Atti-Serafini, L.; Cassel, E. (2004). Extraction of tannin by *Acacia mearnsii* with supercritical fluids. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47(6), 995–998.

Pérez-Pérez, M.; Suleiman, D. (2017). Development of a supercritical fluid CO₂ granulator: effect of mixing and composition. **Powder Technology**, 305, 297–307.

Pilařová, V.; Al Hamimi, S.; Cunico, L.; Nováková, L.; Turner, C. (2019). Extending the design space in solvent extraction – from supercritical fluids to pressurized liquids using carbon dioxide, ethanol, ethyl lactate, and water in a wide range of proportions. **Green Chemistry**, 21(19), 5427-5436.

Pinelo, M.; Ruiz-Rodríguez, A.; Sineiro, J.; Señoráns, F. J.; Reglero, G.; Núñez, M. J. (2006). Supercritical fluid and solid–liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. **European Food Research and Technology**, 226, 199–205.

Pizzi, A. (1994). **Advanced wood adhesives technology**. Taylor & Francis Inc.

Pizzi, A. (2008). Tannins: major sources, properties and applications. In: (Eds.). Belgacem, M. N.; Gandini, A. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, Chap. 8, 179–99.

Pizzi, A. (2017). Natural phenolic adhesives derived from tannins and lignin. In: (Eds.). Pizzi, A.; Mittal, K. L. **Handbook of adhesive technology**. 3.nd. Boca Raton: Taylor & Francis Group, Chap. 9, 263-279.

Plaza, M.; Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 71, 39–54.

Rodrigues, V. H., de Melo, M. M. R., Portugal, I., & Silva, C. M. (2021). Extraction of Added-Value Triterpenoids from *Acacia dealbata* Leaves Using Supercritical Fluid Extraction. **Processes**, 9(7), 1159.

Reisdörfer, G., Bertuol, D. A., & Tanabe, E. H. (2020). Extraction of neodymium from hard disk drives using supercritical CO₂ with organic acids solutions acting as cosolvents. **Journal of CO₂ Utilization**, 35, 277-287.

Ren, F.; Nian, Y.; Perussello, C. A. (2020). Effect of storage, food processing and novel extraction technologies on onions flavonoid content: a review. **Food Research International**, 132, 108953.

Ricci, A.; Olejar, K. J.; Parpinello, G. P.; Kilmartin, P. A.; Versari, A. (2015). Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization of tannins. **Applied Spectroscopy Reviews**, 50(5), 407–442.

Richards, M. P. (2006). Lipid chemistry and biochemistry. In: (Ed.). Huy, Y. H. **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 1, Chap. 24, 24.

Rowell, R. M.; Pettersen, R.; Tshbalala, M. A. (2013). Cell wall chemistry. In: (Ed.). Rowell, R. M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, Chap. 3, 33-72.

Sakai, K. (2001). Chemistry of bark. In: (Eds.). Hon, D. N. S.; Shiraisi, N. **Wood and cellulosic chemistry**. 2.nd. New York: Marcel Dekker, Chap. 7, 243-273.

Santos, S. A. O.; Villaverde, J. J.; Silva, C. M.; Neto, C. P.; Silvestre, A. J. D. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* Labill bark. **The Journal of Supercritical Fluids**, 71, 71-79.

Sepperer, T.; Tondi, G. Tannin-furanic foams from purified extracts; **Proceedings of the 5th International Conference on Processing Technologies for the Forest and Biobased Industries, PTF-BPI**. Freising/Munich, Germany, 2018.

Sepperer, T.; Hernandez-Ramos, F.; Labidi, J.; Oostingh, G. J.; Bogner, B.; Petutschnigg, A.; Tondi, G. (2019). Purification of industrial tannin extract through simple solid-liquid extractions. **Industrial Crops and Products**, 139, 111502.

Shan, B.; Cai, Y. Z.; Sun, M.; Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(20), 7749–7759.

Sidhu, J. S.; Al-Zenki, S. F. (2006). Fruits: horticultural and functional properties. In: (Ed.). Huy, Y. H. **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 1, Chap. 8, 8.

Silva, W.; Romero, J.; Morales, E.; Melo, R.; Mendoza, L.; Cotoras, M. (2017). Red wine extract obtained by membrane-based supercritical fluid extraction: preliminary characterization of chemical properties. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 34(2), 567–581.

Szczurek, A. (2021). Perspectives on tannins. **Biomolecules**, 11(3), 442.

Talmaciu, A.I.; Ravber, M.; Volf, I.; Knez, Ž.; Popa, V.I. (2016). Isolation of bioactive compounds from spruce bark waste using sub- and supercritical fluid. **The Journal of Supercritical Fluids**, 117, 243–251.

Tekin, K.; Hao, N.; Karagoz, S.; Ragauskas, A. J. (2018). Ethanol: a promising green solvent for the Deconstruction of lignocellulose. **ChemSusChem**, 11, 3559-3575.

Thébault, M.; Pizzi, A.; Santiago-Medina, F. J.; Al-Marzouki, F. M.; Abdalla, S. (2017). Isocyanate-free polyurethanes by coreaction of condensed tannins with aminated tannins. **Journal of Renewable Materials**, 5(1), 21–29.

Tondi, G.; Petutschnigg, A. (2015). Middle infrared (ATR FT–MIR) characterization of industrial tannin extracts. **Industrial Crops and Products**, 65, 422–428.

Tondi, G. (2017). Tannin-based copolymer resins: synthesis and characterization by solid state ¹³C NMR and FT–IR spectroscopy. **Polymers**, 9(6), 223.

Tyśkiewicz, K.; Konkol, M.; Rój, E. (2018). The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. **Molecules**, 23(10), 2625.

Uwineza, P. A.; Waśkiewicz, A. (2020). Recent advances in supercritical fluid extraction of natural bioactive compounds from natural plant materials. **Molecules**, 25(17), 3847.

Veggi, P. C.; Prado, J. M.; Bataglion, G. A.; Eberlin, M. N.; Meireles, M. A. A. (2014). Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, 89, 68–77.

Venter, P. B.; Senekal, N. D.; Kemp, G.; Amra-Jordaan, M.; Khan, P.; Bonnet, S. L.; Van Der Westhuizen, J. H. (2012). Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 3: the chemical composition of wattle (*Acacia mearnsii*) bark extract. **Phytochemistry**, 83, 153–167.

Woźniak, Ł.; Marszałek, K.; Skąpska, S.; Jędrzejczak, R. (2017). The application of supercritical carbon dioxide and ethanol for the extraction of phenolic compounds from chokeberry pomace. **Applied Sciences**, 7(4), 322.

Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, 123(6), 1173–1183.

Xiong, J.; Grace, M. H.; Esposito, D.; Komarnytsky, S.; Wang, F.; Lila, M. A. (2017). Polyphenols isolated from *Acacia mearnsii* bark with anti-inflammatory and carbolytic enzyme inhibitory activities. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 15(11), 816-824.

Yazaki, Y. (2015). Utilization of flavonoid compounds from bark and wood: a review. **Natural Product Communications**, 10(3).

Yesil-Celiktas, O.; Otto, F.; Gruener, S.; Parlar, H. (2009). Determination of extractability of pine bark using supercritical CO₂ extraction and different solvents: optimization and prediction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(2), 341–347.

Zeng, L.; Ma, M.; Li, C.; Luo, L. (2016). Stability of tea polyphenols solution with different pH at different temperatures. **International Journal of Food Properties**, 20(1), 1–18.

Complementary materials

Table C1 Summary of the results in supercritical extraction.

Temperature (°C)	Time (min)	S:L	Pressure (bar)	CO ₂ density* (kg m ⁻³)	Yield (%)	TPC (mgGAE g ⁻¹)	TCT (mgCE g ⁻¹)
35	20	1:20	75	273	13.63 ± 0.60 ^c	683 ± 3 ^c	566 ± 8 ^c
40	20	1:20	75	232	14.98 ± 1.02 ^d	699 ± 5 ^b	571 ± 8 ^c
50	20	1:20	75	194	15.31 ± 0.74 ^d	738 ± 12 ^a	604 ± 10 ^b
60	20	1:20	75	173	17.61 ± 0.78 ^c	704 ± 7 ^b	649 ± 11 ^a
70	20	1:20	75	158	19.31 ± 0.97 ^b	684 ± 10 ^c	613 ± 11 ^b
80	20	1:20	75	147	20.22 ± 1.13 ^b	692 ± 3 ^{bc}	647 ± 16 ^a
90	20	1:20	75	138	22.16 ± 1.06 ^a	725 ± 9 ^a	656 ± 4 ^a
50	20	1:10	75		12.54 ± 0.42 ^b	700 ± 6 ^c	679 ± 2 ^b
50	20	1:20	75		15.33 ± 0.45 ^a	731 ± 6 ^b	665 ± 4 ^c
50	20	1:30	75	194	15.58 ± 0.30 ^a	806 ± 2 ^a	693 ± 5 ^a
50	20	1:40	75		15.66 ± 0.42 ^a	725 ± 9 ^b	668 ± 2 ^c
50	20	1:30	75	194	15.58 ± 0.30 ^a	806 ± 2 ^a	693 ± 5 ^a
50	20	1:30	100	384	16.21 ± 0.63 ^a	759 ± 3 ^b	640 ± 14 ^b
50	20	1:30	125	613	15.53 ± 0.42 ^a	752 ± 5 ^c	585 ± 13 ^c
50	10	1:30	75		15.07 ± 0.09 ^b	735 ± 3 ^c	630 ± 10 ^b
50	20	1:30	75	194	15.68 ± 0.35 ^b	806 ± 2 ^a	693 ± 5 ^a
50	30	1:30	75		16.99 ± 0.51 ^a	810 ± 4 ^a	699 ± 2 ^a
50	50	1:30	75		17.27 ± 0.50 ^a	742 ± 1 ^b	695 ± 14 ^a
Water fraction**	20	1:30	75	194	26 ± 1.59	699.93 ± 8	776.45 ± 6

* CO₂ density at supercritical condition according to temperature and pressure from NIST (2021).

