

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2021.11.30	(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE AVEIRO CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SANTIAGO 3810-193 AVEIRO PT
(30) Prioridade(s):	UNIVERSIDADE DE COIMBRA PT
(43) Data de publicação do pedido: 2023.05.30	RAIZ - INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO DA FLORESTA E PAPEL PT
(45) Data e BPI da concessão: 2024.07.16 139/2024	(72) Inventor(es): PAULA CRISTINA DE OLIVEIRA RODRIGUES PINTO PT ALEXANDRE MIGUEL RICARDO GASPAR PT MARIA TERESA DE TEIXEIRA CRUZ ROSETE PT ARMANDO JORGE DOMINGUES SILVESTRE PT CARLOS DE PASCOAL NETO PT
	(74) Mandatário: MARIANA BELO DE OLIVEIRA RUA DOMINGOS FERREIRA PINTO BASTO, 45 3830-176 ÍLHAVO PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO INTEGRADO DE EXTRACÇÃO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE BIOMASSA DE EUCALIPTO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO A UM PROCESSO INTEGRADO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENRIQUECIDOS EM FAMÍLIAS ESPECÍFICAS DE COMPOSTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE BIOMASSA DE EUCALIPTO QUE INCLUI OS PASSOS DE HIDRODESTILAÇÃO DE BIOMASSA DE EUCALIPTO, COM A PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO, E A SUBSEQUENTE EXTRACÇÃO DA BIOMASSA RESULTANTE COM O ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO. OCORRE AINDA UMA EXTRACÇÃO DA BIOMASSA RESULTANTE COM ÁGUA E/OU UM ÁLCOOL ALIFÁTICO E / OU COM MISTURAS DE ÁGUA E ÁLCOOIS ALIFÁTICOS. O PROCESSO AQUI DIVULGADO PERMITE, DE UMA FORMA INTEGRADA, A OBTENÇÃO DE UMA VARIADA GAMA DE PRODUTOS DE VALOR ACRESCENTADO A PARTIR DA MESMA BIOMASSA, PERTENCENTES A DIFERENTES FAMÍLIAS QUÍMICAS E APRESENTANDO DIFERENTES GRAUS DE POLARIDADE, E USANDO UMA MENOR VARIEDADE E QUANTIDADE DE SOLVENTES ORGÂNICOS. O PROCESSO OBJECTO DESTA INVENÇÃO É TAMBÉM CARACTERIZADO POR UM DOS PRODUTOS OBTIDOS SER USADO NUM DOS PASSOS DE EXTRACÇÃO SEQUENCIAL PARA OBTENÇÃO DE UMA OUTRA FAMÍLIA DE PRODUTOS DE ELEVADO VALOR ACRESCENTADO.

RESUMO

"PROCESSO INTEGRADO DE EXTRACÇÃO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE BIOMASSA DE EUCALIPTO"

A presente invenção diz respeito a um processo integrado de obtenção de extratos enriquecidos em famílias específicas de compostos bioactivos a partir de biomassa de eucalipto que inclui os passos de hidrodestilação de biomassa de eucalipto, com a produção de óleo essencial de eucalipto, e a subsequente extracção da biomassa resultante com o óleo essencial obtido. Ocorre ainda uma extracção da biomassa resultante com água e/ou um álcool alifático e / ou com misturas de água e álcoois alifáticos.

O processo aqui divulgado permite, de uma forma integrada, a obtenção de uma variada gama de produtos de valor acrescentado a partir da mesma biomassa, pertencentes a diferentes famílias químicas e apresentando diferentes graus de polaridade, e usando uma menor variedade e quantidade de solventes orgânicos. O processo objecto desta invenção é também caracterizado por um dos produtos obtidos ser usado num dos passos de extracção sequencial para obtenção de uma outra família de produtos de elevado valor acrescentado.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO INTEGRADO DE EXTRACÇÃO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE BIOMASSA DE EUCALIPTO"

Área da Invenção

A invenção descrita neste pedido de patente insere-se na área dos processos de produção de extratos enriquecidos em famílias específicas de compostos bioactivos, sendo objecto desta invenção um processo integrado de obtenção dos referidos extratos a partir da biomassa de eucalipto.

