



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

Mayra Arauco Livia

**Obtenção e separação de compostos bioativos de *SCHINUS
TEREBINTHIFOLIUS* RADDI em meio supercrítico e
avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas.**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.

Livia, Mayra Arauco

Obtenção e Separação de Compostos Bioativos de *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI em Meio Supercrítico e Avaliação da Atividade Citotóxica em Células Leucêmicas / Maayra Arauco Livia / orientador, Ariovaldo Bolzan – Florianópolis, SC, 2014.

131 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. extração e separação supercrítico. 3. *Schinus terebinthifolius* atividade citotóxica. 4. células leucêmicas. Bolzan, Ariovaldo. I. Universidade Federal de Santa Catarina. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Mayra Arauco Livia

Obtenção e separação de compostos bioativos de *SCHINUS
TEREBINTHIFOLIUS* RADDI em meio supercrítico e
avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas.

Este Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
Doutor em Engenharia Química, e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade
federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 20 de dezembro de 2013.

Prof. Dr. Ricardo A. F. Machado
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Orientador

Prof. Dr. Ricardo A. F. Machado

Prof. Leonel Teixeira Pinto

Prof. Dr. Luiz Henrique C. Carlson

Prof. Dr. Marcos M. Mazzucco

Dr. André Lourenço Nogueira

Este trabalho é dedicado:

À minha mãe, Lucrecia, meu esposo Andrés, e de maneira especial às minhas filhas, Daniela e Luciana, motores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente na minha vida, guardando, guiando e iluminando a mim e a toda minha família.

Ao Governo Brasileiro, em especial à Coordenação de Aperfeiçoamento a nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan pelos conhecimentos transmitidos, pela orientação e confiança tanto no plano profissional como no pessoal, muito obrigada.

À Alessandra Marangoni e família, pelos conhecimentos compartilhados, carinho, amizade e suporte que foram fundamentais durante este período da minha vida.

À André Zibetti, pelo conhecimento compartilhado, apoio, dedicação e amizade que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas: Fernanda, Magda, Leticia e Daniela pela linda amizade que construímos e todo o conhecimento e ajuda prestada neste processo.

Aos amigos, Paulo Feuser pelo apoio na parte biológica deste estudo e ao Luiz Belchior, que com seus conhecimentos culinários ajudou imensamente no pré-tratamento da matéria prima.

Aos colegas do LCP- Laboratório de Controle de Processos, que participaram deste estudo sendo de grande importância para a conclusão deste trabalho. Entre elas a estagiária de iniciação científica Zuleica pelo carinho e responsabilidade cedida.

À minha mãe, Lucrecia, por todo o amor, incentivo e preocupação, como sempre, sem você não teria conseguido.

Ao meu pai Luis, ao meu irmão Alexis, vó Estela, e família em geral, base da minha estrutura, porque mesmo na distância sempre estiveram perto.

À minha segunda mãe, tia Yoli, sempre torcendo por nossas conquistas.

E por ultimo e mais importante, às minhas filhas Daniela e Luciana pela compreensão nas minhas ausências e ao meu esposo Andrés, por ter conseguido me suportar nesta aventura.

Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei
sobre os ombros de gigantes.

Isaac Newton

RESUMO

A utilização de fluido supercrítico para fracionamento e purificação de misturas complexas tem sido cada vez mais estudada e aplicada em diferentes matrizes durante as últimas décadas. Este processo apresenta uma tecnologia inovadora para a remoção seletiva de monoterpenos e a purificação ou enriquecimento de terpenos oxigenados bioativos. Estes compostos possuem um alto potencial na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos. A pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* raddi), membro da família Anacardiaceae e amplamente distribuída ao longo da costa do território brasileiro, possui várias ações terapêuticas, tais como: cicatrizante, antisséptica, antifúngica e antiinflamatória. Além destas, recentemente a pimenta rosa apresentou potencial citotóxico em linhagens de células cancerosas. Visando a aplicação de compostos bioativos de *Schinus terebinthifolius* raddi na área biomédica, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo para a obtenção e separação destes compostos a partir de extração com fluido supercrítico. Para isto, diferentes condições operacionais de extração foram avaliadas. Os resultados obtidos apresentaram a existência de duas frações com diferente composição química, quando 80 bar de pressão a 35°C foram utilizados. Esta condição de operação apresentou o melhor fracionamento dos extratos. Com a finalidade de otimizar a metodologia de separação utilizada, foi realizada uma avaliação do comportamento dos compostos químicos ao longo do processo de extração. A primeira fração obtida do extrato apresenta os seguintes compostos majoritários: alfa-felandreno, delta-3-carene e limoneno. Enquanto que a segunda, beta-Elemen-7 alfa-ol, Elemol e beta-elemene. Avaliação da atividade citotóxica das frações em linhagens de células leucêmicas (Leucemia mieloide crônica agudizada e Leucemia aguda linfoblástica) foi realizada. De acordo com os resultados obtidos observou-se que fração 1 obtida na condição operacional de 80 bar e 35°C apresenta alta atividade citotóxica, muito maior inclusive quando comparada à atividade do óleo essencial obtido pela técnica tradicional de hidrodestilação, enquanto que a fração 2 apresentou um estímulo para o crescimento das células cancerígenas.

Palavras chave: extração e separação supercrítico, *Schinus terebinthifolius* atividade citotóxica, células leucêmicas.

ABSTRAC

The use of supercritical fluid fractionation and purification of complex mixtures has been increasingly studied and used in different matrices during the last decades. This process presents an innovative technology for the selective removal of monoterpenes and purification or enrichment of bioactive oxygenated terpenes. These compounds have a high potential in the pharmaceutical, cosmetic and food industry. The pink pepper (*Schinus terebinthifolius* raddi), member of the Anacardiaceae family and widely distributed along the coast of Brazil, has several therapeutic actions, such as healing, antiseptic, antifungal and anti-inflammatory. Apart from these recently introduced pink pepper cytotoxic potential in cancer cell lines. Aiming at the application of bioactive compounds *Schinus terebinthifolius* raddi in the biomedical field, this study aimed to develop a protocol for the collection and separation of these compounds from supercritical fluid extraction. For this, different operating conditions for extraction were evaluated. The results obtained showed the presence of two fractions with different chemical composition, when 80 bar pressure at 35° C were used. This operating condition showed the best fractionation of the extracts. In order to optimize the fractionation methodology used, an assessment of the behavior of chemicals throughout the extraction process compounds was performed. The first fraction obtained from the extract has the following major compounds: alpha-phellandrene, delta-3-carene and limonene. While the second ele-beta-ol-7 alpha, and beta-elemeneelemol. Evaluation of the cytotoxic activity of fractions in leukemic cell lines (acute on chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia) was performed. The results showed that fraction 1 obtained from the operating condition 80 bar and 35°C has high cytotoxic activity even much greater when compared to the essential oil obtained by the traditional technique of hydrodistillation activity, whereas fraction 2 presented a stimulus for the growth of cancer cells.

Key words: Supercritical fluid extraction and fractionation; *Schinus terebinthifolius*; cytotoxic activity, Leukemia cell lines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Kronel®, sabonete líquido para higiene íntima. KIOS® indicado no tratamento sintomático da gastrite leve a moderada.	32
Figura 2: Diagrama de fase do dióxido de carbono. Temperatura - Pressão, SANDERS,(1993).	36
Figura 3: Curva típica de extração com fluido em estado supercrítico. Fonte: Brunner, 1994.	39
Figura 4: Diagrama de fluxo das atividades realizadas no presente trabalho.	53
Figura 5: Fotografia do processo de pre- tratamento da matriz vegetal <i>S. terebinthifolius</i> . A- semente; B- Casca da semente; C- Semente particulada e sem casca.	54
Figura 6: Aparelho tipo Clevenger. Fonte: Adaptado de Ramos, 2007.	57
Figura 7: Unidade de extração do laboratório de Controle de Processos: HPLC SC.	58
Figura 8: Unidade de extração (HPLC-SC). B- bomba HPLC, E- extrator, BP- Válvula Backpressure, H –Aquecimento.	59
Figura 9: Microfotografia das partículas das sementes de <i>S. terebinthifolius raddi</i> . (Ampliação= 20 vezes).	70
Figura 10: Influência da densidade no rendimento total de cada extração.	74
Figura 11: Efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico de <i>S. terebinthifolius</i> R.	75
Figura 12: Efeito da pressão sobre o rendimento do extrato supercrítico de <i>S. terebinthifolius</i> R.	76
Figura 13: Gráfico de Pareto.	78
Figura 14: Gráfico de superfície de resposta para o rendimento global da ESC de <i>S. terebinthifolius</i> em função da Pressão e a temperatura.	79
Figura 15: Curvas de nível para os fatores pressão e temperatura.	79
Figura 16: Curva de extração na condição de 100 bar e 55 °C.	81
Figura 17: Curvas de extração obtidas em todas as condições operacionais.	82

Figura 18: 150 bar e 35°C.....	84
Figura 19:150 bar e 45°C.....	85
Figura 20: 200 bar e 35°C.....	85
Figura 21: 200 bar e 55°C.....	85
Figura 22: Frações 1 e 2 de extrato supercrítico de <i>Schinus terebinthifolius</i>	87
Figura 23: Cromatograma obtidos por GC-MS para Fração 1na condição de 80bar e 35C. (Compostos identificados por números segundoTabela 15).....	91
Figura 24: Cromatograma obtido por GC-MS para Fração 2 na condição de 80bar e 35C. (Compostos identificados por números segundoTabela 14).....	91
Figura 25: Cromatograma obtido por GC-MS para Fração 1, na condição de 220 bar e 45C. (Compostos identificados por números segundo Tabela 15).....	92
Figura 26: Cromatograma obtido por GC-MS para Fração 2, na condição de 220 bar e 45C. (Compostos identificados por números segundo Tabela 15).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 27: Gráfico do processo e extração na condição de 80bar e 35°C com 25 pontos de coleta.....	93
Figura 28: Quantidade de alfa-pineno ao longo do tempo	94
Figura 29: Quantidade de sabineno ao longo do tempo	94
Figura 30: Quantidade de myrceno ao longo do tempo	94
Figura 31: Quantidade de alfa-felandreno ao longo do tempo.....	94
Figura 32: Quantidade de para-cymeno ao longo do tempo.	95
Figura 33: Quantidade de delta-3-careno ao longo do tempo.	95
Figura 34: Quantidade de limoneno ao longo do tempo.	95
Figura 35: Quantidade de terpinoleno ao longo do tempo de extração.....	96
Figura 36: Quantidade de alfa-felandreno-epoxido ao longo do tempo.	96
Figura 37: Quantidade de eneldo pimenta ao longo do tempo.....	97
Figura 38: Quantidade de delta-elemeno ao longo do tempo.....	97
Figura 39: Quantidade de cariofileno ao longo do tempo.....	97