** Temperature also of 50 °C.

4 ARTIGO 2 - FILMES DE CELULOSE NANOFIBRILADA E TANINOS: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Resumo: O desenvolvimento de novos produtos constituídos de materiais renováveis é essencial para fornecer alternativa aos produtos derivados do petróleo, como filmes plásticos. Uma vez que, quando em processo de degradação os plásticos geram microplásticos que contaminam o ecossistema marinho e tem gerado preocupação sobre a saúde humana. Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir filmes a base de celulose nanofibrilada (CNF) e extratos de *Acacia mearnsii* (mimosa) como agente antioxidante natural. O extrato de mimosa é composto de tanino condensado e apenas recentemente tem sido incorporado em matriz celulósica para geração de filmes ativos e com proteção UV. Foram utilizados o extrato de mimosa industrial (Ti) e o obtido por processo não-convencional, através da extração por gás carbônico supercrítico e água (TSc), o que é diferente de outros estudos, bem como o extrato TSc foi obtido em menos tempo e a temperatura mais baixa a uma concentração um pouco maior de tanino do que o extrato da indústria. O alginato de sódio foi incorporado como um agente de contenção na matriz nanocelulósica. Foram utilizados o extrato de tanino advindo do processo industrial (Ti). Os filmes, com gramatura de 30 g.m⁻², foram produzidos pela homogeneização dos componentes em água, seguido de filtração à vácuo e secagem ao ar livre. Imagens MEV demonstram a estrutura densa dos filmes. A incorporação do extrato TSc melhorou o ângulo de contato dos filmes em 85° e aumentou resistência a degradação térmica. O alginato agiu como uma rede que de fato proporcionou aumento da resistência à tração, por outro lado tornou os filmes mais hidrofílicos. De todo modo, a inserção do alginato e dos taninos não afetaram significativamente a resistência à tração dos filmes, os filmes TSc alcançaram valor médio de 87 Mpa. As características e propriedades desses filmes demonstram potencial de utilização como embalagens não tóxicas temporárias, podendo serem aplicadas como uma camada interior em sistemas multicamadas. Portanto, uma alternativa ecológica para substituir filmes a base do petróleo.

Palavras-chave: Polifenólicos. Nanocelulose. Filmes ecológicos. Alginato de sódio.

Abstract: The development of new renewable based products is essential to replace petroleum-based products as plastic films. Once, plastic can degrade into microplastics, which contaminate marine life and has been growing concern in human health. So, the aim of this work was to produce films based on nanofibrillated cellulose (NFC) and *Acacia mearnsii* (mimosa) bark extracts also as natural antioxidant. Mimosa extract are composed of condensed tannin and just few recently studies have been made incorporating into cellulose to generate active and UV-barrier films. Industrial tannin (Ti) was used and also a tannin extract from non-conventional extraction as supercritical carbon dioxide extraction and water (TSc), which is different from others studies as this extract was produced at low temperature and time, and yielding slightly higher tannin content. Sodium alginate also was use as contention agent for nanocellulose matrix. The 30 g.m⁻² films were produced by water homogenization and vacuum filtration. SEM images showed high dense structure, TSc improve contact angle to 85° and slightly increase thermal degradation. Alginate acted indeed as a contention network which increased tensile strength, but at the same time the films became hydrophilic. Nevertheless, alginate and tannin extracts did not significantly affect tensile strength, TSc films reached 87 Mpa. The features and properties of tannin-based films show potential use as temporary nontoxic films,

which can be applied as an interior layered for multilayered films. Thus, a green alternative for petroleum-based films.

Keywords: Polyphenols. Nanocellulose. Ecological films. Sodium alginate.

Introdução

Filmes plásticos derivados do petróleo utilizado para a produção de embalagens compõem praticamente todos os itens presentes no consumo diário pela sociedade, desde mercadorias alimentícias até produtos de limpeza e higiene, essencialmente pelo fato de serem mais baratas e facilmente disponíveis, além de questões político-mercadológicas. Porém, sua distribuição global excessiva, consumo desenfreado, rápido descarte, aliado à sua lenta decomposição e fragmentação em componentes perigosos, tornaram desse material um sério problema ambiental atual e futuro. Assim, surgem como alternativa para o mercado filmes derivados da celulose na produção de embalagens ecológicas, uma vez que são advindas de fontes renováveis, biodegradáveis, não-tóxicos e sustentáveis. Mais recentemente, as pesquisas tem aprimorado esses filmes agregando características e propriedades na formação de filmes funcionais com a incorporação de agentes antioxidantes naturais, como é o caso do tanino condensado (Missio et al. 2020; Li et al. 2020; Missio et al. 2018). Contudo, há ainda o que ser explorado com relação a potencialidade desses materiais abundantes e naturais em filmes, como por exemplo a incorporação de taninos advindos de processos de obtenção diferentes e, portanto, com características e propriedades diferentes.

A celulose vegetal é o polímero mais abundante no mundo, sendo utilizada historicamente pelo ser humano no setor de papel e embalagens. Porém, esse material fibroso em escala nanométrica, como por exemplo a celulose nanofibrilada (CNF) ou nanocelulose, pode-se potencializar e transformar certas características, ampliando assim a área de aplicação. Produção em larga escala, baixo custo frente a outros materiais, biodegradabilidade, atoxidade, excelente estabilidade na maioria dos solventes e performance mecânica em relação ao seu peso, além de propriedades eletroquímicas interessantes, fazem desse um material versátil para alcançar mercados globais de forma significativa. O que já vem acontecendo, devido a alguns países proibirem o uso de embalagens plásticas, levando a uma alta demanda por nanocelulose, resultando em um crescimento anual de 18,4%, podendo alcançar em 2024 uma receita de 784,0 milhões de dólares (Zion Research 2018). Aliado a isso, aplicações de interesse já vêm sendo avaliadas para seu uso, por exemplo i) filmes e membranas biodegradáveis (Claro et al. 2020;

Malmir et al. 2017); ii) biofilmes em múltiplas camadas para embalagens de alimentos frescos (Vartiainen et al. 2016); e iii) fabricação de compósitos sustentáveis (Mohanty et al. 2018).

Além disso, pesquisadores tem aprofundado nos últimos anos a inserção de biocompostos nesses filmes a base de nanocelulose, seja destinado a embalagens ou a filmes protetivos multicamadas, visando melhorar ou especificar as propriedades fins desse material, como para alimentos e fármacos. A proteção contra a degradação solar (raios ultravioletas), umidade, fungos e bactérias, além de fornecer propriedades mecânicas adequadas para suportar o manuseio e transporte são características levadas em consideração para a fabricação de filmes e embalagens ativas alimentícias. No entanto, as mesmas também são produzidas com o objetivo extra de liberar (ou absorver), ao longo do tempo, compostos químicos protetivos nos alimentos, na superfície ou externamente aos mesmos (European Commission Regulation – ECR 2009). A exemplo disso, o tanino vegetal pode ser utilizado como antioxidante natural alternativo aos sintéticos para proteção de produtos sensíveis a oxidação, alimentos secos, como massas, bolos, pães, ou até mesmo de frutas, evitando danos significativos por oxidação, e assim mantendo ou aumentando o tempo de vida útil (prateleira) de produtos perecíveis.

Os taninos vegetais, de forma genérica, tratam-se de um conjunto de moléculas polifenólicas com alto peso molecular, os quais apresentam relevantes propriedades antioxidantes como uma de suas características significativas e promissoras. Além disso, estudos demonstraram potencial como agente antimicrobiano (Ogawa e Yazaki 2018). Esse composto é obtido abundantemente na forma de extrato concentrado de certas matérias-primas, como a casca da *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia mimosa ou mimosa) (Tondi e Petutschnigg 2015). O extrato industrial de acácia é extraído com água quente, apresenta outros compostos não fenólicos extraídos conjuntamente, como os carboidratos, açúcares livres e materiais inorgânicos (Arbenz e Avérous 2015). Os taninos obtidos a partir dessa espécie são do tipo condensados, principalmente oligômeros de proantocianidinas que são compostos majoritariamente de unidades de 5–deoxiflavan–3–ol de alta capacidade antioxidante (Kusano et al. 2011).

Com isso, trabalhos recentes focaram no aprimoramento de filmes multifuncionais a base de nanocelulose com a inserção do tanino, seja antes modificando a nanocelulose (Li et al. 2019) ou o processo de produção da mesma (Missio et al. 2018). No primeiro há uma série de processos e reagentes na modificação da nanocelulose (cationizada), embora maior resistência à tração com a inserção do tanino foi possível em relação ao segundo e o mesmo não foi lixiviado, dependendo a finalidade de uso, altas resistências podem não ser necessárias. Além

disso, o tanino permanece parcialmente retido através de interações mais fracas justamente para que o filme possa ser ativo, ou seja, podendo assim liberar o tanino como agente antioxidante e interagir com o meio ao longo do tempo.

Poucos trabalhos têm estudado o potencial do tanino condensado e nanocelulose na formação de filmes multifuncionais (Li et al. 2019), e apenas um (Missio et al. 2020) visando a inserção de tipos diferentes de taninos condensados, contudo este último foi purificado utilizando solvente tóxico (acetato de etila). Além disso, o tanino possui estrutura química complexa, que pode variar dentro da mesma espécie e de acordo com o método de extração e solvente utilizado (Kardel et al. 2013). Estudar interações com outros biopolímeros torna possível o aprimoramento tanto do material em estudo quanto da finalidade de uso, como no caso de filmes funcionais ou ativos. Não somente isso, extratos advindos das cascas podem conter diferenças qualitativas que poderiam interferir ou beneficiar essas aplicações.

Outros biopolímeros têm sido incorporados na formação de filmes biodegradáveis para utilização em embalagens de alimento, como é o caso da inserção de nanocelulose em matriz de alginato de sódio (Deepa et al. 2016). O alginato é um polissacarídeo extraído de algas marrom, solúvel em água, tem habilidade de formar gel e filmes, é composto de dois monômeros estruturais de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) ligados por 1-4 ligações glicosídicas (Araújo et al. 2019). Apenas recentemente alguns estudos tem utilizado polifenóis como agentes antioxidantes em filmes com alginato para aumentar o tempo de prateleira de alimentos (Dou et al. 2018), mas ainda não foi explorado a adição de tanino e alginato em filmes de nanocelulose. Benselfelt et al. (2018) sugerem que o a alginato forma uma rede que impede o realinhamento das nanofibrilas de celulose se deformarem quando expostas a uma força de tração, aumentando assim a resistência do material. A incorporação do tanino em filmes funcionais pode diminuir a resistência do material (Missio et al. 2018), assim com a adição do alginato isso poderia evitado.