Estado da arte

Para além de uma matéria-prima essencial na produção de pasta e de papel, a biomassa de eucalipto é também uma fonte relevante de compostos de valor acrescentado.

De entre esses compostos de valor acrescentado temos os compostos fenólicos, onde se incluem os flavonóides, ácidos fenólicos, aldeídos, ácidos cinâmicos, cumarinas e cromonas, benzofenonas, xantonas e taninos (Martins et al., *Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review*, Biotechnology Advances 29 (2011) 365-373; Sónia Andreia Oliveira Santos, *Phenolic compounds from forest industrial by-products*, Doctoral Thesis, Universidade de Aveiro, 2012). Os compostos fenólicos devem o seu valor acrescentado às suas atividades anti-microbianas e anti-tumorais, assim como à sua atividade anti-oxidante. Adicionalmente, são reportados os seus efeitos anti-inflamatórios, anti-alérgicos e anti-hemorragicos (Kim et al., *Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of Eucalyptus globulus*, Phytochemistry 2001 Jun;57(4):587-91; Mukhtar et al., *Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice*, Cancer Res. 1988 May 1;48(9):2361-5; Hertog et al., *Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially*

anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, J. Agric. Food Chem. 1992, 40, 9, 1591-1598).

Devido a estas propriedades, os compostos fenólicos são incluídos em medicamentos à base de plantas e suplementos alimentares (Ndhlala et al., *Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?* Molecules 2010, 15, 6905-6930; Pizzi et al., *Tannins: Major Sources, Properties and Applications*. In *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*; Belgacem, M. N., Gandini, A., Eds.; Elsevier: Oxford, U.K., 2008; 179-199).

Outro tipo de compostos de valor acrescentado presentes na biomassa de eucalipto são os compostos triterpénicos, como ácido betulínico, ácido betulónico, ácido 3-acetilbetulínico, ácido 3-acetilbetulínico, ácido ursólico, ácido 3-acetilursólico, ácido oleanólico, ácido 3-acetiloleanólico, β -amirina, α -amirina, β -sitosterol, α -amirenona, lupeol (Domingues et al., *High value triterpenic compounds from the outer barks of several Eucalyptus species cultivated in Brazil and in Portugal*, Industrial Crops and Products 33, 2011, 158-164; Domingues et al., *Eucalyptus biomass residues from agro-forest and pulping industries as sources of high-value triterpenic compounds*, Cellulose Chem. Technol., 45, 2011, 475-481.), que, por sua vez, apresentam propriedades anti-oxidantes, anti-microbianas, anti-virais, anti-alérgicas, anti-pruríticas e anti-angiogénicas (F. Alihosseini, *Plant-based compounds for antimicrobial textiles*, Antimicrobial Textiles, Woodhead Publishing Series in Textiles, 2016, Pages 155-195).

Um outro produto proveniente da biomassa de eucalipto é o seu óleo essencial, com uma composição típica que inclui monoterpenos como o 1,8-cineol (eucaliptol), α -Pineno, β -Pineno, limoneno, canfeno, p-cimeno, e sesquiterpenos como o aromadendreno ou o globulol (Luís et al., *Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *E. globulus* and *E. radiata* essential oils*, Industrial Crops and Products 79 (2016) 274-282), com atividades biológicas comprovadas, por exemplo, anti-microbiana, anti-viral, fungicida, insecticida, anti-inflamatória, anti-nociceptiva, anti-oxidante e fitotóxica

(Zhang et al., *Chemistry and bioactivity of Eucalyptus essential oils*, Allelopathy Journal 25 (2): 313-330 (2010)).

As características benéficas destas famílias de compostos tem levado ao desenvolvimento de métodos que permitam a sua extração, quer da biomassa de eucalipto quer de outras matérias-primas de origem vegetal.