Figura 40: Quantidade de beta-elemene ao longo do tempo.	97
Figura 41: Quantidade de germacrene D ao longo do tempo.	98
Figura 42: Quantidade de terpinoleno ao longo do tempo.	98
Figura 43: Quantidade de terpinoleno ao longo do tempo.	98
Figura 44: Gráfico da viabilidade celular em células Jurkat e K562 após serem inoculadas com as frações 1 e 2 nas condições experimentais estudadas.	100
Figura 45: Efeito citotóxico das frações em células K562	102
Figura 46: Efeito citotóxico das frações em células Jurkat	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição química dos compostos majoritários obtidos do óleo essencial dos frutos de <i>S. terebinthifoliosus</i>	34
Tabela 2: Planejamento Experimental.....	60
Tabela 3: Matriz do planejamento em estrela.....	60
Tabela 4: Tempo de coleta da fração 1 e a fração 2.....	64
Tabela 5: Identificação dos extratos analisados por GC-MS e GC-FID.....	64
Tabela 6: Intervalos de tempo de coleta para cada ponto de coleta durante o processo de extração.....	65
Tabela 7: Identificação das frações testadas para avaliação de potencial anticancerígeno.....	66
Tabela 8: Parâmetros do leito fixo.....	71
Tabela 9: Composição química do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i> obtido pela técnica de hidrodestilação.....	72
Tabela 10: Rendimento obtido a partir do planejamento em estrela.	73
Tabela 11: Estimativa dos efeitos significativos que influenciaram na variável resposta.....	77
Tabela 12: Valores de Solubilidade experimental para cada condição de extração.....	83
Tabela 13: Ajuste dos Parâmetros.....	83
Tabela 14: Massa obtida para cada fração em cada condição de extração.....	88
Tabela 15: Composição química (% área GC-MS) dos extratos separados de <i>S. terebinthifolius</i>	90
Tabela 16: Valores de IC ₅₀ encontrados nas linhagens K562, Jurkat após incubação por 24 horas com extratos de <i>S. terebinthifolius</i>	101

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
3.1	PLANTASMEDICINAIS	30
3.1.1	Anticancerígenos derivados de plantas	30
3.2	MATRIZ VEGETAL: <i>SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI</i> ..	31
3.2.1	Composição química do extrato de <i>S. terebinthifolius</i>	32
3.3	FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	35
3.4	PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO	38
3.4.1	Curvas de extração	38
3.4.2	Solubilidade e taxa de transferência de massa em extração supercrítica de óleos essenciais	40
3.4.3	Efeito da matriz vegetal	41
3.4.4	Efeito de parâmetros operacionais da extração supercrítica..	41
3.5	MODELAGEM MATEMÁTICA.....	43
3.5.1	Modelo de Sovová	44
3.6	FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS NATURAIS UTILIZANDO FLUIDO SUPERCRÍTICO	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1	MATERIA PRIMA.....	54
4.1.1	Caracterização do leito de partículas.....	54
4.1.2	Determinação do teor de umidade.....	55
4.1.3	Distribuição granulométrica.....	55
4.1.4	Determinação do tamanho médio das partículas.....	55
4.1.5	Densidade do solvente.....	56
4.1.6	Determinação da densidade real das partículas (ρ_r), densidade aparente (ρ_a) e da porosidade do leito (ϵ).....	56
4.2	PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E EXPERIMENTOS REALIZADOS	57
4.2.1	Extração por Hidrodestilação.....	57

4.2.2	Extração com dióxido de carbono em estado supercrítico....	58
4.3	MODELAGEM MATEMÁTICA	62
4.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DE <i>S. TEREBINTHIFOLIUS</i>	62
4.4.1	Condições analíticas GC-MS/GC-FID	62
4.5	SEPARAÇÃO DOS EXTRATOS	63
4.5.1	Primeira etapa: Identificação do número de frações	63
4.5.2	Segunda etapa: Comportamento dos compostos químicos ao longo do tempo no processo de extração supercrítica.....	64
4.6	TESTES DE DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS CANCEROSAS	65
4.6.1	Identificação e preparação de extratos fracionados	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA E DO LEITO	69
5.1.1	Determinação do teor de Umidade	69
5.1.2	Determinação do tamanho médio da partícula.....	69
5.1.3	Determinação da densidade real das partículas (ρ_r), densidade aparente (ρ_a) e da porosidade do leito (ϵ).....	70
5.2	PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	71
5.2.1	Extração por Hidrodestilação.....	71
5.2.2	Extração com CO ₂ supercrítico (ESC).....	72
5.3	MODELAGEM MATEMÁTICA	83
5.4	SEPARAÇÃO DOS EXTRATOS	86
5.4.1	Primeira Etapa: Identificação do número de frações	86
5.4.2	Segunda etapa: Comportamento dos compostos químicos ao longo do tempo no processo de extração supercrítica.....	93
5.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS FRACIONADOS EM CÉLULAS LEUCÊMICAS.....	99
6	CONCLUSÕES.....	103
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
8	BIBLIOGRAFIA.....	107
9	ANEXO A – CROMATOGRAMAS REALIZADOS PARA ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS NA CONDIÇÃO DE 80 BAR E 35°C.....	119

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade é crescente a preocupação dos consumidores em reivindicar produtos ecologicamente corretos que associem qualidade e preservação do meio ambiente. Com este conceito, tecnologias que se preocupam com a qualidade de vida vêm sendo desenvolvidas com ênfase como é o caso do processo de extração e fracionamento que utiliza fluidos supercríticos. Esta técnica de separação utiliza geralmente como solvente o dióxido de carbono por ser inerte, altamente disponível, não produzir resíduo e poder ser recuperado. Além disso, é um processo flexível devido à possibilidade de uma modulação contínua do poder de seletividade do solvente (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Na indústria farmacêutica também a descoberta de novos fármacos, cada vez mais potentes e menos tóxicos é constante. Neste sentido, o reino vegetal detém as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzida, sendo a fonte mais antiga de medicamentos para o homem (SAMUELSSON, 1999).

Os métodos de extração para a obtenção e separação de compostos bioativos a partir de material vegetal são diversos. Entre os métodos tradicionais podem ser citados a hidrodestilação e extração com arraste a vapor. As técnicas tradicionais apresentam desvantagens, como o emprego de alta temperatura, o que pode incorrer na degradação de compostos termo-lábeis e formação de outros compostos indesejados. Outro método comumente utilizado é a extração com solvente orgânico, porém esse processo demanda uma etapa posterior de separação, o que pode elevar os custos de produção, além da possibilidade de contaminação ambiental e da provável presença de resíduos desses solventes no produto final, restringindo a sua aplicação (MUKHOPADHYAY, 2000). Diante desse cenário, a utilização dos fluidos supercríticos tem sido considerada uma boa alternativa para a extração e fracionamento de produtos naturais.

Nesse contexto, tem-se a *Schinus terebinthifolius raddi*, comumente conhecida como pimenta rosa, pertencente à família Anacardiaceae e amplamente distribuída ao longo da costa do território brasileiro (LORENZI, 1998; LENZI, 2004). Esta planta apresenta-se como uma fonte prospera, especialmente quando se considera seu uso popular abundante. Diversas partes desta são utilizadas pelas diferentes ações terapêuticas que possui como: cicatrizante, antisséptica, antifúngica e antiinflamatória, (VELAZQUEZ, et al., 2003; SCHMOURLO, et al., 2005;

DE LIMA, et al., 2006). Além destas, recentemente o óleo essencial dos frutos extraído por hidrodestilação apresentou ação anti-tumoral em linhagens de células cancerosas de seio (BENDAOU et al., 2010).

Na composição química dos frutos hidrodestilados de *S. terebinthifolius* destacam-se os seguintes compostos majoritários: α -pineno; α -felandreno; delta-3-careno; β -felandreno e germacrene-D. Porém, estudos realizados por Barbosa, et al. (2007) confirmam que existe uma elevada variabilidade na composição química dos óleos essenciais dos frutos desta planta, sendo relevante para uma investigação padronizar o local e tempo de colheita.

No processo de extração com dióxido de carbono em estado supercrítico isso já é, em parte, possível, pois ao modificar a densidade do solvente manipula-se a seletividade do fluido supercrítico e, com isso, a solubilidade dos compostos (BRUNNER, 1994; REVERCHON, et al., 2006). Para isto, atualmente utilizam-se separadores acoplados ao extrator e o processo de fracionamento se realiza de maneira contínua durante o processo de extração (GAÑÁN; BRIGNOLE, 2013), no entanto, o controle do processo de separação (fracionamento) é uma tarefa complexa que envolve o equilíbrio de fases (ZIBETTI et al., 2013).

Assim, o caráter inédito deste trabalho está na utilização da tecnologia supercrítica para o desenvolvimento de um protocolo para obtenção e separação do extrato de *S. terebinthifolius* que não necessite de separadores acoplados ao extrator. Para isto, diferentes condições operacionais de extração foram avaliadas e o fracionamento foi realizado de maneira simultânea. Os resultados obtidos apresentaram a existência de duas frações (fração 1 e fração 2) com diferente composição química. Sendo que a condição de 80 bar de pressão e 35°C foi a que apresentou uma melhor separação da composição química. Avaliou-se o comportamento da composição química ao longo do tempo de extração com a finalidade de estabelecer o tempo ótimo de coleta da primeira fração de acordo com o comportamento dos compostos químicos. Para isto, se realizaram coletas em tubos separados em intervalos curtos de tempo durante o processo de extração. Cada coleta foi analisada por cromatografia.

Foram realizados testes para avaliar a citotoxicidade dos extratos fracionados e do óleo essencial obtido por hidrodestilação em linhagens de células leucêmicas (Leucemia mieloide crônica agudizada e Leucemia aguda linfoblástica) obtendo-se como resultado uma alta atividade citotóxica da fração 1. A fração2 apresentou um estímulo para o crescimento das células cancerígenas caracterizando o fracionamento dos extratos.

Para facilidade de apresentação, este trabalho se encontra estruturado em capítulos, sendo que o capítulo 2 apresenta o objetivo geral e os objetivos específicos desta pesquisa. No capítulo 3 se apresenta uma revisão bibliográfica de alguns métodos de extração utilizados tradicionalmente, e em específico a extração e separação com CO₂ em estado supercrítico, plantas medicinais e da pimenta rosa. No capítulo 4 são descritos os materiais e métodos utilizados nos experimentos realizados. No capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos. Para finalizar o capítulo 6 apresenta as conclusões desta pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia para obtenção e separação de compostos bioativos de *S. terebinthifolius*. (pimenta rosa) para uso farmacêutico, baseado em tecnologias limpas, ambientalmente seguras e economicamente viáveis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar os melhores parâmetros operacionais de extração com CO₂ em estado supercrítico, que permitam a retirada de compostos ativos da matriz vegetal;
- b) Identificar os compostos majoritários na matriz vegetal;
- c) Avaliar métodos e metodologias de separação dos compostos ativos de interesse de *S. terebinthifolius*;
- d) Identificar a fração dos extratos de *S. terebinthifolius* com melhor resposta à atividade citotóxica em linhagens de células leucêmicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo é apresentada a revisão completa dos assuntos abordados nesse trabalho na forma de tópicos.

No primeiro tópico deste capítulo revisam-se os aspectos relacionados às plantas medicinais e seu papel como fonte de fármacos anticancerígenos. No segundo apresenta-se a descrição e usos da pimenta rosa (*S. terebinthifolius*), assim como a composição química que apresentam seus extratos.

No quarto tópico revisam-se aspectos teóricos dos fluídos supercríticos seguido do quinto dá ênfase no processo de extração com dióxido de carbono supercrítico.