Com base nisso, foram produzidos filmes de nanocelulose com a incorporação de alginato e de dois tipos de taninos condensados. A caracterização e eficácia da inserção dos taninos conjuntamente com o alginato nos filmes foi avaliada através de ensaios de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, molhabilidade, análise termogravimétrica e resistência à tração e as características morfológicas por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Material e métodos

Matéria-prima

Os filmes foram produzidos com uso de CNF como biopolímero matriz, alginato de sódio e dois extratos de *Acacia mearnsii*, o advindo da indústria (Ti) e de extração piloto com gás carbônico supercrítico e água como co-solvente (TSc).

O hidrogel de CNF (3% de sólidos em suspensão aquosa) foi produzido com madeira de coníferas por membros da *University of Maine* (EUA) e cedido pelo ao Laboratório de Nanomateriais Agroflorestais da Universidade Federal do Paraná. De forma generalista, as nanofibrilas apresentam: largura de 5 a 200 nm; comprimento de 130 nm a 225 μ m; potencial Zeta de -18 a -5 mV; e cristalinidade entre 67-88%. A indústria Seta[®] (Estância Velha, Brasil) concedeu o tanino industrial em pó da casca de *A. mearnsii*. Extrato concentrado composto de: 81% de taninos condensados; 18% de compostos não tanantes (gomas hidrocoloidais, açúcares e ácidos orgânicos); e 0,78% de materiais insolúveis. Todas as matérias-primas foram utilizadas conforme fornecidas pelos fabricantes. Ambos taninos apresentam alta concentração de compostos fenólicos e taninos condensados, além de alta atividade antioxidante. Exceto que o TSc apresenta uma concentração de tanino condensado levemente superior (700 mg g⁻¹, contra 680 mg g⁻¹ do Ti).

Fabricação dos filmes

Os filmes de CNF e taninos foram produzidos em duas simples etapas, denominadas homogeneização mecânica e filtração à vácuo Fig. 1. Foram produzidos 6 tipos de filmes, contudo, com enfoque para dois deles (N-A-Ti e N-A-TSc), sendo os demais utilizados como comparativos. Os filmes foram produzidos com gramatura fixa de 30 g m⁻² e com 4 cm de diâmetro. A primeira etapa é descrita de forma sucinta, onde uma solução inicial com 40 mL de água destilada (a 35 °C) e 1% de alginato de sódio foi mixada em dispersor Ultra-Turrax (modelo T25) por 3 min para completa homogeneização. Posteriormente, adicionou-se 1,25 g de nanocelulose em gel sob agitação a 3000 rpm durante 1 min. Por fim, realizou-se a adição lentamente do tanino em pó (Ti e TSc) até devida homogeneização por 3 min. A relação massa seca de tanino e nanocelulose foi de 5:1. Após, as dispersões foram depositadas no sistema de filtração conectado à vácuo (modelo Whatman[®]) em membrana de nylon de 4 cm de diâmetro e porosidade de 0,22 μ m. Os filmes foram secos naturalmente e sob mínima exposição à luz durante 24 h, após foram removidos da membrana de retenção e devidamente armazenados (21

°C e umidade relativa de $65 \pm 5\%$) para análises. Filmes produzidos apenas com nanocelulose e nanocelulose-alginato de sódio foram empregados como comparativo no respectivo trabalho.

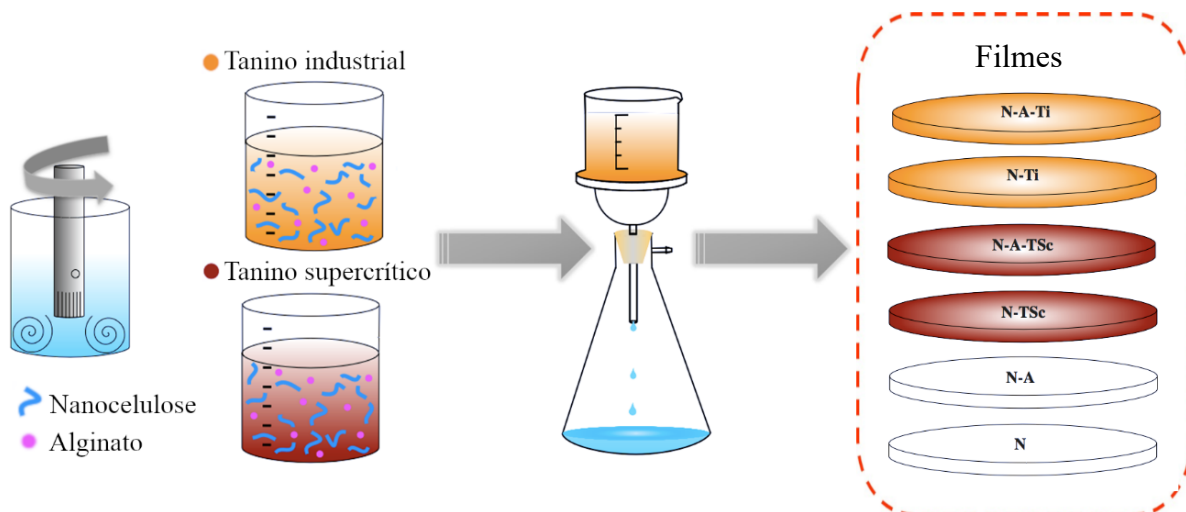


Figura 1. Método de preparação dos filmes: homogeneização, filtragem e secagem a temperatura ambiente. N: nanocelulose; N-A: nanocelulose e alginato; N-A-Ti: nanocelulose, alginato e tanino industrial; N-A-TSc: nanocelulose, alginato e tanino supercrítico; N-TSc: nanocelulose e tanino supercrítico; N-Ti: nanocelulose e tanino industrial.

Caracterização morfológica e física

Os filmes produzidos foram avaliados quanto ao seu aspecto final de acabamento e características de superfície. Para isso imagens (sob voltagem de 10 kV) de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com uso de microscópio Tescan VEGA-3SBU e detector de elétrons secundários foram realizadas. Uma camada fina de ouro foi depositada sob os filmes, com o intuito de certificar a condutividade elétrica do material.

A densidade dos filmes para cada formulação ($n = 6$) foi determinada conforme a norma T 411 om-97 (TAPPI 1997). Através da relação entre a massa e o volume determinados com balança analítica (0,1 mg) e micrômetro digital (0,01 μm), respectivamente.

Molhabilidade

Através da molhabilidade superficial, caracterizada pelo ângulo de contato aparente, verificou-se a afinidade dos filmes com a água, afim de entender as interações existentes entre

esse solvente polar e os filmes. Em equipamento Drop Shape Analyzer–DSA25 através do método da gota sésil, o ângulo de contato foi calculado de 5 a 60 s após a inserção de uma gota de 20 μL de água deionizada sobre a superfície. Realizou-se 5 repetições para cada tipo e os resultados interpretados pela respectiva média e desvio padrão.

FTIR-ATR

A estrutura química dos filmes e suas matérias-primas foi analisada através da técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR–ATR). Realizou-se o ensaio em espectrômetro Shimadzu Prestige–21 equipado com ATR–8200 HA. O espectro na faixa entre 4000 e 600 cm^{-1} das amostras foi registrado após 3 varreduras, sendo escaneadas 16 vezes com resolução de 4 cm^{-1} . Com isso, aplicou-se a média das triplicatas e os espectros foram interpretados após a correção da linha de base e normalização.

Análise termogravimétrica

Os ensaios de degradação térmica dos materiais (filmes e taninos em pó) foram realizados em equipamento Setaram, modelo Setsys Evolution. Cada tipo de amostra (12 ± 1 mg) foi exposto a variação da temperatura ambiente até 600 $^{\circ}\text{C}$, com taxa constante de aquecimento em 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de gás de 20 mL min^{-1} , sob atmosfera de argônio. Os resultados foram interpretados através das curvas termogravimétrica (TG) e sua primeira derivada (DTG).

Resistência mecânica

O ensaio de resistência à tração dos filmes foi desenvolvido em máquina universal de ensaios modelo Instron 3382, conforme a norma ASTM D638–02 (American Society for Testing and Materials – ASTM 2002). Brevemente, utilizou-se a taxa de 1 mm.min^{-1} , 5 repetições para cada tipo de filme e dimensão nominal retangular de $30 \times 10 \text{ mm}^2$.

Resultados e discussão

Morfologia da superfície e interações químicas dos filmes

O aspecto visual dos diferentes filmes produzidos é demonstrado na Figura 2. Pode-se notar a transparência dos filmes com taninos (espessura de 45 μm) quando em contato com um objeto. O filme N-A-Ti apresentou coloração relativamente mais clara que o N-A-TSc, o primeiro com uma tonalidade marrom alaranjada e o segundo marrom avermelhada. Esse fato ocorreu principalmente pela coloração natural de cada extrato adicionado no sistema, além da sua retenção ao longo das camadas de nanocelulose. Imagens de MEV mostram que os filmes apresentaram uma superfície pouco porosa, mais compactada e relevo suavizado com a incorporação do alginato. O filme de nanocelulose e alginato não foi colocado conjuntamente por apresentar semelhança com o filme puro de nanocelulose (N).