Um dos métodos mais utilizados para os compostos fenólicos e triterpénicos é a extração sólido-líquido, que consiste em promover o contacto da biomassa com um solvente como, por exemplo, água ou solventes polares e apolares ou diferentes misturas dos mesmos. O processo de extração pode decorrer a diferentes temperaturas, razões sólido/líquido e a diferentes tempos de extração (Ballard et al., *Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from Peanut Skins Using Response Surface Methodology*, J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 8, 3064-3072).

Outro processo de extração comum é a extração Soxhlet, em que um solvente, ou suas misturas, é continuamente reciclado e colocado em contacto com a biomassa, através de ciclos consecutivos de ebulição e de condensação (Alara et al. *Soxhlet extraction of phenolic compounds from Vernonia cinerea leaves and its antioxidant activity*, Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 11, 2018, 12-17).

Estas duas técnicas de extração são caracterizadas por requererem um consumo elevado de solventes ou das suas misturas, e por tempos de extração longos (Mussatto et al., *Chapter 11 - Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin*, Coffee in Health and Disease Prevention 2015, Pages 93-106).

Existe também a possibilidade de extração através do uso de fluídos supercríticos. Esta técnica é considerada mais rápida, mais seletiva para compostos menos polares (ou apolares) e, adicionalmente, com um menor impacto ambiental (Sánchez-Camargo, *Supercritical Fluid Extraction*, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering 2014). No entanto, de um modo geral, a extração supercrítica requer o uso de equipamentos caros e as suas

configurações e operações são consideradas complexas (Al Jitan et al., *Chapter 13 - Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health*, in *Studies in Natural Products Chemistry*, Volume 58, 2018, Pages 389-417).

Por sua vez, a hidrodestilação é usada para a extracção de óleos essenciais, consistindo na imersão da matéria-prima em água e exposição ao calor até ao ponto de ebulição da mistura causando a libertação do óleo essencial da matéria-prima. Os compostos são depois separados por diferença de densidades após condensação da mistura (kharraf et al., *Two Extraction Methods of Essential Oils: Conventional and Non-conventional Hydrodistillation*, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23 (5) 2020, 870 - 889).

Uma breve pesquisa permite encontrar diferentes trabalhos que descrevem a obtenção de extratos ricos em compostos de valor acrescentado a partir de biomassa vegetal, usando as técnicas e os solventes de extração mencionados.

O pedido de patente EP1687326A2 descreve um método para a obtenção de triterpenóides, como, por exemplo, lupeol e ácido betulínico, a partir de biomassa vegetal como casca de bétula, que envolve o uso de, pelo menos, dois solventes orgânicos em processos de extração. Os solventes considerados na invenção descrita neste pedido de patente incluem hidrocarbonetos aromáticos, tais como xileno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, tolueno, benzeno e suas combinações, solventes clorados, tais como clorofórmio e diclorometano, bem como outros solventes orgânicos, tais como éter etil-t-butílico e acetato de etilo.

A patente JP5602346B2 descreve um método de obtenção de um extracto de eucalipto, mais particularmente uma fração rica em compostos mono e sesquiterpénicos abundantes no óleo essencial, através de vários passos de extração que envolvem solventes orgânicos escolhidos de entre n-hexano, tolueno, dicloroetano, clorofórmio, acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, propanol, butanol, etilenoglicol, propileno, glicol, butilenoglicol e semelhantes.

O pedido de patente EP1960329A2 descreve um processo para obtenção de diferentes compostos a partir de matéria vegetal, como óleo essencial, compostos fenólicos, derivados de

açúcares, compostos terpénicos e ácidos orgânicos. O processo descrito envolve a aplicação de diferentes etapas de extração (duas, três ou mais) com o mesmo tipo de solvente, ou com diferentes escolhas ou misturas dos mesmos. Temos citado, por exemplo, o uso de acetato de etilo, soluções de hidróxido de sódio e de hexano.