No sexto tópico, aborda-se estado da arte dos trabalhos de fracionamento usando fluido supercrítico. Finalizando esta revisão, no sétimo tópico apresentam-se as técnicas de separação utilizadas na elaboração dessa pesquisa.

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

Pode-se considerar como planta medicinal aquela planta administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação farmacológica (KUMAR, 2010).

As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades. Sua aplicação é vasta e abrange desde o combate ao câncer até doenças transmitidas por microrganismos patogênicos (RÍOS; RECIO, 2005)

As propriedades que são atribuídas às plantas medicinais são fruto da ação de compostos produzidos pelo seu metabolismo secundário. Estes tipos de compostos orgânicos não estão diretamente ligados com as funções essenciais no metabolismo vegetal, assim, a ausência destes não resulta na morte da planta. Os compostos orgânicos produzidos com estas características são denominados de metabólitos secundários, que são produzidos pelas plantas para atuarem na proteção contra os patógenos e pragas, também apresentando importante papel na fecundação e na distribuição das sementes. Os fisiologistas acreditam que estes compostos foram sendo produzidos ao longo da co-evolução das plantas possibilitando a perpetuação da espécie ao longo dos anos. Estes metabólitos não são produzidos igualmente em todas as plantas, variam de acordo com a família, espécie e local onde são cultivados (TAIZ; ZIEGER, 2006).

3.1.1 Anticancerígenos derivados de plantas

A descoberta de novos fármacos, cada vez mais potentes e menos tóxicos é constante. Assim, as plantas medicinais possuem um importante papel no tratamento do câncer. Muitas das novas aplicações clínicas de metabólitos secundários oriundos de plantas e seus derivados têm sido direcionadas ao combate desta patologia (FELIPE, 2010; BENDOUD et al., 2010; PARISOTTO et al., 2012). Mesmo que, a molécula isolada do vegetal não possa ser usada diretamente como medicamento, pode servir de modelo para síntese ou para gerar um pró-fármaco para o desenvolvimento de novos agentes (NEWMAN, et al., 2003; BUTLER, 2004; BRANDÃO, et al., 2010)

De acordo com Calixto (2003), aproximadamente 70% dos fármacos antitumorais existentes no mercado são derivados de plantas. Como exemplo pode-se citar: alcalóides da vinca, como vincristina e vimblastina, isolados de *Catharantus roseus* (Apocynaceae); derivados de lignanos como etoposídeos e tenoposídeos; derivados semi-sintéticos

da podofilotoxina, isoladas de espécies do gênero *Podophyllum* (Berberidaceae), bem como taxanos isolados de espécies do gênero *Taxus* (Taxaceae), derivados semi-sintéticos da camptotecina, irinotecano e topotecano, isoladas de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), dentre outros (DE MESQUITA et al., 2009; NOBILI et al., 2009).

Metodologias recentes, cada vez mais modernas de isolamento e identificação de compostos de fontes naturais têm propiciado aumento no número de novas estruturas químicas bioativas para inúmeras indicações terapêuticas (UNNATI et al., 2013). De acordo com Newman (2003), medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas categorizadas, incluindo as indicadas como antibacterianas, anticoagulantes, antiparasitárias, imunossupressoras e anticancerígenas. Esta última classe de medicamentos teve 1/3 do mercado em 2002, representado apenas por dois grupos de quimioterápicos derivados de produtos naturais, sendo que os taxanos e derivados da camptotecina representam cerca de U\$ 3 bilhões de dólares.

É importante ressaltar que no Brasil, dos quase seis mil produtos farmacêuticos disponíveis entre fármacos e fitofármacos, poucos foram desenvolvidos por indústrias nacionais. No entanto, investem-se bilhões de dólares na importação da matéria-prima utilizada na produção de fármacos (BLOCK, et al., 1998).

3.2 MATRIZ VEGETAL: *Schinus terebinthifolius raddi*

Schinus terebinthifolius raddi, comumente conhecida como pimenta rosa pertence à família Anacardiaceae. É uma árvore de porte médio, dióica, de folhas compostas e aromáticas. Possuem diferenças nas estruturas reprodutivas sendo maiores e mais floridas as inflorescências masculinas. Por apresentar flores melíferas, é uma espécie muito procurada pela avifauna e sua semente é amplamente disseminada por pássaros. Distribui-se geograficamente desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, em várias formações vegetais, sendo mais comum em beiras de rios (LORENZI, 1998; LENZI, 2004)

Na medicina popular, *S. terebinthifolius* é usada para o tratamento de úlceras, problemas respiratórios, cicatrização de feridas, reumatismo, artrite e como antisséptico e antiinflamatório. No Brasil, principalmente no Nordeste, o decocto das cascas do caule da aroeira

tem sido muito utilizado no tratamento de afecções do aparelho ginecológico (MOREIRA, et al. 2002; MATOS 1997).

Estudos realizados “*In vivo*” e “*In vitro*” relatam atividades biológicas dos extratos de *S. terebinthifolius*, como atividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana (VELAZQUEZ, et al. 2003; SCHMOURLO, et al. 2005; DE LIMA, et al. 2006). Assim como também propriedades anticancerígenas (BENDAOU et al., 2010).

Atualmente a indústria farmacêutica vem pesquisando e desenvolvendo medicamentos a partir de substâncias extraídas desta espécie. Um caso recente é do laboratório farmacêutico Hebron® que lançou no mercado nacional um anti-inflamatório e cicatrizante natural para uso ginecológico, que tem como princípio ativo o tanino, substância extraída da casca *S. terebinthifolius*, assim como também comprimidos indicados no tratamento sintomático para gastrite leve a moderada (Figura 1).



Figura 1: Kronel®, sabonete líquido para higiene íntima. KIOS® indicado no tratamento sintomático da gastrite leve a moderada.

3.2.1 Composição química do extrato de *S. terebinthifolius*.

A composição dos extratos naturais é determinada por fatores genéticos, porém os fatores ambientais podem causar variações significativas em seus componentes. Os monoterpenos e os sesquiterpenos apresentam-se como os compostos mais abundantes. A época de colheita, o horário e o modo de secagem do material vegetal também podem ter influência sobre a composição e o teor do óleo (SILVA, 2003)

A análise fitoquímica de *S. terebinthifolius* revelou que a mesma contém taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esteroidais,

terpeno e uma quantidade grande de óleo essencial (CARVALHO, et al. 2003).

Ceruks et al. (2007), realizaram um estudo dos compostos fenólicos polares das folhas de *S. terebinthifolius*. Os resultados obtidos mostraram a presença de galato de etila, miricetrina, quercitina, galato de metila e miricetina.


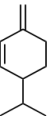
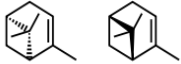
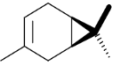
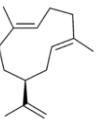
No óleo essencial presentes nos frutos maduros de *S. terebinthifolius* destacam-se os seguintes compostos: α -pineno 18,82%; β -pineno 5,02%; α -felandreno 23,55%; α -3-careno 29,22%; β -felandreno 18,08% e germacreno-D 11,89%, a maioria monoterpênicos (CLEMENTE, 2006).

Em outro estudo realizado por Bendoud et al. (2010), a composição química do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* revelou os seguintes compostos majoritários: α -felandreno 34,34%; β -felandreno 10,61%; α -terpineol 5,60%; α -pineno 6,49%; β -pineno 3,09%; e p-cimeno 7,34%.

Estudos realizados por Barbosa et al., (2007) evidenciaram grandes diferenças na composição dos extratos hidrodestilados dos frutos maduros e imaturos de *S. terebinthifolius*, sendo que o extrato dos frutos maduros apresentou um menor teor de α -felandreno (13,04%) e p-cimeno (0,2%) e maior teor em β -felandreno (18,08%) e α -pineno (12,94%).

A Tabela 1, localizada na página a seguir, apresenta a descrição química dos compostos majoritários relatados nos trabalhos anteriormente citados, segundo The National Institute of Standards and Technology (NIST, s.d.)

Tabela 1: Descrição química dos compostos majoritários obtidos do óleo essencial dos frutos de *S. terebenthifolious*.

Composto	Formula	Número CAS	Peso molecular (g/mol)
α -felandreno	 $C_{10}H_{16}$ monoterpeno	99-83-2	36.24
β -felandreno	 $C_{10}H_{16}$ monoterpeno	555-10-2	36.24
α -pineno	 (+)- α -pinene (-)- α -pinene $C_{10}H_{16}$ monoterpeno	80-56-8	136.234
3-careno	 $C_{10}H_{16}$ monoterpeno	13466-78-9	136.234
germacrene-D	 $C_{15}H_{24}$ sesquiterpeno	37839-63-7	204.35

3.3 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Um componente puro é considerado um fluido supercrítico quando sua temperatura e pressão são maiores que seus valores críticos, T_c e P_c , respectivamente (BRUNNER, 2005). A temperatura crítica é definida como a mais alta temperatura na qual um gás pode ser convertido em líquido, devido a um aumento de pressão. A pressão crítica consiste na mais alta pressão na qual um líquido pode ser convertido em um gás, devido a um aumento de temperatura. Essas propriedades caracterizam o ponto crítico (PC) (Figura 3.5). Acima desse ponto existe a região supercrítica na qual o composto apresenta-se como um fluido de uma única fase, não condensável, exibindo algumas propriedades físico-químicas típicas de gases e outras típicas de líquidos.

Os diferentes estados físicos de uma substância pura podem ser visualizados em um diagrama tridimensional de pressão-volume-temperatura (P-V-T) como se mostra na Figura 2. Observa-se que quando a temperatura e a pressão estão acima do seu valor crítico, o sistema se encontra na região supercrítica. Neste ponto, as propriedades do sistema são altamente sensíveis à pressão e temperatura. Normalmente, o solvente supercrítico é aplicado a uma temperatura próxima do seu valor crítico, sob uma pressão suficientemente alta para tornar sua densidade maior do que a densidade crítica do fluido. Por definição, o estado supercrítico é caracterizado pelo desaparecimento da interface de separação do estado líquido e gasoso. Isto acontece somente acima de certa pressão e temperatura (BRUNNER, 1994).

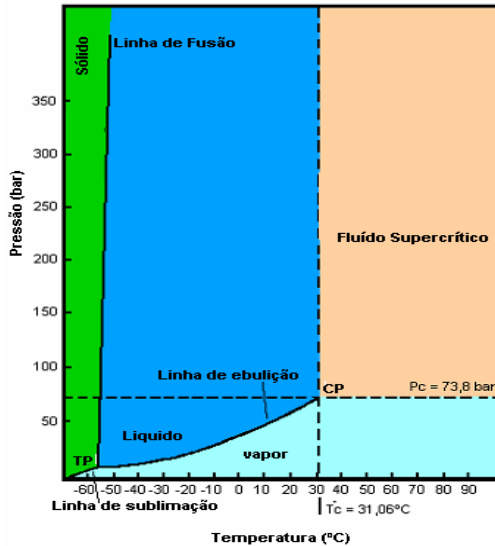


Figura 2: Diagrama de fase do dióxido de carbono. Temperatura - Pressão, SANDERS,(1993).