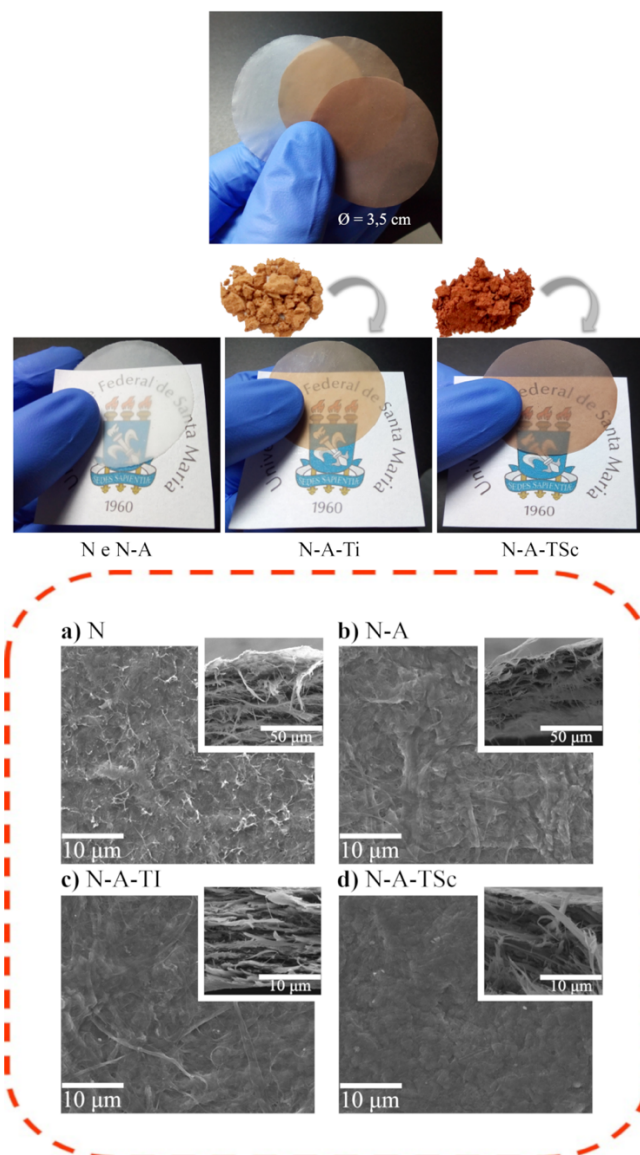


Figura 2. Imagem fotográfica do aspecto final dos filmes e demonstração da capacidade de transparência, destaque para a característica dos taninos utilizados na sua produção respectiva (acima), imagens MEV da superfície dos filmes (base) e recorte da seção transversal do seu interior (topo), em que a) filme de nanocelulose pura; b) nanocelulose e alginato; c) nanocelulose, alginato e tanino industrial e d) nanocelulose, alginato e tanino supercrítico.

De todo modo, não somente as características morfológicas da superfície dos filmes influenciam na relação desse material com certos fluidos, como por exemplo a água, mas também a natureza e composição química dos materiais presentes no sistema. Assim, filmes à base de nanocelulose naturalmente possuem alta afinidade com a água, pois apresentam grupos de hidroxilas reativas em cada unidade de repetição (Ashori e Sheshmanu 2010), assim como o extrato de acácia. Essa característica pode restringir finalidades de uso no caso de exposição a ambientes úmidos ou contato com de água líquida onde materiais como os plásticos são utilizados (Hubbe et al. 2017). Por outro lado, pode ser um aspecto fundamental para situações específicas cujo requisito principal seja a liberação desses biocompostos. Portanto, mesmo que todos os componentes desses filmes sejam hidrofílicos, é possível diminuir essa afinidade, não somente com a modificação das características morfológicas, como químicas ou de superfície, situações já demonstradas em trabalhos prévios (Barnes et al. 2019; Guo et al. 2017; Wu et al. 2014).

Os filmes de N-A-Ti; N-A-TSc; N-A; e N apresentaram densidade média de $1,13 \pm 0,01$; $1,04 \pm 0,04$; $1,05 \pm 0,03$; e $1,02 \pm 0,03 \text{ g cm}^{-3}$, respectivamente. Essa diferença entre os filmes com Ti e TSc, é devido a maior incorporação do primeiro na matriz nanocelulósica. Esse extrato industrial de tanino é concentrado, assim é possível que haja a presença de outros materiais e em maiores quantidades que o extrato do supercrítico. O extrato solúvel em água quente apresenta além de tanino condensado e monômeros fenólicos, carboidratos simples e complexos, traços de ácidos orgânicos e compostos inorgânicos (Pizzi 2019). Portanto, ficam retidos na matriz e não somente na membrana de nylon (como compostos inorgânicos). Não obstante, densidade próximas de $1,50 \text{ g cm}^{-3}$ resultam em filmes com baixa porosidade e conseqüente melhora, por exemplo, nas propriedades mecânicas e de barreira ao oxigênio (Wang et al. 2020).

De fato, a inserção do alginato no sistema aumentou a interação superficial com a água, conforme observa-se na Figura 3, pois trata-se de um biopolímero super-hidrofílico. Apresentou uma rápida absorção da gota de água, resultando em menor ângulo de contato logo após 20 s.

O biocomposto TSc incorporado ao filme, sem a presença do alginato (N-TSc), promoveu aumento no ângulo de contato ($\theta = 85^\circ$), e assim menor hidrofilicidade da superfície do material.

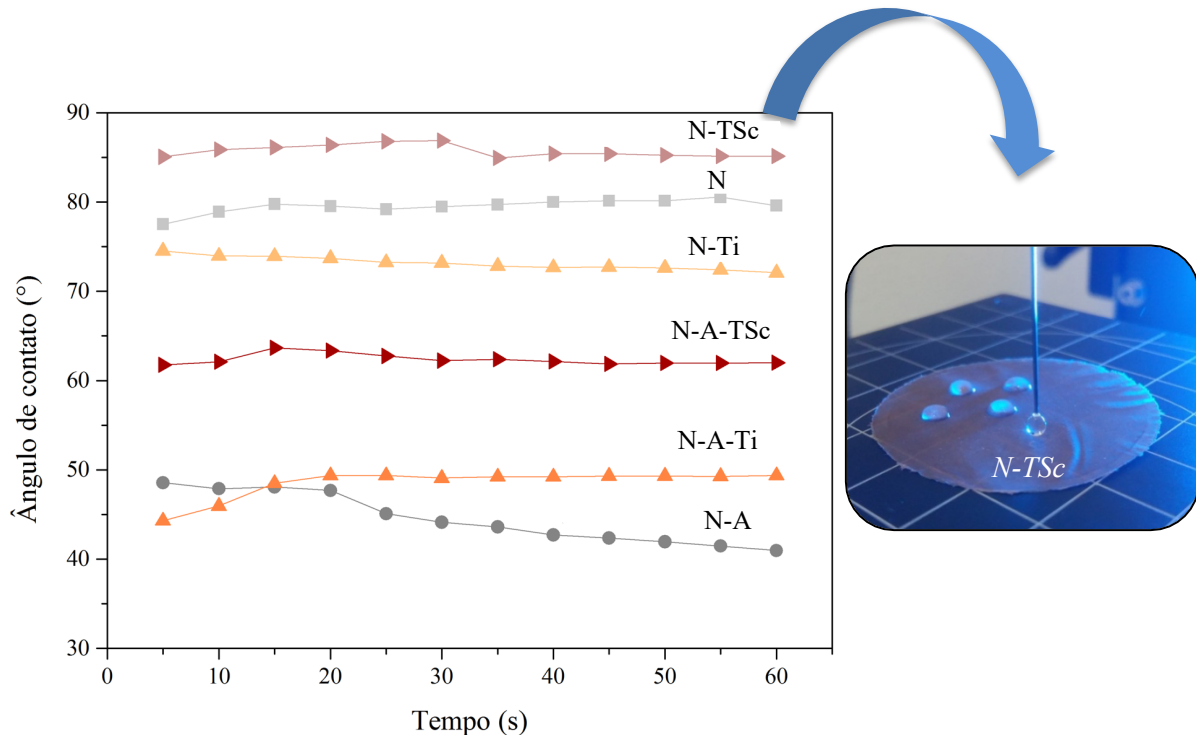


Figura 3. Comportamento do ângulo de contato aparente da água sobre a superfície dos filmes. N: nanocelulose; N-A: nanocelulose e alginato; N-A-Ti: nanocelulose, alginato e tanino industrial; N-A-Tsc: nanocelulose, alginato e tanino supercrítico; N-Tsc: nanocelulose e tanino supercrítico; N-Ti: nanocelulose e tanino industrial.

Diante do exposto, sem a necessidade da modificação química da superfície do filme com compostos hidrofóbicos ou modificação da morfologia, foi constatado que houve um aumento do ângulo de contato desses filmes. É possível que esse tipo de tanino possa conter também compostos apolares, uma vez que a extração por gás carbônico supercrítico também pode extraí-los (Talmaciu et al. 2016). Pode haver interação dos polifenóis presentes nos extratos de mimosa com a superfície hidrofílica das cadeias de celulose através de ligações de hidrogênio (Pizzi 1994), o que pode responder porque parte do tanino não é lixiviado na formação do filme pelo método de filtração à vácuo e permaneceu adsorvido na matriz de nanocelulose. Isso em partes é explicado pela análise por FT-IR. O tanino que é lixiviado poderia ser utilizado para a produção de filmes com nanocelulose cationizada, em que há uma

atração eletrostática entre os componentes, ficando o tanino completamente retido na matriz nanocelulósica (Li et al. 2019), diferentemente do objetivo desta pesquisa.

De acordo com a FT-IR (Fig. 4a superior), os filmes apresentaram espectros similares entre todos os tratamentos, com a assinatura espectral da nanocelulose bem visível, indicada pelos típicos picos: i) 1029 cm^{-1} que corresponde aos estiramentos das ligações C-O; ii) 1106 cm^{-1} das hidroxilas associadas a celulose; iii) 1158 cm^{-1} referente ao estiramento de C-O-C; e iv) 1317 cm^{-1} das vibrações nas ligações C-H. Em relação aos espectros dos extratos de tanino industrial (Ti) e tanino supercrítico (TSc), ambos apresentaram os mesmos picos (Fig. 4a inferior), apenas com uma leve diferença na região de C=C aromático com estiramento assimétrico de H ($1510\text{-}1535\text{ cm}^{-1}$). O pico a 1535 cm^{-1} está relacionado às galocatequinas (monômero do extrato de mimosa) (Ricci et al. 2015) e não aparece no extrato TSc, sugerindo que o mesmo não apresenta esse composto, porém ambos apresentam acentuado e característico pico (1510 cm^{-1}) ligado a catequina (Ricci et al. 2015; Tondi e Petutschnigg 2015).