Trabalhos académicos relatam o uso de extrações com dióxido de carbono em condições supercríticas, como é o caso do estudo de Domingues et al. (*Supercritical Fluid Extraction of Eucalyptus globulus Bark—A Promising Approach for Triterpenoid Production*, Int. J. Mol. Sci. 2012, 13(6), 7648–7662) ou de Santos et al. (Santos et al., *Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from Eucalyptus globulus Labill bark*, The Journal of Supercritical Fluids, 2012, 71–79) para a extração de, respetivamente, compostos triterpenénicos e compostos fenólicos a partir de casca de *E. globulus*. Por sua vez, Ferreira e co-autores (*Phenolic Compounds in Extracts from Eucalyptus globulus Leaves and Calendula officinalis Flowers*, Journal of Natural Products and Resources 2(1) (2016) 53–57), descrevem, a extração de folhas de *E. globulus* com solventes escolhidos como clorofórmio, etanol e metanol.

Verifica-se assim a predominância de processos de extração de compostos de valor acrescentado que utilizam solventes orgânicos e frequentemente suas misturas, em vários passos de extração. Como é do conhecimento geral, os solventes orgânicos apresentam toxicidade a nível humano, animal e ambiental, sendo crescente a procura por alternativas menos adversas. Os processos de extração existentes limitam o tipo de extrato obtido, sendo os processos desenvolvidos, na sua maioria, focados na produção de extratos enriquecidos num determinado tipo de compostos.

É assim de extrema relevância o desenvolvimento de um método de extração que permita a obtenção de diferentes extractos, enriquecidos em determinadas famílias de compostos bioactivos de valor acrescentado, com diferentes polaridades e diferentes propriedades bioativas, a partir de uma mesma biomassa, maximizando a geração de valor acrescentado, e que permita uma diminuição do uso de solventes orgânicos, quer em quantidade quer no seu número e, conseqüentemente, levando

também a uma diminuição dos custos envolvidos no processo, no que diz respeito à recuperação de solventes orgânicos e diminuição de impactos ambientais. Condições de temperatura e de pressão moderadas são também desejáveis. Estes requisitos são satisfeitos pelo processo descrito neste pedido de patente.

Resumo da invenção

A presente invenção refere-se a um processo integrado de extracção de compostos bioactivos a partir de biomassa de eucalipto constituído pelos seguintes passos:

- a) selecção de folhagem de eucalipto;
- b) hidrodestilação da folhagem de eucalipto para a produção de um extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação, de um óleo essencial de eucalipto e de uma biomassa hidrodestilada;
- c) separação do extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação, do óleo essencial de eucalipto e da biomassa hidrodestilada obtidos no passo b);
- d) extração da biomassa resultante do passo c) e/ou casca de eucalipto com o óleo essencial de eucalipto resultante do passo c) até à obtenção de um extracto de compostos triterpénicos dissolvidos em óleo essencial de eucalipto e de uma biomassa extraída;
- e) hidrodestilação da biomassa extraída resultante do passo d) até à obtenção de um extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação, do óleo essencial de eucalipto e de uma biomassa hidrodestilada;
- f) extração da biomassa resultante do ponto e) com água e/ou com um álcool alifático e / ou com misturas de água e álcoois alifáticos até à obtenção de um extracto de compostos fenólicos e de uma biomassa pós-extracção.

Numa forma preferencial da invenção o processo inclui ainda passo de secagem da biomassa hidrodestilada resultante do passo c).

Numa forma preferencial da invenção o passo f) decorre em meio acidificado por um ácido orgânico.

Numa forma preferencial da invenção o passo f) decorre com álcoois alifáticos como metanol, etanol ou propanol.

Numa forma preferencial da invenção ocorre ainda um passo de purificação do extracto de compostos triterpénicos dissolvidos em óleo essencial de eucalipto resultante do passo d) até à obtenção de óleo essencial de eucalipto e de compostos triterpénicos. Esta purificação é efectuada através de métodos de purificação, individualmente ou sequencialmente como, mas não limitado a, filtração, extracção alcalina, acidificação e precipitação.

Numa forma preferencial da invenção ocorre ainda um passo de purificação do extracto de compostos fenólicos obtido no passo f). Esta purificação é efectuada através de métodos de purificação, individualmente ou sequencialmente como, mas não limitado a, filtração, evaporação e liofilização.