O poder de solvatação de um fluido supercrítico depende da sua densidade, o que pode ser mudado por pequenas variações na temperatura e pressão, assim, estes fluidos proporcionam uma capacidade única como solvente (BRUNNER, 1994).

Da mesma maneira que a densidade, as propriedades de transporte como difusividade e viscosidade também são dependentes da temperatura e pressão, onde as variações são mais pronunciadas em regiões próximas ao ponto crítico.

A viscosidade de um fluido supercrítico diminui com a temperatura até um valor mínimo, após o qual aumenta com a temperatura. Nas temperaturas acima do mínimo o fluido comporta-se como gás, isto é, a viscosidade aumenta com a temperatura. Estes valores baixos de viscosidade e valores intermediários de difusividade promovem um transporte de massa mais fácil, resultando na diminuição dos custos (CAVALCANTI ; MEIRELES, 2012).

Os altos valores de densidade, combinados com o poder de solvatação dependente da pressão, conferem alta solubilidade e seletividade ao processo. Além disso, a ausência de tensão superficial permite a rápida penetração do solvente na matriz da amostra, aumentando a eficiência da extração. Todos esses fatores combinados

têm promovido o grande interesse na aplicação da tecnologia de fluidos supercríticos nos processos de separação (SALGIN; DÖKER; ÇALIMLI, 2006).

Os fluidos supercríticos têm sido usados como solventes para uma ampla variedade de aplicações tais como: obtenção de extratos naturais, extração de íons metálicos, síntese de polímeros, nucleação de partículas e síntese de nanopartículas (ÖZEL, et al. 2000; REVERCHON e DE MARCO 2006; HONG et al., 2013).

O processo de extração supercrítica tem sido visto como uma alternativa ao processo de extração de compostos naturais devido às vantagens que possui em relação às técnicas tradicionais, dado que é um processo flexível com a possibilidade de uma modulação contínua do poder de seletividade do solvente. Também se pode citar a vantagem da não utilização de solventes orgânicos, que além de elevar o custo, podem contaminar os extratos. Além disso, trabalhos recentes relatam uma maior atividade biológica dos extratos quando comparados aos extratos obtidos pelas técnicas tradicionais de extração (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2008; HERZI et al. , 2013; MOUAHID et al., 2013; SAJFRTOVA et al., 2013).

Esta forma de operação apresenta uma vantagem especial para a obtenção de extratos naturais, visto que não ocorre uma degradação dos componentes termo sensíveis, o que conduz a um produto final com alta pureza. Aliado a isto, a competitividade da área de compostos com atividade terapêutica, que tem como fatores fundamentais a conquista de mercados, a qualidade, a disponibilidade e o preço, sinaliza para o emprego de técnicas modernas de extração, como a extração supercrítica, que se destaca por representar uma tecnologia que minimiza danos ao meio ambiente e que vem se desenvolvendo continuamente nas últimas décadas (DANIELSKI, et al., 2007; MACHMUDAH, et al., 2006)

Na prática, mais de 90% das extrações com fluidos supercríticos são levadas a cabo utilizando dióxido de carbono como solvente, principalmente na indústria farmacêutica e de alimentos. Esse fato ocorre devido o CO₂ possuir valores críticos relativamente baixos como a temperatura de 32°C e uma pressão de 72 bar, além de ser inodoro, atóxico, não inflamável e pode ser removido facilmente do produto final sem deixar resíduo e achado em estado puro a relativo baixo custo. (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

A facilidade de extração de compostos com CO₂ supercrítico depende da presença de grupos funcionais individuais nesses compostos, do seu peso molecular e de sua polaridade. Hidrocarbonetos e outros

compostos orgânicos com polaridade relativamente baixa, como por exemplo, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas e lactonas são extraídos com CO₂ supercrítico a baixas pressões, em torno de 75 e 100 bar, onde substâncias moderadamente polares, como derivados de benzeno com um grupo carboxílico e dois grupos hidroxilas, são moderadamente solúveis. Compostos altamente polares, com um grupo carboxílico e três ou mais grupos hidroxilas são pouco solúveis. Para a extração de certa classe de compostos, o uso de cossolvente junto ao CO₂ supercrítico é necessário para aumentar a polaridade e poder de solvatação do solvente. Etanol, acetato de etila e água são os cossolventes mais utilizados para obter produtos para a indústria de alimentos (MUKHOPADHYAY, 2000; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

3.4 PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO

A extração com fluido supercrítico de matrizes sólidas ou semi-sólidas divide-se em duas etapas: extração e separação. Na extração, o fluido supercrítico escoia através de um leito fixo de partículas sólidas dissolvendo os componentes extraíveis. O solvente é alimentado no extrator e uniformemente distribuído no interior do leito fixo. A mistura de solvente e componente extraídos deixa o extrator e passa para o separador (BRUNNER, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000).

No separador, a pressão da solução é reduzida, acarretando na vaporização do solvente, o qual poderá ser recirculado, e na precipitação do soluto, o qual será coletado e analisado (SOVOVÁ, 2005).

3.4.1 Curvas de extração

Segundo Brunner (1994), os processos de extração com fluido supercrítico podem ser representados por uma curva típica de extração.

As curvas de extração expressam a taxa de extração (dw/dt), isto é, a massa de extrato acumulada ($w(t)$) em função do tempo (t) ou massa de solvente utilizada. A taxa de extração não é uma função linear do tempo e, por esta razão, diversos comportamentos podem ser observados para as curvas globais de extração (CAVALCANTI; MEIRELES, 2012).

Na Figura 3, está representada a curva típica de extração caracterizada por três etapas:

- I. Na primeira etapa da curva conhecida com período de taxa de extração constante (CER), o soluto está presente em grandes quantidades na superfície das partículas da matriz. A inclinação da curva é dada pela solubilidade do soluto no solvente.

Nesta fase predomina o processo de transferência de massa controlado por convecção, ou seja, o processo é controlado pelo fluxo do solvente.

- II. Na segunda etapa da curva (FER), a camada de soluto facilmente acessível sobre a superfície das partículas está a ser esgotado, nem todas as partículas estão revestidas pelo soluto e, por tanto, a taxa de transferência de massa diminui rapidamente. Nesta etapa ocorre uma resistência a transferência de massa e os processos de difusão e convecção tornam-se importantes para a extração.
- III. Na fase final, chamada de difusão controlada (DC), é caracterizada pela ausência de soluto facilmente acessível à superfície da partícula; aqui, a taxa de extração é controlada principalmente pela difusão do solvente para o interior das partículas sólidas, seguido pela dispersão de a mistura do soluto e do solvente na superfície das partículas.

A resposta da curva depende dos parâmetros do processo e todos os fenômenos acontecidos dentro do leito fixo (BRUNNER,1994).



Figura 3: Curva típica de extração com fluido em estado supercrítico.

Fonte: Brunner, 1994

3.4.2 Solubilidade e taxa de transferência de massa em extração supercrítica de óleos essenciais

Existem muitas variáveis a ser consideradas em um processo de extração com fluido supercrítico. Uma delas é a solubilidade do soluto a ser extraído.

A solubilidade é definida como a concentração, a fração de massa, ou a fração molar de uma determinada substância que pode ser dissolvida no fluido supercrítico. Além de temperatura e pressão, as propriedades do soluto, a massa molecular, polaridade, e da pressão do vapor, afetam a solubilidade. O conhecimento sobre o comportamento da solubilidade de solutos em um fluido supercrítico requer uma compreensão das interações intermoleculares do soluto-solvente e soluto-soluto (POURMORTAZAVI, et al., 2008; CAVALCANTI e MEIRELES, 2012).

O desenvolvimento de processos de extração com fluido supercrítico depende marcadamente do poder solvente do fluido, da volatilidade do soluto e da variação destas propriedades com as condições de operação. Porém, as condições operacionais têm que ser escolhidas de modo a se obter a extração seletiva de compostos de interesse, reduzindo, a um mínimo, a co-extração de compostos indesejáveis (REVERCHON, 1997).

O poder solvente dos fluidos supercríticos pode ser relacionado diretamente com a sua densidade, que aumenta à medida que a pressão se incrementa e a temperatura diminui (DEL VALLE, et al., 1999).

Gaspar, et al., (1999) testaram a solubilidade de duas boragináceas e uma lunaria em CO₂ supercrítico. Variaram pressão e temperatura de 60 bar a 300 bar e 10°C a 50°C. Observaram que a solubilidade aumenta com o incremento da pressão, como resultado direto de um aumento na densidade do solvente. A temperatura apresentou comportamento similar. Mas, à baixas pressões (60 a 100 bar) um aumento de temperatura resultava na diminuição da solubilidade.

Berna, et al., (2000) testaram a solubilidade do limoneno e linalool puros à temperaturas de 45°C e 55°C com pressões de 69 a 111 bar. Mostraram que ao aumentar a pressão aumenta a solubilidade, porém, ao aumentar a temperatura nas mesmas condições o aumento da solubilidade não foi significativo.

Estes estudos revelam que as condições de solubilidade dependem da interação do solvente com o soluto.

3.4.3 Efeito da matriz vegetal

Diferentes fatores tais como o tamanho da partícula, forma, superfície, porosidade, umidade, nível de solutos extraíveis e a natureza da matriz vegetal afetam o resultado em uma extração com fluido supercrítico. A matriz pode exigir condições de extração específica (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

A estrutura física da matriz é um ponto importante e a eficiência da extração está relacionada com a habilidade do fluido supercrítico em difundir-se dentro desta. Por essa razão as condições de extração de um mesmo composto podem diferir de uma matriz a outra (SALGIN, 2007).

Como regra geral, tem-se que: diminuindo o tamanho da partícula da matriz se dá uma maior área de contato, tornando assim mais eficiente a extração. No entanto, moagem excessiva pode prejudicar o processo devido à reabsorção dos compostos de interesse dentro da superfície da matriz, e pode acontecer uma queda de pressão dentro do extrator, devido à formação de caminhos preferenciais no interior do leito e parte do solvente flui pelos canais formados sem ter contato como o solvente. Geralmente, partículas com diâmetros médios aproximadamente entre 0,25 e 2,0 mm são utilizadas. A dimensão ótima deve ser escolhida caso a caso considerando o conteúdo de água na matriz vegetal e a quantidade de compostos líquidos extraíveis que podem produzir fenômenos de coalescência entre as partículas, favorecendo assim a extração irregular ao longo do extrator. Adicionalmente, a produção de partículas muito pequenas pela moagem poderia favorecer a perda de compostos voláteis (REVERCHON & DE MARCO, 2006; SALGIN, 2007; SALGIN; SALGIN, 2013).

3.4.4 Efeito de parâmetros operacionais da extração supercrítica

A seleção das condições de operação depende de compostos ou famílias de compostos específicos a serem extraídos. Peso molecular e polaridade devem ser levados em consideração, com algumas regras gerais a serem seguidas (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Por esse motivo, devem ser tidos em conta os efeitos dos outros parâmetros observados no processo de extração com fluido supercrítico.

3.4.4.1 Efeito da densidade

Conforme descrito no item 3.5.1, um aumento na solubilidade implica em uma maior eficiência da extração. Como regra, tem-se que: um aumento da densidade do fluido supercrítico implica em um aumento na solubilidade do soluto (MUKHOPADHYAY, 2000).