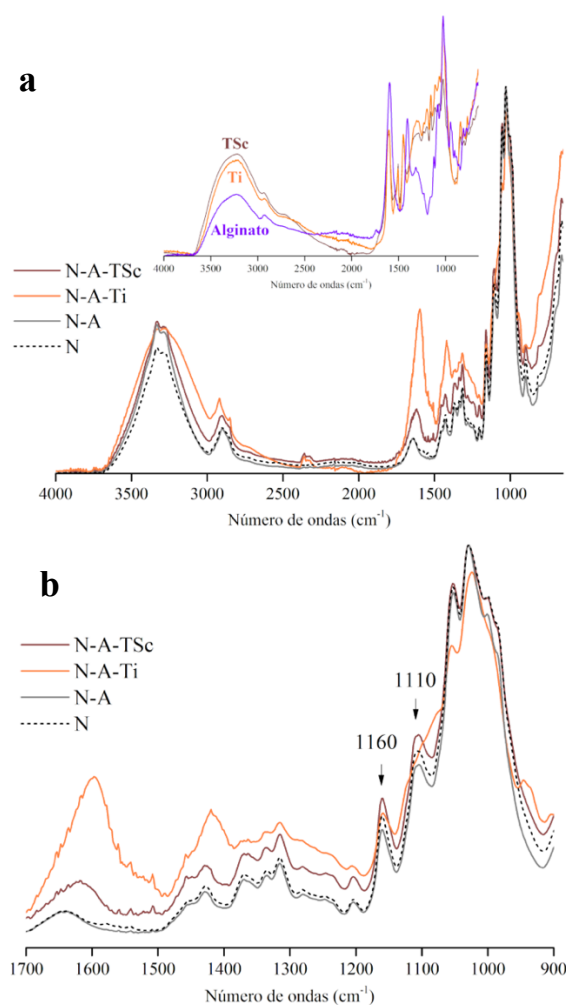


Figura 4. Espectros FT-IR dos filmes e suas matérias-primas (a), e detalhe para banda específica na análise de taninos.

Os filmes com e sem a presença de alginato apresentam espectros similares (Fig. 4a inferior), diferindo na intensidade do pico 3300 cm^{-1} , que corresponde às múltiplas ligações hidroxilas (Araújo et al. 2019; Grasel et al. 2016). Os filmes que contém alginato (N-A; N-A-Ti; N-A-TSc) apresentaram maior intensidade no pico 3300 cm^{-1} , o que indica maior afinidade com a água, fato corroborado pela maior hidrofiliabilidade de tais filmes no ensaio de molhabilidade superficial. O filme N-A-Ti apresentou maior amplitude e intensidade de pico na região de múltiplas ligações hidroxilas ($3700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$), o que pode indicar um aumento das ligações de hidrogênio, corroborando com os resultados de molhabilidade, demonstrando possíveis interações intermoleculares entre alginato e nanocelulose, fato constatado por Deepa et al. (2016). Destaca-se os picos consecutivos a 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} , correspondentes a alongamentos de CH, CH₂ e CH₃ de carboidratos presentes nos extratos, sendo o primeiro presente na nanocelulose e alginato (Grasel et al. 2016; Lekha et al. 2016; Ricci et al. 2015). O filme N-A-Ti apresentou maior intensidade de pico entre $1450\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$, nessa faixa ocorrem vibrações carboxílicas simétricas típicas do alginato (Sirvio et al. 2014). A presença do alginato conjuntamente com o tanino industrial e nanocelulose influenciou positivamente na resistência mecânica desses filmes, mais do que nos filmes com a presença de tanino supercrítico. Ainda, o pico a 1510 cm^{-1} ligado a vibrações de fenólicos presentes no extrato (como a catequina) teve intensidade maior no filme com Ti do que no com TSc, apesar de ambos extratos puros apresentarem semelhante intensidade nesse pico. Outro pico correspondente as vibrações de fenólicos, a 1605 cm^{-1} nota-se maior intensidade novamente para N-A-Ti. Contudo, nessa faixa há também possível influência do alginato nesse filme, além dos fenólicos, já que a logo em seguida a 1595 cm^{-1} o alginato tem um pico correspondente às vibrações carboxílicas assimétricas (Sirvio et al. 2014). Já no filme N-A-TSc, os picos correspondentes a vibrações dos anéis A dos monômeros fisetinidina e robinetidininas (1160 cm^{-1} e 1110 cm^{-1}) (Fig. 4 b), que são monômeros do tanino, tiveram maior intensidade do que nos filmes N-A-Ti. Algumas interações entre nanocelulose e os taninos podem ter ocorrido, intensidades e mudanças de picos ocorrem mais no filme com tanino industrial do que no filme com tanino supercrítico. E neste alguns compostos do extrato advindo da extração supercrítica podem ter interagido melhor com a nanocelulose do que o extrato industrial.

Estabilidade térmica

A Figura 5 mostra a degradação térmica dos filmes juntamente com os dois tipos de taninos. Após a dessecção da umidade (antes dos 150 °C) a degradação térmica da CNF tem início a 270 °C e término a 355 °C, faixa correspondente a degradação estrutural da celulose (Barnes et al. 2019). Já o filme N–A, inicia um pouco antes a 250 °C com decomposição a 370 °C. Esse início de decomposição foi antecipado, uma vez que o alginato de sódio puro inicia decomposição térmica a 235 °C com alta taxa de perda de massa a 260 °C (Araújo et al. 2019). O filme N–A–Ti, iniciou a degradação térmica a 240 °C, seguida de um evento de decomposição a 260 °C com baixa perda de massa até se decompor totalmente a 355 °C. Esse comportamento foi antecipado devido ao início da degradação térmica e mais significativa do tanino industrial (240 °C) e também influência do início da decomposição térmica do alginato de sódio.

O filme com tanino supercrítico (N–A–TSc) apresentou temperatura de degradação térmica levemente acima dentre os demais filmes (250 °C) e término em cerca de 360 °C. Nesse caso é possível que além da influência do alginato, que antecipou o início da degradação térmica da matriz nanocelulósica, o tanino supercrítico apresentou melhor interação com a matriz formada pela nanocelulose e alginato. Apesar de apresentar temperatura de degradação térmica inicial a 245 °C, o extrato TSc poderia antecipar ainda mais a degradação térmica inicial dos filmes, o que não ocorreu, diferentemente dos filmes com tanino industrial como mencionado.

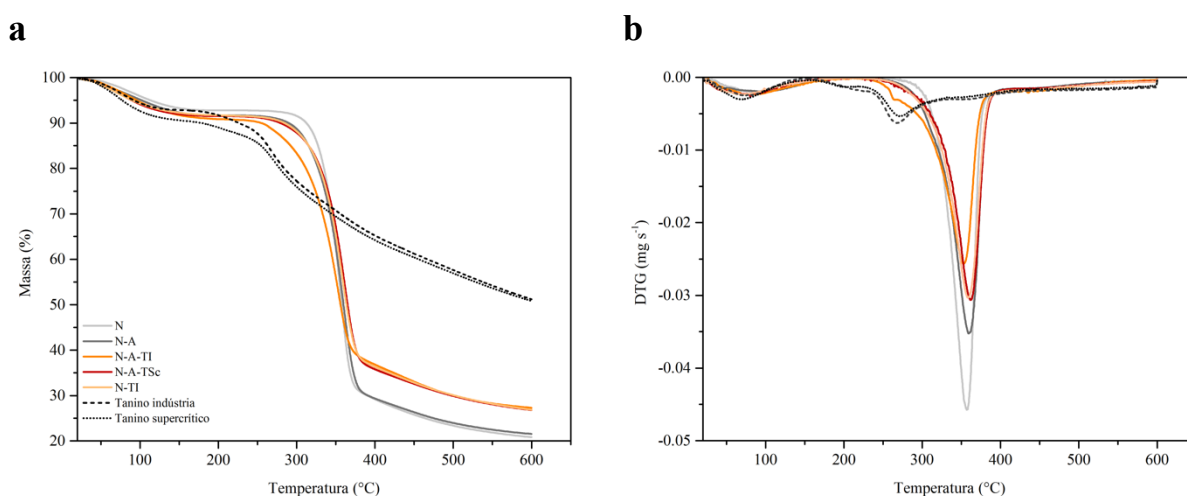


Figura 5. Curvas termogravimétricas (a) com sua primeira derivativa (b) dos filmes e taninos.

Apesar da inserção de materiais com temperaturas de degradação inicial menores que a CNF, o filme com inserção de tanino supercrítico apresentou maior estabilidade até 250 °C. A temperaturas maiores que 340 °C os taninos apresentam maior resistência a degradação, possivelmente devido a reorganização em hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (Tondi et al. 2008). Ao final do período de decomposição a 600 °C, os taninos tiveram ainda 50% de massa residual. O que fez com que os filmes de nanocelulose mantivessem 27% de sua massa residual ao final do período de decomposição, demonstrando de fato maior resistência térmica dos taninos do que os outros componentes do filme.

Para decompor as ligações de hidrogênio entre as nanofibrilas de fato requer maior energia térmica (Li et al. 2019), o que pode ser visto pela maior temperatura de decomposição inicial da nanocelulose pura. Quando na presença do tanino, a temperatura de decomposição inicial cai porque parcialmente o tanino inibe as ligações de hidrogênio entre as nanofibrilas, então menor energia térmica é requerida para iniciar a decomposição do filme N–A–Ti. Diferentemente do filme N–A–TSc, em que maior energia térmica é necessária para romper essas ligações. Demonstrando que um extrato com alta concentração de fenólicos e taninos condensados pode melhorar a estabilidade térmica de filmes nanocelulósicos.

Comportamento mecânico

O filme N–A apresentou maior resistência mecânica à tração (118 Mpa), conforme apresenta-se na Figura 6a. O alginato pode ter eficientemente facilitado a transferência de estresse entre as nanofibrilas. Além de impedir que as mesmas se orientassem quando expostas a um esforço mecânico (Bensselfelt et al. 2018) aumentando a resistência à tração. Como pode ser notado, porém, a adição de outros materiais de fato reduz a deformação à ruptura (Fig. 6b), resultando em filmes menos dúcteis. Quanto mais um material se deforma plasticamente maior é sua ductilidade (El-hadi 2017). A incorporação ainda do tanino acabou reduzindo a flexibilidade dos filmes N–A–TSc (8,3%) e N–A–Ti (11%). Dou et al. (2018) também encontraram diminuição da deformação com adição de polifenóis em filmes com alginato de sódio e gelatina, embora a resistência à tração foi melhorada devido a uma reticulação (*crosslinking*) entre gelatina com os polifenóis.