Num aspecto desta invenção, os produtos deste processo, nomeadamente, as correntes do óleo essencial de eucalipto e as correntes do extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação, são, individualmente, recolhidas e sujeitas a diferentes passos subsequentes: o óleo essencial de eucalipto obtido nos passos c) e e) é recolhido para subsequente rectificação e/ou concentração e/ou purificação; o extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação obtido nos passos c) e e) é recolhido para subsequente rectificação e/ou concentração e/ou purificação.

Descrição da invenção

Breve descrição das figuras

Figura 1 - Diagrama do processo integrado para produção simultânea de compostos bioactivos de valor acrescentado a partir de biomassa de eucalipto como descrito nesta invenção. EAR - extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação; BE - biomassa eucalipto; OEE - óleo essencial eucalipto; TT - extracto de compostos triterpénicos.

Descrição pormenorizada da invenção

A invenção descrita neste documento diz respeito a um processo integrado para a produção simultânea de compostos bioactivos de valor acrescentado a partir de uma mesma biomassa de eucalipto, de acordo com o descrito neste pedido de patente e reivindicação 1, que permite a obtenção de uma variedade de extratos, enriquecidos em famílias específicas de compostos e com diferentes graus de polaridade, usando um menor número e respectiva quantidade de solventes orgânicos. São assim minimizados os problemas de recuperação de solventes e de possível toxicidade e/ou contaminação ambiental. Permite também uma redução nos custos associados à produção de extratos ricos em compostos bioactivos de valor acrescentado. O processo descrito neste documento envolve um processo integrado que inclui estágios de extração, que potenciam a obtenção de diferentes extratos, enriquecidos em diferentes famílias de compostos de valor acrescentado de uma mesma biomassa, e a recirculação de um dos produtos deste processo de extração, diminuindo os problemas associados à recuperação de solventes orgânicos e dos custos associados.

De facto, e como detalhado de seguida, no processo aqui descrito, a biomassa de base, por exemplo folhas ou casca de eucalipto, gera ela própria o solvente que vai permitir extrair de seguida os compostos triterpénicos, isto é, o óleo essencial, obtido por hidrodestilação da biomassa original e a sua subsequente utilização como solvente na extracção sequencial de compostos triterpénicos.

No âmbito da presente invenção um composto bioactivo diz respeito a compostos presentes em matérias vegetais com efeitos benéficos para a saúde humana, como efeito antioxidante, anti-microbianas, anti-tumorais, anti-inflamatórios e anti-alérgicos, entre outros efeitos benéficos.

No âmbito da presente invenção extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação diz respeito a um extrato não volátil obtido da água residual resultante do processo de hidrodestilação de folhas para recolha do óleo essencial, que tem na sua constituição compostos fenólicos como, por exemplo e não limitados a flavonóides, ácidos fenólicos, aldeídos, ácidos cinâmicos, cumarinas e cromonas, benzofenonas, xantonas e taninos.

No âmbito da presente invenção óleo essencial refere-se ao produto obtido após sujeição de biomassa vegetal ao processo de hidrodestilação, onde água é evaporada simultaneamente com o óleo essencial e após condensação são separados em duas fases, sendo uma delas o óleo essencial. Este é constituído por uma mistura complexa de compostos biologicamente activos.

Biomassa seleccionada de eucalipto, folhagem, é submetida a uma hidrodestilação até à produção de um extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação e de um óleo essencial de eucalipto. A biomassa hidrodestilada, isto é, após o processo de hidrodestilação, é seca antes da sua extração subsequente. Óleo essencial de eucalipto obtido na primeira hidrodestilação é usado para extração da folhagem resultante do passo de secagem e/ou casca. Desta extração resultam um extracto de compostos triterpénicos dissolvidos em óleo essencial de eucalipto e biomassa extraída. Esta biomassa seja ela folhagem e/ou casca é de novo hidrodestilada para recuperação do óleo essencial que ficou retido na biomassa da etapa anterior, obtendo-se biomassa hidrodestilada, óleo essencial de eucalipto e um extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação.