A solubilidade do soluto no fluido supercrítico é função da densidade do solvente e da pressão de vapor do soluto, além da natureza química dos compostos. Nas vizinhanças do ponto crítico, grandes mudanças de densidade podem ser produzidas por pequenas mudanças na pressão e temperatura de operação. Esta propriedade é mais sensível a temperaturas próximas à do ponto crítico do que em pressões elevadas (BRUNNER, 1994).

Em uma isoterma, o aumento da pressão aumenta a densidade do solvente, diminuindo a distância intermolecular, aumentando assim a interação entre as moléculas de soluto e solvente. Já em uma isóbara, o aumento da temperatura acarreta uma diminuição da densidade do solvente e um aumento da pressão de vapor do soluto. Os efeitos antagônicos destes parâmetros ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, fenômeno conhecido como retrogradação ou condensação retrógrada, resultado da competição entre esses efeitos (densidade do solvente e pressão de vapor do soluto) e da predominância de um dos dois. Assim, abaixo da pressão de inversão das isotermas o efeito da densidade do solvente é dominante, logo a solubilidade diminui com o aumento da temperatura. Acima da pressão de inversão, o efeito da pressão de vapor do soluto é dominante e a solubilidade aumenta com a temperatura (MICHIELIN, et al., 2005; GÜÇLÜ- ÜSTÜNDAG & TEMELLI, 2005).

3.4.4.2 Efeito da Pressão

A pressão representa outro fator importante no processo de extração supercrítica tanto quanto a temperatura, dado que pode ser utilizada para ajustar a seletividade do fluido supercrítico. Um aumento na pressão resulta em um aumento na densidade do fluido supercrítico. Tem-se como regra: quanto mais elevada é a pressão, maior é o poder do solvente e menor a seletividade da extração (BRUNNER, 1994).

A densidade no caso do CO₂-SC pode variar aproximadamente entre 0,15 a 1,00 g/cm³ e está relacionada diretamente com a temperatura e a pressão (BRUNNER, 1994; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

3.4.4.3 Efeito da Temperatura

A influência da temperatura sobre a solubilidade de uma substância em um solvente supercrítico é mais difícil de prever do que a da pressão.

O aumento da temperatura acarreta dois efeitos contrários em relação a solubilidade. Em um primeiro momento, o aumento da temperatura reduz a densidade do CO₂-SC a uma pressão constante, reduzindo assim o poder solvente do fluido. Em um segundo momento o aumento da temperatura aumenta a pressão de vapor dos compostos a serem extraídos, aumentando a solubilidade.

Quando se tem padrões de pressão elevados, o efeito que predomina é o aumento da solubilidade, e em pressões pouco acima do ponto crítico predomina a redução da solubilidade (BRUNNER, 1994; REVERCHON e DE MARCO, 2006; ARAUS, et al., 2009).

3.4.4.4 Efeito dos modificadores (cossolventes)

O uso de cossolvente ou modificador foi proposto como um método para melhorar a solubilidade da extração permitindo operações com pressões não tão elevadas. Estes atuam aumentando o rendimento e alterando a solubilidade do processo, por meio de mudanças das características de polaridade do solvente, promovendo interações específicas com o soluto, como são, por exemplo, as pontes de hidrogênio. Este tipo de interação resulta em um aumento da seletividade do processo (TEBERIKLER, et al., 2001; DAUKSAS, et al., 2002; TONTHUBTHIMTHONG, et al., 2004).

3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA

A habilidade de prever as curvas cinéticas de extração é de fundamental importância tanto no projeto como na otimização de uma planta industrial. Dessa maneira, modelagem matemática é provavelmente a principal ferramenta de predição que tem por objetivo a estimativa dos parâmetros envolvidos no processo (QUISPE-CONDORI, 2005). A análise de uma curva de extração para um determinado processo pode ajudar a definir o volume do extrator, a vazão requerida de solvente para a taxa de extração desejada, o tempo de extração, a razão solvente por massa de alimentação, entre outros parâmetros de processo. Para tanto, os modelos matemáticos devem ajustar parâmetros cujo valor possa ser predito como função das condições operacionais, de

forma que seja possível, a partir de curvas modeladas, projetar um processo de extração supercrítica em escala industrial (BRAGA, 2005). Os modelos matemáticos permitem generalizar os resultados experimentais, descrevendo os principais fenômenos de interesse por meio de uma equação ou um sistema de equações, que posteriormente poderão ser aplicados a condições de trabalho, diferentes daquelas inicialmente pesquisadas, possibilitando assim obter informações necessárias para dimensionamento de uma unidade de extração supercrítica (MOURA, 2004).

Existe na literatura um grande número de modelos propostos para extração supercrítica de produtos naturais. Podem-se citar os modelos empíricos, baseados na analogia da transferência de calor na partícula como o de Cranck (1975) e Gaspar et. al (2003). Assim como também, modelos baseados na equação diferencial de transferência de massa no leito como o de Sovová (1994) e Martinez et. Al (2003).

Neste trabalho foi ajustado o modelo de Sovová por ser o mais difundido nos trabalhos de pesquisa observados.

3.5.1 Modelo de Sovová

Sovová (1994) propôs um modelo baseado em diversos balanços de massa no leito extrator, em que considera o material extraível contido numa estrutura esférica, com células rompidas numa camada externa e células intactas no nucléolo, além de assumir o estado de equilíbrio estabelecido entre o solvente e o soluto dentro das células rompidas no extrator durante a pressurização, isto é, antes de o solvente começar a fluir a partir do extrator. A teoria que fundamenta este modelo engloba a transferência de massa tanto para a fase sólida quanto para a fase fluida.

As principais considerações feitas pelo modelo são:

- a) Matriz sólida composta por material moído;
- b) Leito de extração cilíndrico com fluxo axial de solvente;
- c) Solvente livre de soluto na entrada do extrator;
- d) A pressão e temperatura são constantes durante todo o processo
- e) Tamanho de partículas e distribuição de soluto homogêneo no leito de extração no início do processo.

Segundo Sovová (1994), a moagem da matriz resulta em uma situação na qual parte do soluto, que inicialmente se encontrava no interior das

células apresentando difícil acessibilidade ao solvente, passa a ser facilmente acessível, uma vez que parte das células é quebrada durante o processo de moagem. Dessa forma, a massa de soluto contida inicialmente na fase sólida (O) é composta pela massa de soluto facilmente acessível (P) e pela massa de soluto inacessível dentro da fase sólida das partículas (K).

A concentração inicial de soluto na célula é dada por:

$$O = P + K \quad (1)$$

A concentração inicial de soluto na célula é dada por:

$$x(t=0) = x_o = O/N = x_p + x_k = P/N + K/N \quad (2)$$

Onde:

X= Teor ou razão de soluto na fase sólida (-);

O= Massa total de soluto (M);

N= Massa de material insolúvel (M);

P= Massa de soluto de fácil acesso (M);

K= Massa de soluto de difícil acesso (M).

Neste modelo foram desprezados nas equações diferenciais do balanço de massa os termos referentes à dispersão axial e ao acúmulo na fase fluída e à difusão na fase sólida, por considerar que estes fenômenos não influenciam significativamente no processo, quando comparados à convecção na fase fluída.

As equações a seguir apresentam o balanço de massa nas fases fluída e sólida, segundo o modelo de Sovová (1994):

Fase Fluída:

$$u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X, Y)}{\varepsilon \rho} \quad (3)$$

Fase sólida:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = - \frac{J(X, Y)}{(1 - \varepsilon)\rho_s} \quad (4)$$

Onde:

$$J(X, Y) = k_{Y_2}(Y^* - Y) \quad \text{para } X > X_K \quad (5)$$

$$J(X, Y) = k_{X_2} \left(1 - \frac{Y}{Y^*}\right) \quad \text{para } X \leq X_K \quad (6)$$

Onde k_{YA} e k_{XA} são os coeficientes de transferência de massa nas fases fluida e sólida, respectivamente, e Y^* é a solubilidade do soluto no solvente. As condições de contorno para as equações de balanço de massa são:

$$X(h, t = 0) = X_0 \quad (7)$$

$$Y(h, t = 0) = 0 \quad (8)$$

A solução analítica desse modelo é iniciada a partir da inserção das variáveis adimensionais:

$$r = \frac{X}{X_k} \quad (9)$$

$$y = 1 - Y/Y^* \quad (10)$$

$$z = \frac{k_{YA}}{u} h \quad (11)$$

$$\tau = \frac{\varepsilon k_{YA} \rho Y^* t}{(1 - \varepsilon)\rho_s X_k} \quad (12)$$

Onde:

X_k : concentração de soluto na fase sólida a partir da qual a transferência de massa é retardada pela difusão na fase sólida.

Y^* : solubilidade do soluto no solvente;

k_{YA} : coeficiente de transferência de massa na fase fluida.

Introduzindo as variáveis adimensionais obtém-se:

$$\frac{\partial r}{\partial t} = \frac{\partial y}{\partial z} = -J^*(r, y) \quad (13)$$

Onde:

$$J^*(r, y) = \frac{J(X, Y)}{k_{YA} Y^*} \quad (14)$$

As condições de contorno passam a ser:

$$r(z, t = 0) = r_0 \quad (15)$$

$$y(z = 0, \tau) = 1 \quad (16)$$

Definindo uma função $f(r)$ tal que:

$$J^*(r, y) = f(r)y \quad (17)$$

Onde:

$$f(r > 1) = 1 \quad \text{e} \quad f(r \leq 1) \leq 1 \quad (18)$$

Para determinar o perfil de concentração na fase sólida, Sovová (1994) integrou considerando J^* independente da concentração de soluto na fase fluida.

$$\frac{1}{f(r)} \frac{\partial r}{\partial z} = +r = r_0 \quad (19)$$

Com a condição de contorno:

$$\frac{\partial r(z=0, \tau)}{\partial \tau} = -f(r) \quad (20)$$

No período de taxa de extração constante, no qual o soluto é de fácil acesso ao solvente (fase CER), ou seja, $X=X_k$, tem-se que $r=1$, logo:

$$\frac{\partial r}{\partial z} + r = r_0 \quad (21)$$

Com a condição de contorno:

$$\frac{\partial r(z=0, \tau)}{\partial \tau} = -1 \quad (22)$$

Para o mesmo período, mas para a condição ($x \leq X_k$, $r \leq 1$) r é definida a constante k , de forma que:

$$f(r \leq 1) = kr \quad (23)$$

A função da constante K é introduzir no modelo o coeficiente de transferência de massa na fase sólida:

$$k = \frac{k_{XA} \rho_s X_k}{k_{YA} \rho Y^*} \quad (24)$$

Sovová (1994) obteve o perfil de concentração de soluto na fase sólida, expressos pelas seguintes equações 24, 25 e 26:

$$r = r_0 - \tau \exp(-z), \text{ para } \tau < \tau_m, \quad (25)$$

$$r = r_0 - \tau \exp[(z - z_w)], \text{ para } \tau_m \leq \tau < \tau_n, z > z_w \quad (26)$$

$$r = \frac{r_0}{1 + \{r_0 \exp[k(\tau - \tau_m)] - 1\} \exp(-r_0 k z)}$$

para, $\tau_m \leq \tau < \tau_n$, $z \leq z_w$, e para $\tau \geq \tau_n$ (27)