Contudo, a adição de taninos não reduziu significativamente a resistência à tração em relação ao filme de nanocelulose pura (N). Apesar de o tanino ser carregado negativamente, resultando em baixa interação com a nanocelulose, é possível que a inserção do alginato

conseguiu manter a transferência de carga a longa distância entre as nanofibrilas. Uma vez que, o tanino pode parcialmente impedir a interação via ligações de hidrogênio entre as nanofibrilas de celulose (Li et al. 2019). O que neste caso não ocorreu, formando um material mais coeso.

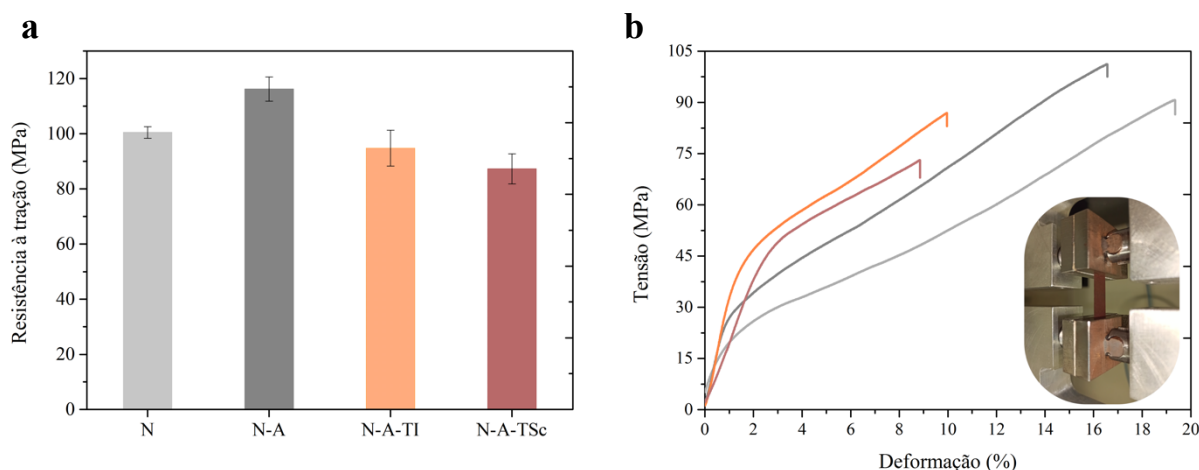


Figura 6. (a) Resistência máxima à tração e (b) curvas tensão × deformação dos filmes.

A resistência à tração diminuiu em 13,1% nos filmes N-A-TSc em relação ao filme com somente nanocelulose, ainda assim foi menos significativa que o já reportado pela literatura, que chegou a 20% (Missio et al. 2018). Demonstrando também uma diferença entre os materiais formados. Comparando com o filme com tanino industrial, é possível que outros compostos polifenóis possam ter inibido parcialmente a interação entre as nanofibrilas, o que foi parcialmente explicado pela análise FT-IR.

Apesar de uma diminuição da resistência à tração dos filmes N-A-TSc, a incorporação do TSc na matriz nanocelulósica apresenta desempenho superior que, por exemplo, tradicionais filmes plásticos de polietileno de baixa densidade para embalagens (Galloto et al. 2008; Rennert et al. 2013; Sahraeian e Esfandeh 2016), biodegradáveis (PLA) (Chaos et al. 2019) e de papel para alimentos (Rhim 2010). Além disso, no caso do filme com extrato da indústria (N-A-Ti) foi possível manter a resistência à tração dos tradicionais filmes nanocelulosicos ou CNF, embora de fato houve um aumento da hidrofílicidade dos filmes com a presença do alginato. Por outro lado, o objetivo era proporcionar uma interação entre nanocelulose e alginato, onde por exemplo quando em embalagens ativas e temporárias, dependendo do produto a ser conservado, o agente protetivo também seja capaz de interagir com o meio. Com apenas uma

incorporação/interação, o agente antioxidante pode sair mais facilmente da matriz celulósica. A incorporação de antioxidantes pode diminuir o tempo de decomposição de alimentos, pois estendem o tempo de prateleira e assim aumenta o espectro de ação dos filmes ativos ou funcionais (Martillanes et al. 2017).

De fato, o aumento da umidade relativa, uma vez que os filmes contêm alginato e outros componentes hidrofílicos, portanto, podem adsorver umidade e alterar as propriedades físicas desses filmes. Contudo, se utilizado em ambientes com menores taxas de umidade relativa ou sistemas multicamadas, pode-se aumentar o tempo de vida útil destes filmes funcionais.

Conclusão

A incorporação do tanino supercrítico e do tanino industrial na celulose nanofibrilada para produção dos filmes foi realizada com sucesso. O extrato de tanino supercrítico proporcionou melhor estabilidade térmica até 250 °C e maior hidrofobicidade, em relação aos filmes com extrato industrial. A interação entre alginato, tanino industrial e nanocelulose produziu filmes mais hidrofílicos e proporcionou melhor resultados de resistência à tração do que os filmes com tanino supercrítico. Quando usado sem o alginato, a inserção de um tanino advindo de um processo diferenciado traz potencial para que seja utilizado como agente antioxidante natural sem aumentar a hidrofilicidade dos filmes nanocelulósicos e permitindo resistência à tração de até 87 MPa.

Todos os materiais utilizados são naturais e biodegradáveis, tornando esses filmes potenciais candidatos para substituir filmes sintéticos derivados do petróleo, como para filmes temporários e potencialmente funcionais. Esses filmes podem ser utilizados como uma camada exterior em sistemas multicamadas, protegendo e atuando contra ações oxidativas, por exemplo, radiação UV e, possivelmente, promovendo um aumento no tempo de prateleira dos produtos a que se deseja conservar (como fármacos ou alimentos secos). No entanto, ainda se faz necessário um estudo sobre a taxa de liberação do tanino ao longo do tempo.

Referências

American Society for Testing and Materials. (2002). **D638-02a: standard test method for tensile properties of polymer matrix composite materials**. West Conshohocken, USA: ASTM International.

Araújo, P. dos S.; Belini, G. B.; Mambrini, G. P.; Yamaji, F. M.; Waldman, W. R.

(2019). Thermal degradation of calcium and sodium alginate: a greener synthesis towards calcium oxide micro/nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 140(1), 749–760.

Arbenz, A.; Avérous, L. (2015). Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures. **Green Chemistry**, 17(5), 2626–2646.

Ashori, A.; Sheshmani, S. (2010). Hybrid composites made from recycled materials: moisture absorption and thickness swelling behavior. **Bioresource Technology**, 101(12), 4717–4720.

Barnes, E.; Jefcoat, J. A.; Alberts, E. M.; McKechnie, M. A.; Peel, H. R.; Buchanan, J. P.; Weijs Jr., C. A.; Klaus, K. L.; Mimum, L. C.; Warner, C. M. (2019). Effect of cellulose nanofibrils and TEMPO-mediated oxidized cellulose nanofibrils on the physical and mechanical properties of poly(vinylidene fluoride)/cellulose nanofibril composites. **Polymers**, 11(7), 1091.

Benselfelt, T.; Engström, J.; Wågberg, L. (2018). Supramolecular double networks of cellulose nanofibrils and algal polysaccharides with excellent wet mechanical properties. **Green Chemistry**, 20(11), 2558–2570.

Chaos, A.; Sangroniz, A.; Gonzalez, A.; Iriarte, M.; Sarasua, J. -R.; del Río, J.; Etxeberria, A. (2019). Tributyl citrate as an effective plasticizer for biodegradable polymers: effect of plasticizer on free volume and transport and mechanical properties. **Polymer International**, 68, 125–133.

Claro, F. C.; Jordão, C.; Viveiros, B. M. de; Isaka, L. J. E.; Villanova Junior, J. A.; Magalhães, W. L. E. (2020). Low cost membrane of wood nanocellulose obtained by mechanical defibrillation for potential applications as wound dressing. **Cellulose**, 27, 10765–10779.

Deepa, B.; Abraham, E.; Pothan, L. A.; Cordeiro, N.; Faria, M.; Thomas, S. (2016). Biodegradable nanocomposite films based on sodium alginate and cellulose nanofibrils. **Materials (Basel)**, 9(1), 50.

Dou, L.; Li, B.; Zhang, K.; Chu, X.; Hou, H. (2018). Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, 118, 1377–1383.

El-hadi, A. M. (2017). Increase the elongation at break of poly (lactic acid) composites for use in food packaging films. **Scientific Reports**, 7, 46767.

European Commission Regulation. (2009). Commission Regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. **Official Journal of the European Union**, 11.

Galotto, M. J.; Ulloa, P. A.; Hernández, D.; Fernández-Martín, F.; Gavara, R.; Guarda, A. (2008). Mechanical and thermal behaviour of flexible food packaging polymeric films materials under high pressure/temperature treatments. **Packaging Technology and Science**, 21(5), 297–308.