A biomassa resultante é encaminhada para uma outra extração com água e/ou com álcoois alifáticos e/ou com misturas de água e álcoois alifáticos. Esta última extração, para além

do extrato rico em compostos triterpenénicos e dos constituintes do óleo essencial de eucalipto obtidos no decurso dos passos processuais descritos acima, permite a obtenção de um extracto de compostos fenólicos.

O extracto de compostos triterpénicos dissolvidos em óleo essencial de eucalipto e resultante da extração com o óleo essencial é sujeito a um ou mais processos de purificação. O extracto de compostos fenólicos obtido no passo final é sujeito a um ou mais processos de purificação.

As diferentes correntes das gamas de produtos obtidas neste processo integrado, quer seja do óleo essencial de eucalipto ou de extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação, são recolhidas, individualmente e sujeitas, de acordo com a sua constituição, a processos de rectificação, concentração e/ou de purificação.

Diferentes processos de purificação podem ser seleccionados, individualmente ou sequencialmente, entre, por exemplo, mas não limitado a, filtração, extração alcalina, acidificação e precipitação.

O processo descrito neste pedido de patente permite assim a produção de uma variedade de compostos de valor acrescentado, da mesma biomassa, possibilitando a recirculação de diferentes subprodutos e solventes, minimizando assim custos de produção e impactos ambientais subsequentes. De facto, um dos produtos obtidos, o óleo essencial é usado para a extração, neste processo integrado, de uma outra família de produtos. Compostos triterpénicos, óleo essencial de eucalipto, extratos com compostos fenólicos obtidos da água residual da hidrodestilação e compostos fenólicos são obtidos através dos passos sequenciais e integrados do processo em causa.

Exemplo

Extração da fracção rica em compostos triterpénicos com o óleo essencial

A biomassa extraída por hidrodestilação foi liofilizada, triturada e posteriormente extraída com o óleo, tal como óleo essencial de eucalipto e/ou 1,8-cineol. Aproximadamente 7 g de folhagem e/ou casca de eucalipto foram extraídas com 25 mL de óleo essencial de eucalipto e/ou 1,8-cineol, à temperatura ambiente, protegido da luz e com agitação até 24h.

A biomassa e a fração líquida (extrato enriquecido em compostos triterpénicos dissolvidos no óleo essencial) foram separadas pelo processo de separação por prensagem, obtendo-se um extrato rico em compostos triterpénicos dissolvidos em óleo essencial e/ou 1,8-cineol. O teor total de triterpénicos foi de 28.4 g kg⁻¹ de biomassa seca, contendo 18.3 g kg⁻¹ de biomassa seca de ácido ursólico, 6.0 g kg⁻¹ de biomassa seca de ácido oleanólico, 2.6 g kg⁻¹ de biomassa seca de ácido betulónico e 1.4 kg⁻¹ de biomassa de ácido betulínico.

Fracionamento do extrato bruto do óleo essencial da biomassa

Um volume de 15 mL de extrato bruto do óleo essencial foi extraído com 15 mL de hidróxido de sódio aquoso (NaOH) 0.1 M, sendo esta extração L-L repetida entre 9 e 16 vezes. A fase aquosa foi separada da fase orgânica (óleo essencial e/ou cineol) por decantação. Foi ainda centrifugada, e posteriormente filtrada a vácuo através de filtro de celulose Whatman 6 (3 µm), sendo obtida uma solução mais límpida. A referida solução foi acidificada a pH < 3 com ácido sulfúrico 2 M (H₂SO₄), resultando numa suspensão precipitada. O precipitado foi filtrado a vácuo, lavado com 1 L de água destilada até pH neutro, e seco a 105 °C durante 3 h.

Foram obtidos 292 mg de extrato, constituído por 65.7% de ácido ursólico, 18.1% de ácido oleanólico, 6.1% de ácido betulónico e 2.3% de ácido betulínico.