Onde:

$$\tau_m = r_0 - 1 \quad (28)$$

$$\tau_n = \tau_m + \frac{1}{k} \ln \left[\frac{1 + \tau_m \exp(r_0 kZ)}{1 + \tau_m} \right] \quad (29)$$

$$Z = \frac{k_{YA} h}{\vec{u}} \quad (30)$$

$$z_w = \frac{1}{kr_0} \ln \left\{ \frac{r_0 \exp[k(\tau - \tau_m)] - 1}{r_0 - 1} \right\} \quad (31)$$

Integrando-se em relação à y , obtém-se o perfil de concentração de soluto na fase solvente:

$$y = \exp(-z), \text{ para } \tau < \tau_m \quad (32)$$

$$y = \frac{\tau_m \exp(z_w - z)}{r_0 - \exp[k(\tau_m - \tau)]}, \text{ para } \tau_m \leq \tau < \tau_n, z > z_w \quad (33)$$

$$y = \frac{r_0 \exp[k(\tau - \tau_m)] - 1}{[\exp(r_0 kZ) + r_0 \exp[k(\tau_m - \tau)] - 1]}, \text{ para } \tau_m \leq \tau < \tau_n \text{ e} \\ \text{para } \tau \geq \tau_n \quad (34)$$

Para análise de dados experimentais, as equações do modelo devem ser funções de grandezas facilmente mensuráveis, como o tempo ou massa de extrato. As equações que definem a curva de extração pelo modelo de Sovová (1994) são as que seguem:

$$m(h = H, t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - \exp(-z)], \text{ para } t \leq t_{cer} \quad (35)$$

$$m(\mathbf{h} = H, t) = Q_{CO_2} Y^* [t - t_{CER} \cdot \exp(z_w - z)], \text{ para } t_{CER} < t \leq t_{FER} \quad (36)$$

$$m(\mathbf{h} = H, t) = N \left\{ X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln 1 + \exp \left[\left(\frac{WX_0}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[\frac{WQ_{CO_2}}{N} (t_{CER} - 1) \right] \left(\frac{X_p}{X_0} \right) \right\} \quad (37)$$

Para $t > t_{FER}$

Onde:

$$Z = \frac{Nk_{YAP}}{Q_{CO_2} (1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (38)$$

$$W = \frac{Nk_{YA}}{Q_{CO_2} (1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (39)$$

$$Z_w = \frac{ZY^*}{WX_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \exp \left[\frac{WQ_{CO_2}}{N} (t - t_{CER}) \right] - X_k}{(X_0 - X_k)} \right\} \quad (40)$$

$$t_{CER} = \frac{NX_p}{Y^* Z Q_{CO_2}} \quad (41)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2} W} \ln \left[\frac{X_k + X_p \exp \left(\frac{WX_0}{Y^*} \right)}{X_0} \right] \quad (42)$$

3.6 FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS NATURAIS UTILIZANDO FLUIDO SUPERCRÍTICO

A utilização de fluido supercrítico para fracionamento e purificação de misturas de complexas tem sido cada vez mais estudada e aplicada durante as últimas décadas. O fracionamento com fluido supercrítico é uma tecnologia interessante para a remoção seletiva de monoterpenos e a purificação ou enriquecimento de terpenos oxigenados mais bioativos, resultando em produtos mais solúveis, estáveis em água. Esta técnica proporciona as vantagens anteriormente descritas dos fluidos supercríticos (item 3.4), sobre os métodos de fracionamento tradicionais como, por exemplo: a destilação a vácuo ou extração líquido-líquido (FORNARI et al., 2012; GAÑÁN; BRIGNOLE, 2013).

Uma das aplicações mais estudadas é o fracionamento de óleos essenciais, em particular óleos cítricos. Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis que ocorrem em muitas espécies vegetais, produto do metabolismo secundário destas e são responsáveis pelo seu odor característico. São compostos principalmente de hidrocarbonetos monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e os compostos de maior peso molecular (di e triterpenos, ceras, pigmentos, etc.) (BAKKALI et al., 2008). Neste caso, o objetivo do fracionamento de fluido supercrítico é a remoção dos monoterpenos ("desterpenação") a fim de concentrar a fração oxigenada (aromático), aumentando assim a qualidade do óleo, a estabilidade e a solubilidade em água (KONDO et al.; 2000; DIAZ, ESPINOSA e BRIGNOLE, 2005).

Gerard, (1984), Temelli, et al., (1988) e Temelli, et al., (1990) estudaram em trabalhos iniciais desterpenação de óleo de cítricos com CO₂ supercrítico, discutiram sobre as melhores condições de funcionamento com base no comportamento da solubilidade experimentais e previstos de terpenos. Desde então, vários autores têm investigado diferentes formas de melhorar a seletividade, devido ao baixo teor de compostos oxigenados em óleos cítricos. Uma linha de investigação é a adsorção do óleo (ou misturas modelo) por um adsorvente, tal como sílica-gel, polar, e a dessorção seletiva dos monoterpenos com um fluxo contínuo de CO₂ (BARTH, et al.; CHOUCHE, et al., 1995; REVERCHON, 1997).

No que se refere ao fracionamento de extrato supercrítico de sementes e frutos, vários autores relataram a extração em dois estágios, uma primeira extração supercrítica preliminar a pressões e temperaturas próximas do ponto crítico. Neste primeiro estágio se obtinha extratos

com baixo peso molecular. No segundo estágio acontecia um incremento das condições operacionais, aumentando-as drasticamente, obtendo-se extratos com compostos de alto peso molecular (MARONGIU, et al., 2004; DAUKSAS, et al., 2002; DAUKSAS, et al., 2002; MOLERO, et al., 2002).

Por outro lado, existem relativamente poucos trabalhos relatados na literatura sobre o fracionamento de óleos essenciais à base de plantas. No caso destes óleos, o fracionamento é geralmente associado com uma extração convencional (hidrodestilação, arraste a vapor, etc.) previa do material vegetal. O produto destas extrações é fracionado em separadores que operam em condições supercríticas a diferentes condições de pressão e temperatura. Exemplos de fracionamento supercrítico de alimentações de líquido, previamente obtidos por hidrodestilação ou outros processos convencionais, podem ser encontrados nos trabalhos de Köse, et al., (2000), relativo ao fracionamento supercrítico de monoterpenos e não-monoterpenos em óleo *Origanum* assim como os estudos realizados por Varona et al., (2008), em relação à separação de acetato de linalilo e linalol em óleo de lavanda.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os insumos, equipamentos e procedimentos utilizados na obtenção, fracionamento e na caracterização dos extratos de *S. terebinthifolius* R.. Assim como a metodologia utilizada para determinação de atividade anticancerígena dos extratos fracionados.

A figura 4 na página seguinte apresenta os passos realizados neste estudo.

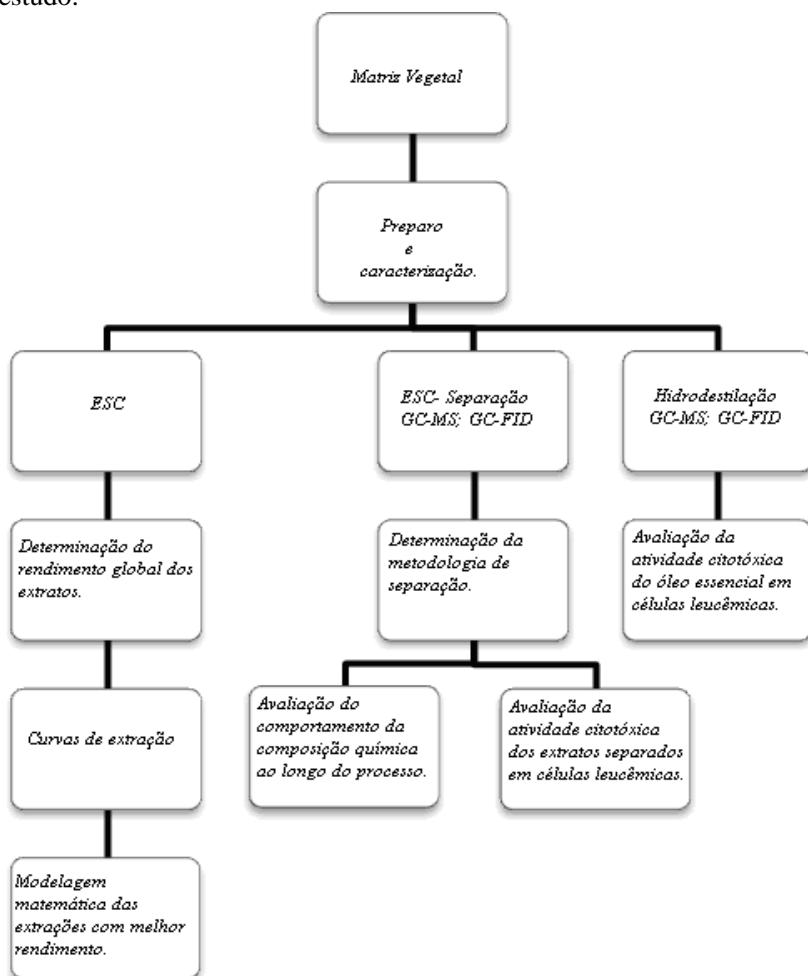


Figura 4: Diagrama de fluxo das atividades realizadas no presente trabalho

4.1 MATERIA PRIMA

As sementes de *S. terebinthifolius*, utilizadas neste trabalho foram adquiridas da empresa Brasfoods Exportação e Importação Ltda. Todos os testes foram realizados com sementes provenientes do mesmo lote.

As sementes utilizadas são selecionadas pela empresa com padrão exportação, sendo selecionadas pela cor do tegumento externo, um rosa intenso. Bem como não apresentam grãos murchos e adquiridas logo após a colheita.

Imediatamente após sua aquisição o material vegetal foi triturado e a casca foi retirada mediante esforço mecânico em um peneirador (Mesh Tyler 8 [2,362 mm]) (Figura 5). Logo após este processo foi novamente particulado e peneirado (Mesh Tyler 14 [1,168]), separado, embalado hermeticamente a vácuo em saco de 500 g, e mantido sob refrigeração (Brastemp, Modelo Frostfree, Brasil) sob temperaturas abaixo de (4°C).

A Figura 5 apresenta uma fotografia do processo do pré-tratamento das sementes de *S. terebinthifolius*. A placa de Petri (A) contém as sementes como foram adquiridas. A placa de Petri (B) contém a casca das sementes e, para finalizar, a (C) mostra as sementes após o processo de retirada da casca, antes de serem particuladas e armazenadas novamente.

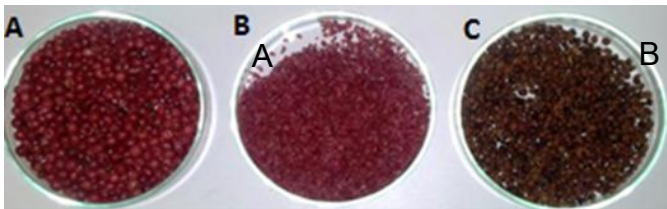


Figura 5: Fotografia do processo de pré-tratamento da matriz vegetal *S. terebinthifolius*. A- semente; B- Casca da semente; C- Semente particulada e sem casca.