- Grasel, F. D. S.; Ferrão, M. F.; Wolf, C. R. (2016). Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 153, 94–101.
- Guo, J.; Filpponen, I.; Johansson, L.-S.; Heißler, S.; Li, L.; Levkin, P.; Rojas, O. J. (2017). Micro-patterns on nanocellulose films and paper by photo-induced thiol–yne click coupling: a facile method toward wetting with spatial resolution. **Cellulose**, 25(1), 367–375.
- Hubbe, M. A.; Ferrer, A.; Tyagi, P.; Yin, Y.; Salas, C.; Pal, L.; Rojas, O. J. (2017). Nanocellulose in thin films, coatings, and plies for packaging applications: a review. **BioResources**, 12(1), 2143–2233.
- Kardel, M.; Taube, F.; Schulz, H.; Schütze, W.; Gierus, M. (2013). Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts – review and new aspects. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, 86, 154–166.
- Kusano, R.; Ogawa, S.; Matsuo, Y.; Tanaka, T.; Yazaki, Y.; Kouno, I. (2011). α -Amylase and lipase inhibitory activity and structural characterization of Acacia bark proanthocyanidins. **Journal of Natural Products**, 74(2), 119–128.
- Lekha, P.; Mtibe, A.; Motaung, T. E.; Andrew, J. E.; Sitholè, B. B.; Gibril, M. (2016). Effect of mechanical treatment on properties of cellulose nanofibrils produced from bleached hardwood and softwood pulps. Maderas. **Ciencia y Tecnología**, 18(3), 457–466.
- Li, P.; Sirviö, J. A.; Haapala, A.; Khakalo, A.; Liimatainen, H. (2019). Anti-oxidative and UV-absorbing biohybrid film of cellulose nanofibrils and tannin extract. **Food Hydrocolloids**, 92, 208–217.
- Malmir, S.; Monetero, B.; Rico, M.; Barral, L.; Bouza, R. (2017). Morphology, thermal and barrier properties of biodegradable films of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) containing cellulose nanocrystals. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, 93, 41–48.
- Martillanes, S.; Rocha-Pimienta, J.; Cabrera-Bañegil, M.; Martín-Vertedor, D.; Delgado-Adámez, J. (2017). Application of phenolic compounds for food preservation: food additive and active packaging. In: (Eds.) Soto-Hernandez, M.; Palma-Tenango, M.; Garcia-Mateos, M. del R. **Phenolic compounds – biological activity**. IntechOpen, 66885.
- Missio, A. L.; Mattos, B. D.; Ferreira, D. F.; Magalhães, W. L. E.; Bertuol, D. A.; Gatto, D. A.; Petutschnigg, A.; Tondi, G. (2018). Nanocellulose-tannin films: from trees to sustainable active packaging. **Journal of Cleaner Production**, 184, 143–151.
- Mohanty, A. K.; Vivekanandhan, S.; Pin, J. M.; Misra, M. (2018). Composites from renewable and sustainable resources: challenges and innovations. **Science**, 362(6414), 536–542.
- Ogawa, S.; Yazaki, Y. Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. bark: tannin determination and biological activities. (2018). **Molecules**, 23(4), 837.

- Pizzi, A. (1994). **Advanced wood adhesives technology**. Taylor & Francis Inc.
- Pizzi, A. (2019). Tannin-based biofoams – a review. **Journal of Renewable Materials**, 7(5), 477–492.
- Rennert, M.; Nase, M.; Lach, R.; Reincke, K.; Arndt, S.; Androsch, R.; Grellmann, W. (2013). Influence of low-density polyethylene blown film thickness on the mechanical properties and fracture toughness. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, 29(4), 327–346.
- Rhim, J.-W. (2010). Effect of moisture content on tensile properties of paper-based food packaging materials. **Food Science and Biotechnology**, 19(1), 243–247.
- Ricci, A.; Olejar, K. J.; Parpinello, G. P.; Kilmartin, P. A.; Versari, A. (2015). Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization of tannins. **Applied Spectroscopy Reviews**, 50(5), 407–442.
- Sahraeian, R.; Esfandeh, M. (2016). Mechanical and morphological properties of LDPE/perlite nanocomposite films. **Polymer Bulletin**, 74(4), 1327–1341.
- Sirviö, J. A.; Kolehmainen, A.; Liimatainen, H.; Niinimäki, J.,; Hormi, O. E. O. (2014). Biocomposite cellulose-alginate films: promising packaging materials. **Food Chemistry**, 151, 343–351.
- Talmaciu, A.I.; Ravber, M.; Volf, I.; Knez, Ž.; Popa, V.I. (2016). Isolation of bioactive compounds from spruce bark waste using sub- and supercritical fluid. **The Journal of Supercritical Fluids**, 117, 243–251.
- Technical Association of the Pulp and Paper Industry. (1997). **T411 om-97**: thickness (caliper) of paper, paperboard, and combined board. Atlanta, USA: TAPPI.
- Tondi, G.; Petutschnigg, A. (2015). Middle infrared (ATR FT-MIR) characterization of industrial tannin extracts. **Industrial Crops and Products**, 65, 422–428.
- Tondi, G.; Pizzi, A.; Pasch, H.; Celzard, A. (2008). Structure degradation, conservation and rearrangement in the carbonisation of polyflavonoid tannin/furanic rigid foams – a MALDI-TOF investigation. **Polymer Degradation and Stability**, 93(5), 968–975.
- Vartiainen, J.; Shen, Y.; Kaljunen, T.; Malm, T.; Vähä-Nissi, M.; Putkonen, M.; Harlin, A. (2016). Bio-based multilayer barrier films by extrusion, dispersion coating and atomic layer deposition. **Journal of Applied Polymer Science**, 136(2), 42260.
- Wang, L.; Chen, C.; Wang, J.; Gardner, D. J.; Tajvidi, M. (2020). Cellulose nanofibrils versus cellulose nanocrystals: comparison of performance in flexible multilayer films for packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, 23, 100464.
- Wu, C.-N.; Saito, T.; Yang, Q.; Fukuzumi, H.; Isogai, A. (2014). Increase in the water contact angle of composite film surfaces caused by the assembly of hydrophilic nanocellulose fibrils and nanoclay platelets. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 6(15), 12707–12712.

Zion Research. (2018). **Global nanocellulose market set for rapid growth**. Disponível em: <<https://www.zionmarketresearch.com/report/nanocellulose-market>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

5 DISCUSSÃO

O método de extração por gás carbônico supercrítico aliado a cossolventes ecológicos como o etanol e a água para a extração de compostos de interesse como os fenólicos tem sido amplamente pesquisado na última década. Biomassas abundantes e baratas aliado a uma biorrefinaria integrada permitem obter produtos de alto valor com a extração supercrítica. Uma vez que, neste método de extração não há a presença de oxigênio e luz, o que diminui a degradação de compostos fenólicos termo-sensíveis. Bem como, a utilização de gás carbônico em estado supercrítico pode permitir a maximização da extração, assim como mudando os parâmetros do processo pode extrair mais ou menos do composto de interesse. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho que é dividido em 2 artigos, foi de maximizar a extração de compostos antioxidantes advindo das cascas de *Acacia mearnsii* utilizando a extração por gás carbônico supercrítico e cossolventes (etanol e a água) através da variação dos parâmetros do processo. Bem como, incorporar um dos extratos para geração de filmes funcionais a base de nanocelulose.

A partir de uma biomassa abundante e de baixo custo advinda de florestas que se baseiam na extração sustentável de madeira, cascas de acácia negra foram utilizadas na extração de frações com alta concentração de fenólicos e taninos condensados, que são conhecidos por serem compostos antioxidantes. Etanol e posteriormente água foram empregados como co-solventes, uma vez que o gás carbônico possui fraca polaridade, mas com a inserção de co-solventes o fluido supercrítico pode potencializar a extração. A água foi utilizada apenas como comparativo, assim não foi utilizada na otimização do processo como o etanol. O objetivo era com a mudança nos parâmetros do processo e assim mudança na densidade do fluido mais compostos fenólicos e taninos pudessem serem extraídos, enriquecendo o extrato de acácia. Bem como, diminuindo a degradação dos mesmos. O que de fato ocorreu, a otimização da extração por gás carbônico supercrítico com etanol possibilitou obter uma fração com alto conteúdo de fenólicos e taninos condensados, e com isso a otimização proporcionou fração/extrato com alta capacidade antioxidante em apenas 20 minutos de extração.

A capacidade antioxidante desse extrato se assemelhou com o extrato industrial, contudo tempo e temperatura (50°C) foram reduzidos, proporcionando extrato com maior concentração de fenólicos e taninos condensados. No geral, quanto maior a concentração de fenólicos maior é a capacidade antioxidante, contudo, na extração supercrítica essa pode não ser uma relação direta. Já a fração água mostrou que a extração supercrítica pode extrair a rendimentos maiores

(27%) do que a extração industrial (21%) e com uma concentração um pouco maior de taninos condensados. É possível que outros compostos também tenham sido extraídos na fração com água os quais não foram quantificados. Contudo, de modo geral, a extração supercrítica com gás carbônico e mistura de co-solventes ecológicos, mostrou-se eficaz na extração de compostos fenólicos de alta capacidade antioxidante em curto período de tempo e baixa temperatura.

A fração com água advinda da extração supercrítica e o extrato de acácia advindo do processo industrial foram utilizados na formulação de filmes funcionais a base de nanocelulose. O extrato supercrítico foi utilizado por apresentar um pouco mais de taninos condensados. Esses filmes foram caracterizados para avaliar seu potencial como filmes funcionais para serem substitutos próximos de filmes derivados do petróleo. 1% de alginato foi incorporado para melhorar proporcionar ao filme maior resistência ou que a mesma não diminuísse significativamente. A inserção do alginato aumentou a resistência à tração do filme de nanocelulose e manteve a mesma no filme com tanino industrial (N-A-Ti). Contudo, para o filme com tanino supercrítico (N-A-TSc) a resistência à tração diminuiu em aproximadamente 13%, possivelmente por conter outros compostos que possam ter impedido parcialmente a interação entre as nanofibrilas. De todo modo, o filme com TSc atingiu 87 MPa de resistência à tração.

Além disso, houve um aumento da hidrofiliabilidade dos filmes com a incorporação do alginato, contudo, visa-se aplicações como embalagens ou filmes temporários para materiais e alimentos secos com tempo de prateleira de curto prazo. Por outro lado, a incorporação do tanino supercrítico diminuiu a hidrofiliabilidade dos filmes, é possível que alguns compostos fenólicos interagiram mais com a matriz nanocelulósica e ficam adsorvidos na mesma, do que para os filmes com tanino industrial. Embora ambos apresentaram semelhantes resultados de resistência à tração, muito semelhante em relação a literatura supracitada e algumas vezes superior.