Extração de compostos fenólicos com recurso a água, e/ou álcoois alifáticos, e/ou misturas de água e álcoois alifáticos

A biomassa extraída foi sequencialmente sujeita a extração com água, e/ou álcoois alifáticos de cadeia curta, e/ou misturas de água e álcoois alifáticos com ou sem acidificação (por exemplo com ácido acético), usando razões de solvente / biomassa, em massa/volume, até 1:100, com um tempo de extração de até 24 h e temperaturas de pelo menos iguais à temperatura ambiente e até à temperatura de ebulição do solvente usado.

A fração sólida e o extrato rico em compostos fenólicos dissolvido no solvente usado foram separados por filtração, extração alcalina, acidificação e precipitação, e o extrato sólido obtido por remoção do solvente por evaporação, liofilização e combinação de ambos.

Foram observados rendimentos globais de pelo menos 8.0 % e 11.5 % para extrações com misturas de metanol:água e etanol:água, respetivamente, e 12.1 % e 15.0 % para extrações com etanol e metanol, respetivamente em termos de kg extracto produzido por kg de biomassa.

Tabela 1. Rendimentos de extracção com diferentes solventes considerados.

Solvente	Rendimento (%)
Etanol	12,1
Metanol	15,0
Etanol:água	11,5
Metanol:água	8,0

REIVINDICAÇÕES

1. Processo integrado de extracção de compostos bioactivos a partir de biomassa de eucalipto, caracterizado por compreender os seguintes passos:
 - a) selecção de folhagem de eucalipto;
 - b) hidrodestilação da folhagem de eucalipto para a produção de um extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação, de um óleo essencial de eucalipto e de uma biomassa hidrodestilada;
 - c) separação do extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação, do óleo essencial de eucalipto e da biomassa hidrodestilada obtidos no passo b);
 - d) extração da biomassa resultante do passo c) e/ou casca de eucalipto com o óleo essencial de eucalipto resultante do passo c) até à obtenção de um extracto de compostos triterpénicos dissolvidos em óleo essencial de eucalipto e de uma biomassa extraída;
 - e) hidrodestilação da biomassa extraída resultante do passo d) até à obtenção de um extrato com compostos fenólicos obtido da água residual da hidrodestilação, do óleo essencial de eucalipto e de uma biomassa hidrodestilada;
 - f) extração da biomassa resultante do ponto e) com água e/ou com um álcool alifático e / ou com misturas de água e álcoois alifáticos até à obtenção de um extracto de compostos fenólicos e de uma biomassa pós-extracção.
2. Processo de acordo com a reivindicação anterior caracterizado por compreender ainda um passo de secagem da biomassa hidrodestilada resultante do passo c).
3. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por a extracção do passo f) ser realizada em meio acidificado por um ácido orgânico.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por a extracção do passo f) ser realizada com álcoois alifáticos seleccionados do grupo consistindo em metanol, etanol e propanol.
5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por compreender ainda um passo de purificação do extracto de compostos triterpénicos dissolvidos em óleo essencial de eucalipto resultante do passo d) até à obtenção do óleo essencial de eucalipto e de um extrato de compostos triterpénicos.
6. Processo de acordo com a reivindicação anterior caracterizado pelo passo de purificação do extrato de compostos triterpénicos dissolvidos em óleo essencial de eucalipto ser realizado através de métodos de purificação, individualmente ou sequencialmente, seleccionados do grupo consistindo em filtração, extracção alcalina, acidificação e precipitação.
7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por compreender ainda um passo de purificação do extracto de compostos fenólicos obtido no passo f).
8. Processo de acordo com a reivindicação anterior caracterizado pelo passo de purificação do extracto de compostos fenólicos ser realizado através de métodos de purificação, individualmente ou sequencialmente, seleccionados do grupo consistindo em filtração, evaporação e liofilização.
9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por compreender ainda a recolha do óleo essencial de eucalipto obtido nos passos c) e e) para subsequente rectificação e/ou concentração e/ou purificação.
10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por compreender ainda a recolha dos extratos com compostos fenólicos obtidos da água residual da hidrodestilação obtidos nos passos c)

e e) para subsequente rectificação e/ou concentração e/ou purificação.