4.1.1 Caracterização do leito de partículas

A caracterização do leito de partículas, representada pela determinação de suas características físicas e morfológicas, é necessária para a avaliação das propriedades de transporte, como a porosidade do leito e a massa específica dos sólidos.

4.1.2 Determinação do teor de umidade

Utilizou-se a metodologia da AOAC (2005) cujo método fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis a 105°C. Foram pesadas aproximadamente 5 g de amostra em cápsula de alumínio devidamente padronizada, previamente aquecida em estufa a 105°C por 1 h, resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. Posteriormente foi aquecida em estufa a 105°C por 3 h, resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento em intervalos de meia hora, até peso constante. Estas determinações foram feitas em triplicata.

Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, a seguinte equação foi empregada:

$$100 \times \frac{N}{P} = \% \text{ Umidade a } 105^{\circ}\text{C } P/p \quad (43)$$

Onde:

N é a perda de massa em g e P é o número de gramas de amostra.

4.1.3 Distribuição granulométrica

A matéria-prima foi particulada em moedor de café e foi classificada em agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras, SP) para determinação da distribuição do tamanho de partículas. Foram utilizadas peneiras com mesh 8, 10, 12, 14, 16, 20 e fundo. As massas retidas sobre as peneiras foram pesadas para posterior cálculo do diâmetro médio de partícula. A maior parte da matéria-prima ficou retida entre as granulometrias de 12 e 16 mesh, assim utilizaram-se estas frações para a realização dos experimentos e as frações retidas nas peneiras de mesh 8, 10, e 20 e fundo foram desprezadas.

4.1.4 Determinação do tamanho médio das partículas

Para a determinação da geometria e do tamanho médio da partícula, as sementes de *S. terebinthifolius*. particuladas, sem casca e peneiradas foram microfotografadas em um microscópio de varredura convencional com filamento de tungstênio(modelo JEOL JSM-6390LV)no Laboratório Central de microscopia Eletrônica, LCME/UFSC e a determinação do tamanho médio foi realizada

utilizando-se o *software ImageJ*, onde o comprimento foi determinado pela média das medidas feitas nas partículas encontradas nas microfotografias obtidas.

4.1.5 Densidade do solvente

Para determinar a densidade do dióxido de carbono supercrítico (CO₂) nas condições operacionais e ambientais de extração foi acessada a base de dados Thermophysical Properties of Fluid Systems do National Institute of standards and Technology (NIST). Estes valores são utilizados na avaliação da influência da temperatura e da pressão na variação da densidade do solvente.

4.1.6 Determinação da densidade real das partículas (ρ_r), densidade aparente (ρ_a) e da porosidade do leito (ϵ).

A **densidade real** (ρ_r) ou absoluta da matriz vegetal seca foi determinada no Laboratório de Materiais (LabMat), do Departamento de Engenharia Mecânica da UDESC, pelo método de picnometria de gás hélio.

Nessa técnica, o gás hélio penetra nos menores poros do material sólido e nos espaços vazios entre as partículas, garantindo maior precisão. O picnômetro a gás determina o volume verdadeiro de um sólido, mesmo que poroso, por variação da pressão de gás numa câmara de volume conhecido. Para a medida utilizou-se o multipicnômetro, marca Quantachrome.

A **densidade aparente** (ρ_a) do leito de partículas foi calculada por meio da medida da massa de *S. terebinthifolius* suficiente para ocupar um recipiente de volume conhecido, no caso, o extrator utilizado nos experimentos em meio supercrítico, com volume igual a 10 cm³. Essa medida é expressa em g/cm³ e definida de acordo com a seguinte equação:

$$\rho_a = \frac{\text{massa de } S. \text{ terebinthifolius (g)}}{\text{volume ocupado (cm}^3\text{)}} \quad (44)$$

A **porosidade total do leito** (ϵ) de partículas de *S. terebinthifolius* foi calculada utilizando a massa específica real das partículas e a massa específica aparente do leito, conforme a seguinte equação:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (45)$$

4.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E EXPERIMENTOS REALIZADOS

4.2.1 Extração por Hidrodestilação

Para a condução dos experimentos de hidrodestilação utilizou-se um aparato tipo Clevenger (Figura 6).

Aproximadamente 100 g de massa de sólidos foram pesadas em balança analítica (Gehaka, BG200) e dispostas em um balão de fundo redondo contendo, previamente, água destilada utilizada como solvente, na proporção 1:10 p/p. O balão foi conectado ao aparelho Clevenger e o sistema acoplado a uma manta de aquecimento para elevar à temperatura de ebulição do solvente (100°C). O sistema operou em circuito fechado por 4 horas, tempo necessário para que o volume de óleo no tubo graduado do equipamento permanecesse constante. Ao final do tempo de extração, o volume de óleo obtido foi medido na coluna graduada do aparelho e recuperado em um frasco âmbar fechado por meio da válvula existente na base da coluna, sendo armazenado sob refrigeração. O experimento foi realizado em triplicata.

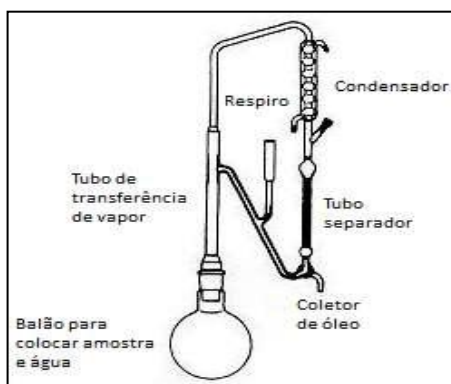


Figura 6: Aparelho tipo Clevenger. Fonte: Adaptado de Ramos, 2007.

4.2.2 Extração com dióxido de carbono em estado supercrítico

O processo de extração com dióxido de carbono em estado supercrítico foi conduzido no Laboratório de Controle de Processos-UFSC.

O equipamento é um HPLC-SC da Jasco Inc (Figura 7), com opção de extração e cromatografia supercrítica.

Como se observa na Figura 8 o HPLC-SC é composto por três bombas: bomba de CO₂ (B1), bomba de cossolvente (B2) e bomba de eluente (B3); forno de aquecimento, trocador de calor, transdutores de pressão, detector UV-vis em linha, válvula backpressure automatizada (BP), sistema de aquecimento (H) controlado para amenizar o efeito de resfriamento provocado pela expansão do CO₂ (Efeito Joule-Thompson). Utilizou-se o vaso de extração (E) com volume interno de 0,010 L (1,0 x 10⁻⁶ m³), com filtro de 10 µm na saída do extrator, para evitar a contaminação com particulados sólidos na linha. O equipamento possui uma interface de comunicação LC-net II (Jasco Inc.) com o computador onde por meio do software ChromNAV podem ser controladas as variáveis operacionais (temperatura, vazão de solvente, cossolvente e eluente além da pressão mediante a back-pressure automatizada).



Figura 7: Unidade de extração do laboratório de Controle de Processos: HPLC SC

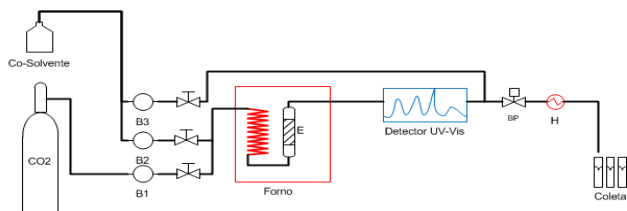


Figura 8: Unidade de extração (HPLC-SC). B- bomba HPLC, E- extrator, BP- Válvula Backpressure, H –Aquecimento

4.2.2.1 Determinação do Rendimento global do extrato (X_o)

O rendimento global de óleo (X_o) é a quantidade de óleo extraível presente na matriz sólida (*S. terebinthifolius*) referente a uma dada temperatura e pressão de extração. Para que os valores de (X_o) sejam válidos e reprodutíveis é preciso especificar uma metodologia para sua determinação.

4.2.2.2 Planejamento Experimental

Os experimentos para determinação do rendimento global de extração foram conduzidos seguindo um planejamento fatorial completo e cinco níveis (planejamento em estrela) com a finalidade de avaliar e quantificar a influência de dois fatores, bem como suas possíveis interações sobre o rendimento da extração. Este planejamento consistiu na análise de uma série de 10 experimentos com repetições envolvendo dois fatores, cada um com cinco níveis, sendo a pressão e a temperatura do CO₂ supercrítico os fatores selecionados como indica a Tabela 2

O planejamento em estrela foi realizado para ampliar o número de níveis dos fatores, a fim de descrever os resultados por meio de um modelo quadrático empírico.

No planejamento em estrela, os níveis estudados são: $\pm \alpha$, ± 1 e 0, onde:

$$\alpha = 2^{n/4} = 2^{2/4} = 1,41$$

E n é o número de fatores estudados.

Tabela 2: Planejamento Experimental

Fatores	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Temperatura	31	35	45	55	60
Pressão	80	100	150	200	220

A pressão e a temperatura do CO₂ supercrítico foram analisadas, pois se verificou na triagem que ambas apresentam influência direta na seletividade e na solubilidade do solvente, assim como no rendimento da extração.

O tempo de extração foi definido através da observação da curva de extração obtida a 150 bar, 31 °C e foi fixado em 180 minutos dado que, foi observado que nesse tempo a extração se aproxima da etapa de taxa nula de extração. A vazão de solvente utilizada foi de 3ml/min.

A matriz do planejamento em estrela encontra-se na Tabela 3, na página seguinte.

Tabela 3: Matriz do planejamento em estrela.

Ensaio	Temperatura (C)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)
1	-1	-1	35	100
2	-1	1	35	200
3	1	-1	55	100
4	1	1	55	200
5	$-\alpha$	0	31	150
6	α	0	60	150
7	0	$-\alpha$	45	80
8	0	α	45	220
9	0	0	45	150
10	0	0	45	150

Os experimentos foram realizados utilizando aproximadamente 8,0 gramas de semente. Foram realizados 9 experimentos para estimar os coeficientes do modelo empírico e mais 1 experimento para determinar o erro experimental. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os frascos com os extratos obtidos foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. O rendimento global (X_o) foi calculado pela razão entre a massa de extrato (m_{extrato}) obtida e a massa de *S. terebinthifolius* (m_{semente}) utilizada para formar o leito, conforme a equação:

$$X_o = m_{\text{extrato}} (\text{g}) / m_{\text{semente}} (\text{g}) \times 100 \quad (46)$$

4.2.2.3 Curvas de Extração

Os experimentos cinéticos para a obtenção das curvas de extração de *S. terebinthifolius* consistiram na determinação da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração. Para a determinação das curvas de extração foram utilizados frascos de coleta previamente pesados em balança analítica e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos em tempos pré-determinados. Após a coleta os frascos foram novamente pesados com a finalidade de se obter a massa de extrato em função do tempo de extração.

As curvas de extração podem ser construídas plotando a massa de extrato acumulado em função do tempo de extração ou da massa de CO_2 consumido; ou ainda pelo rendimento de extração versus a razão massa de solvente por massa de amostra.

Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO_2 puro nas mesmas condições de pressão, temperatura e vazão descritas no planejamento experimental.