A inserção de outros materiais dependendo da natureza pode reduzir a flexibilidade dos filmes nanocelulósicos por diminuir a interação entre as nanofibrilas. Em outras palavras, ocupando áreas ao longo da nanofibrila que antes eram ocupadas por grupos OH de outras nanofibrilas, apesar disso é possível que haja um aumento na resistência à tração mesmo que a flexibilidade diminua. Além disso, o tanino supercrítico conferiu estabilidade térmica até 250 °C, um pouco maior que o tanino industrial. O extrato de tanino advindo da acácia e incorporado a nanocelulose já comprovou eficiência como barreira UV (Li et al. 2019) e

funcionalidade (Missio et al. 2018; Missio et al 2020), podendo liberar o agente antioxidante ao meio que deseja proteger. No entanto, diferente do primeiro em que o objetivo era fixar o tanino numa celulose cationizada, ou seja, outro processo é necessário, assim como não há enfoque na liberação do mesmo. Como é o caso deste estudo e do segundo, no entanto, neste, através de uma simples homogeneização entre nanocelulose, tanino e alginato foi possível que a resistência do material não fosse afetada significativamente e o tanino, teoricamente, possa funcionar como agente antioxidante ativo. Assim sendo liberado ao material ou produto que deseja proteger. Assim como, a utilização de nanofibrilas a partir de coníferas como é o caso deste estudo apresentam melhores resultados nas propriedades mecânicas do que nanofibrilas advindas de folhosas, como foi o caso do segundo estudo quando se visa filmes para embalagens.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração por gás carbônico supercrítico e etanol como co-solvente foi otimizada variando gradativamente temperatura, relação sólido-líquido, pressão e tempo. Os dois primeiros parâmetros demonstraram-se mais influentes do que pressão e tempo. Com a otimização (20 minutos de extração e temperatura moderada de 50 °C), foi possível enriquecer o extrato de acácia, resultando em uma fração com alto conteúdo de fenólicos e taninos condensados de alta capacidade antioxidante. A fração com água, apresentou rendimento superior que a extração industrial. Colocando a extração por gás carbônico supercrítico como método promissor na extração de compostos de fenólicos, a partir de biomassa renovável, abundante e de baixo custo. Faz-se necessário um estudo econômico deste método para diminuir os custos energéticos do processo, o que é possível quando houver otimização, reutilização do CO₂, matérias-primas baratas e integração do método a uma biorrefinaria. Além disso, esses custos podem ser compensados pela maior lucratividade quando se extraem compostos de alto valor biológico como os antioxidantes, que neste estudo foram são obtidos em curto período de tempo por meio de método de baixo impacto ambiental.

A fração com água obtida pela extração por gás carbônico supercrítico foi utilizada como agente antioxidante nos filmes a base de nanocelulose para torna-los funcionais. Os filmes foram produzidos com dois tipos de taninos, um advindo desta extração (tanino supercrítico) e o outro da extração industrial. Alginato foi empregado conjuntamente como aditivo natural para conferir resistência à tração ou que a mesma não diminuísse significativamente, uma vez que há uma diminuição com a incorporação de tanino condensado. Os filmes com tanino supercrítico alcançaram ângulo de contato superior, chegando a 85° e aumento da estabilidade térmica até 250 °C.

O alginato manteve a resistência à tração dos filmes com tanino industrial, porém para os filmes com tanino supercrítico houve uma diminuição de 13,1%. De todo modo, esses filmes apresentaram resultados satisfatórios nas propriedades mecânicas, principalmente considerando que o objetivo não era proporcionar reticulação entre os biopolímeros, apenas interação entre nanocelulose e alginato, para que o tanino possa se desprender da matriz nanocelulósica com o tempo. Faz-se ainda necessário um estudo da liberação do agente antioxidante, quanto a taxa de liberação e um aprimoramento da mesma. De todo modo, visando produtos que fiquem pouco tempo em prateleira, esses filmes surgem como potencial substituintes dos filmes

plásticos utilizados em embalagens que não necessitem alta flexibilidade e que recobrem alimentos ou produtos sensíveis à oxidação.

REFERÊNCIAS

- AL JITAN, S.; ALKHOORI, S. A.; YOUSEF, L. F. Chapter 13 – Phenolic acids from plants: Extraction and application to human health. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 58, p. 389–417, 2018.
- ARBENZ, A.; AVÉROUS, L. Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures. **Green Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2626-2646, 2015.
- CALGARO, C. O. et al. Supercritical extraction of polymers from printed circuit boards using CO₂ and ethanol. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 22, p. 307-316, 2017.
- CARREIRA-CASAS A. et al. Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 17, p. 9153, 2021.
- CHAI, Y.H. et al. Valorization of Tropical Biomass Waste by Supercritical Fluid Extraction Technology. **Sustainability**, v. 13, n.1, p. 233, 2021.
- CHAVES, J. O. et al. Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 507887, 2020.
- DESIMONE, J. M. Practical approaches to green solvents. **Science**, v. 297, p. 799-803, 2002.
- ERŞAN, S. et al. M. Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls. **Food Chemistry**, v. 253, p. 46–54, 2018.
- EU, 2009. EU Guidance to the Commission Regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food, in: Sustainability, European Commission - Health and Consumers Directorate-General Directorate-General Directorate E-Safety of the Food chain. E6- **Innovation and Sustainability**, Ed. 2009.
- HAGERMAN, A. E. **Tannin handbook**. Oxford: Miami University, 2002. Disponível em: <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/>>. Acesso em: 15 ago. 2016.
- HOYOS-MARTÍNEZ, P. DE. Et al. Tannins extraction: a key point for their valorization and cleaner production. **Journal of Cleaner Production**, v. 206, p. 1138-1155, 2019.
- IÇEN, H.; GÜRÜ, M. Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 50, p. 225–228, 2009.
- JAHROME, G. S (2019). Extraction Techniques of Phenolic Compounds from Plants. In: HERNÁNDEZ, S. M. (Ed). **Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds**. London: Intech Open, 2019, cap.1, p. 1-18.
- JESSOP, P.G.; LEITNER, W. **Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids**. Weinheim:

Wiley-VCH, cap.1, 1999. 480p.

KIRAN, E.; BRENNECKE, J. F.; **Supercritical fluid engineering science: fundamentals and applications**. Washington: American Chemical Society Symposium, 1992. v. 514.

LEE, J. H.; SCHWARTZ, S. J. Pigments in plant foods. In: HUY, Y. H. (Ed.). **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. v. 1, cap. 14, p. 14.

LEYVA-JIMÉNEZ, F. J. et al. Optimized Extraction of Phenylpropanoids and Flavonoids from Lemon Verbena Leaves by Supercritical Fluid System Using Response Surface Methodology. **Foods**, v. 9, n. 7, p. 931, 2020.

LI, P. et al. Anti-oxidative and UV-absorbing biohybrid film of cellulose nanofibrils and tannin extract. **Food Hydrocolloids**, v. 92, p. 208-217, 2019.

MANJARE, S. D.; DHINGRA, K. Supercritical fluids in separation and purification: a review. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 2, n. 3, p. 463-484, 2019.

MAJID, I. et al. Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v., 17, n. 4, p. 454-462, 2018.

MISSIO, A. L. et al. Analytical characterization of purified mimosa (*Acacia mearnsii*) industrial tannin extract: single and sequential fractionation. **Separation and Purification Technology**, v. 186, p. 218-225, 2017.

MISSIO, A. L. et al. Nanocellulose-tannin films: from trees to sustainable active packaging. **Journal of Cleaner Production**, v. 184, p. 143–151, 2018.

MISSIO, A. et al. Co-grinding wood fibers and tannins: Surfactant effects on the interactions and properties of functional films for sustainable packaging materials. **Biomacromolecules**, v. 21, p. 1865-1874, 2020.

OSTOLSKI, M. et al. Antioxidant Activity and Chemical Characteristics of Supercritical CO₂ and Water Extracts from Willow and Poplar. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 545, 2021.

PANSERA, M. R. et al. Extraction of tannin by *Acacia mearnsii* with supercritical fluids. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, 995–998, 2004.

PIZZI, A. **Advanced wood adhesives technology**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1994, cap. 5, p.169.

RAD, H.B.; SABET, J.K.; VARAMINIAM, F. Study of solubility in supercritical fluids: thermodynamic concepts and measurement methods – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 4, p.1367-1392, 2019.

RHAZI, N. et al. Green extraction process of tannins obtained from Moroccan *Acacia mollissima* barks by microwave: Modeling and optimization of the process using the response surface methodology RSM. **Arabian Journal of Chemistry**, v.12, n.8, p. 2668-2684, 2019.

REIS, J. H. de O. et al. Supercritical extraction of red propolis: operational conditions and chemical characterization. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4816, 2020.

RICHARDS, M. P. Lipid chemistry and biochemistry. In: HUY, Y. H. (Ed.). **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. v. 1, cap. 24, p. 24.

SALGADO, P. R. et al. Bioactive Packaging. **Nanomaterials for Food Applications**, p. 233–270, 2019.

SAMPATHKUMAR, B.; KHACHATOURIANS, G. G.; KORBER, D. R. Food processing biofilms and antimicrobial agents. In: HUY, Y. H. (Ed.). **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. v. 1, cap. 84, p. 84.

SEPPERER, T. et al. Purification of industrial tannin extract through simple solid-liquid extractions. **Industrial Crops and Products**, v.139, p.111502, 2019.

SEPPERER, T.; TONDI, G. Tannin-furanic foams from purified extracts. **Proceedings of the 5th International Conference on Processing Technologies for the Forest and Biobased Industries, PTF-BPI**. Freising/Munich, Germany, 2018.

SIDHU, J. S.; AL-ZENKI, S. F. Fruits: horticultural and functional properties. In: HUY, Y. H. (Ed.). **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. v. 1, cap. 8, p. 8.

SONG, L. et al. Supercritical CO₂ fluid extraction of flavonoid compounds from Xinjiang jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) leaves and associated biological activities and flavonoid compositions. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. 1, p. 111508, 2019.

TONDI, G.; PETUTSCHNIGG, A. Middle infrared (ATR FT–MIR) characterization of industrial tannin extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 422–428, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.005>

VENTER, P. B. et al. Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 3: the chemical composition of wattle (*Acacia mearnsii*) bark extract. **Phytochemistry**, v. 83, p. 153-167, 2012.

VILELA, C. et al. A concise guide to active agents for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 212-222, 2018.

XIONG, J. et al. Polyphenols isolated from *Acacia mearnsii* bark with anti-inflammatory and carbolytic enzyme inhibitory activities. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 11, p. 816-824, 2017.

ZHOU, J. et al. The Application of Supercritical Fluids Technology to Recover Healthy Valuable Compounds from Marine and Agricultural Food Processing By-Products: A Review. **Processes**, v. 9, n.2, p. 357, 2021.