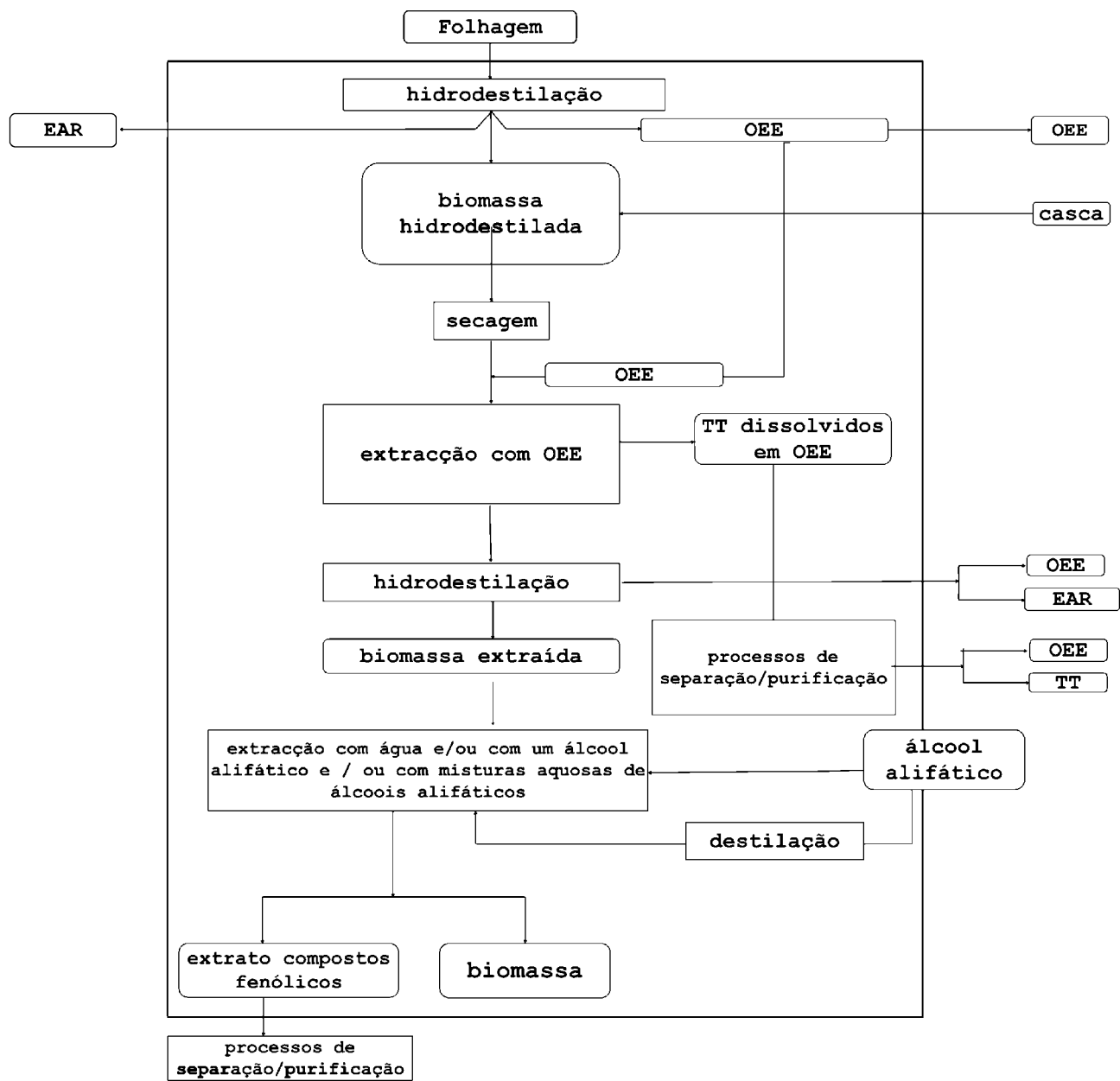


Figura 1