4.2.2.4 Determinação Experimental da Solubilidade

A solubilidade do extrato de *S. terebinthifolius* no solvente supercrítico foi determinada experimentalmente com o ajuste simultâneo de duas retas às curvas de extração (m_{extrato} versus m_{CO_2}). Foi determinada a inclinação da reta ajustada no período de taxa constante de extração (I), onde a massa de soluto obtido é constante com o tempo.

Os dados obtidos com este procedimento são valores aproximados, uma vez que existe variação da composição do extrato com o tempo de extração.

4.3 MODELAGEM MATEMÁTICA

O modelo matemático de Sovová (1994) foi aplicado aos dados experimentais de SFE. O ajuste dos modelos foi feito com auxílio do software MatLab® for Windows versão R2011a (Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Os erros de cada ajuste foram calculados pelo desvio entre os dados experimentais e os preditos pelos modelos.

O modelo de Sovová (1994) exige uma série de parâmetros de processo que devem ser obtidos experimentalmente ou estimados.

Os parâmetros necessários para a modelagem do modelo de Sovová (1994) são: porosidade do leito (ϵ), rendimento global (X_o), densidade do sólido (ρ_r), densidade do solvente (ρ_{sol}), vazão de solvente (Q), altura (HB) e diâmetro (dB) do leito de extração, massa de matéria-prima (F), taxa de extração no período de taxa de extração constante (MCER) e solubilidade do extrato no solvente (Y^*), nas condições de processo.

Os parâmetros ajustados para o modelo foram os seguintes:

- a) Y^* : representa a solubilidade do óleo no solvente;
- b) K_{sa} : coeficiente de transferência de massa na fase sólida;
- c) K_{fa} : coeficiente de transferência de massa na fase fluida.

4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DE *S. TEREBINTHIFOLIUS*.

Para a caracterização química dos extratos foram conduzidas análises Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas (GC-MS) nos laboratórios do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB – FURB – Blumenau-SC). Posteriormente no laboratório de Controle de processos realizou-se análise de cromatografia gasosa em detector de ionização de chama (GC-FID).

4.4.1 Condições analíticas GC-MS/GC-FID

As análises cromatográficas com espectro de massa foram realizadas com um GC-MS (Shimadzu GCMS-GC2010-QP2010 plus + AOC 5000) equipado com uma coluna RTX 5 (30m de comprimento x 0,25mm de diâmetro x 0,25 μ m de espessura do filme) O gás de arraste utilizado foi hélio (He) a fluxo constante de 1ml/min. A temperatura do injetor manteve-se em 250°C e a temperatura do forno foi mantida a

60°C por um minuto e, em seguida, aumentada até 240°C a uma taxa de 3°C/min. No espectrômetro de massas (MS) foram utilizadas as seguintes temperaturas: temperatura de iontrap (250°C), temperatura de interface (280°C). O *software* de gerenciamento utilizado foi o GCMS Solutions da Shimadzu e as bibliotecas de compostos utilizadas para identificação foram a NIST08s e a Willey.

Análises de cromatografia gasosa em detector de ionização de chama (GC-FID) também foram realizadas. No cromatógrafo a gás, a coluna e os patamares de temperatura utilizados foram os mesmos usados na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O detector de ionização de chama foi mantido a 280°C e o gás de arraste, He, a fluxo constante de 1,2ml/min. Foi utilizado o mesmo software de gerenciamento.

4.5 SEPARAÇÃO DOS EXTRATOS

No intuito de separar a composição química dos extratos supercríticos de *S.terebinthifolius* foi determinada a metodologia durante a construção das curvas de extração.

Assim, se dividiu este processo em duas etapas descritas a seguir.

4.5.1 Primeira etapa: Identificação do número de frações

Nesta primeira etapa, observou-se de maneira qualitativa uma mudança na coloração dos extratos obtidos ao longo do tempo. Esta mudança coincidiu com a observação de duas regiões no gráfico de leitura do detector UV do HPLC-SC. Este detector possui a característica de fazer a varredura pontual durante o processo enquanto está sendo extraído o material vegetal. A leitura foi realizada em 254 nm.

Esta observação determinou a coleta de duas frações durante a extração supercrítica.

Mediante experimentos exploratórios se padronizou o momento da coleta segundo indica a Tabela 4.

Tabela 4: Tempo de coleta da fração 1 e a fração 2

Fração	Tempo de coleta
1	Do início até o minuto 4.
2	Do minuto 5 até o minuto 180.

Para análise cromatográfica foram selecionadas 4 amostras como indica a

Tabela 5 na página a seguir, tendo em consideração a maior e menor pressão operacional do planejamento experimental (80 bar e 35°C e 220bar e 45°C). De cada condição foram analisadas a fração 1 (4 min) e a fração 2 (176 min).

Tabela 5: Identificação dos extratos analisados por GC-MS e GC-FID

Condição operacional	Fração
80 bar e 35°C	1
80 bar e 35°C	2
45°C e 220 bar	1
45°C e 220 bar	2

4.5.2 Segunda etapa: Comportamento dos compostos químicos ao longo do tempo no processo de extração supercrítica.

Tendo-se identificado duas frações na etapa anterior assim como a melhor condição operacional, passou-se a estudar o comportamento dos compostos químicos ao longo do tempo do processo de extração.

Para isto, realizou-se a construção da curva do processo de extração com um maior número de pontos de coleta (25 pontos). Este ensaio foi realizado em duplicata.

Assim, na Tabela 6, na página a seguir se apresenta os intervalos de tempo em que foram coletadas as frações.

Tabela 6: Intervalos de tempo de coleta para cada ponto de coleta durante o processo de extração.

Fração	Intervalo de coleta (min)
1	0-1
2	1-2
3	2-3
4	3-4
5	4-5
6	5-6
7	6-7
8	7-8
9	8-9
10	9-10
11	10-11
12	11-12
13	12-13
14	13-14
15	14-15
16	15-20
17	20-30
18	30-40
19	40-60
20	60-80
21	80-100
22	100-120
23	120-140
24	140-160
25	160-180

4.6 TESTES DE DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS CANCEROSAS

Com a finalidade de avaliar o potencial anticancerígeno dos extratos fracionados (fração 1 e fração 2), realizou-se uma triagem inicial no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias do Hospital Universitario Professor Polydoro Hernani de São Tiago (UFSC) o qual possui um banco de célula humanas para pesquisa.

4.6.1 Identificação e preparação de extratos fracionados

Para avaliação da atividade anticancerígena foram escolhidos 4 extratos cuja identificação se encontra na Tabela 7. A escolha dos extratos que foram testados baseia-se nos resultados dos cromatogramas que verificaram uma composição química diferente entre eles.

Utilizou-se 20 μL de cada extrato fracionado diluído em 100 μL DMSO (dimetilsulfoxido).

Tabela 7: Identificação das frações testadas para avaliação de potencial anticancerígeno.

Identificação (20 μL extrato+100 μL DMSO)	Condição operativa	Fração
A	45°C e 220 bar	2
B	35°C e 80 bar	1
C	35°C e 80 bar	2
D	45°C e 220 bar	1

4.6.1.1 Cultura de células

Os testes de citotoxicidade foram realizados utilizando a linhagem de células K562 (Leucemia mieloide crônica agudizada) e Jurkat (Leucemia aguda linfoblástica).

Para a utilização das células, a linhagem foi descongelada até atingir a temperatura de 37°C e acondicionada em frasco de cultura de 25 ml contendo 7 ml de meio (Meio Dulbecco's Modificado) DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino.

A suspensão celular foi distribuída em placas de Elisa de 96 poços, sendo 50.000 células por poço para K562 e 100.000 células por poço para Jurkat em 200 μL de meio RPMI suplementado.

A este meio foram acrescidas frações de extrato supercrítico de *S. terebinthifolius* R a serem analisadas. Estes testes foram realizados em triplicata deixando uma das triplicatas sem adição da fração para ser utilizada como controle.

Após plaquear as células e adicionar as frações dos extratos, as células foram incubadas por 1 hora. Após este procedimento, as placas

foram centrifugadas, foi retirado o sobrenadante de todos os poços, se ressuspendeu com 200 μ L e logo depois foram homogeneizados. Sobre cada poço, colocou-se luz na menor intensidade (35J/cm²) durante 2 minutos.

Após a etapa de luz, as células foram incubadas novamente durante 24 horas.

4.6.1.2 Viabilidade das células pelo método MTT

O MTT é um método rápido e preciso que pode ser utilizado para medir a citotoxicidade, proliferação e a atividade das células. Trata-se de um ensaio colorimétrico, cujo componente principal é o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolium (MTT). O MTT é reduzido pela enzima desidrogenase mitocondrial presente nas células viáveis formando cristais de formazan de cor púrpura. A absorção do formazan dissolvido na região do visível correlaciona-se com o número de células viáveis. Assim, alterações na atividade mitocondrial celular resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente, na absorbância, o que permite quantificar a citotoxicidade do tratamento de maneira indireta (MOSMANN, 1983). Os compostos citotóxicos são capazes de danificar ou destruir as células, o que diminui a redução do MTT.

Na determinação da viabilidade das células, as células foram incubadas com 230 μ l de meio DMEM e 20 μ l de solução de MTT (5 mg/ml em TFS) por 3 horas em estufa a 37°C, na ausência de luz. Em seguida, a placa foi centrifugada por 3 minutos, o meio contendo o MTT foi retirado, e os cristais de formazan ressuspensos em 200 μ l de DMSO para solubilização.

A absorbância foi medida em uma leitora de placas do tipo ELISA (THERMOPLATE) nos comprimentos de onda de 540 nm e 630 nm e comparada com aquela obtida com as células sem tratamento (controle) por meio de análise estatística (ANOVA) utilizando com significância $p < 0,05$.

Nesse capítulo foram apresentadas as metodologias adotadas nessa proposta de tese, de maneira a caracterizar a matriz vegetal estudada, definir as condições ideais de extração e fracionamento com fluido supercrítico e avaliar a composição química dos extratos. Assim como a metodologia empregada para avaliação da atividade citotóxica dos extratos obtidos.

A seguir, no Capítulo 5, são apresentados os resultados e discussão obtidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir dos experimentos descritos no capítulo de Materiais e Métodos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA E DO LEITO

5.1.1 Determinação do teor de Umidade

Foi determinado o teor de umidade da semente de *S. terebinthifolius* por meio da metodologia da AOAC (2005) segundo o descrito no 4.1.2 em 8,9% ($\pm 0,5\%$).

Este resultado condiz com os resultados encontrados em trabalhos similares em sementes, esta faixa de umidade presente garante a conservação de compostos antioxidantes (BAGETTI, et al., 2009). Por outro lado, a porcentagem de umidade que possui a semente de *S. terebinthifolius* sem passar por um processo de secagem se encontra na faixa de umidade encontrada em matrizes vegetais utilizadas na extração supercrítica após passar por um processo de secagem (DE OLIVEIRA et al., 2012). Adicionalmente, elevados teores de água na matriz vegetal após a colheita favorecem o desenvolvimento de microrganismos, comprometendo a atividade dos compostos ativos da planta (BARBOSA et al, 2006)

5.1.2 Determinação do tamanho médio da partícula

A geometria e o tamanho médio da partícula das sementes de *S. terebinthifolius*, podem ser observados na página seguinte na Figura 9. A fotografia foi realizada com um microscópio eletrônico de varredura no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, LCME/UFSC.

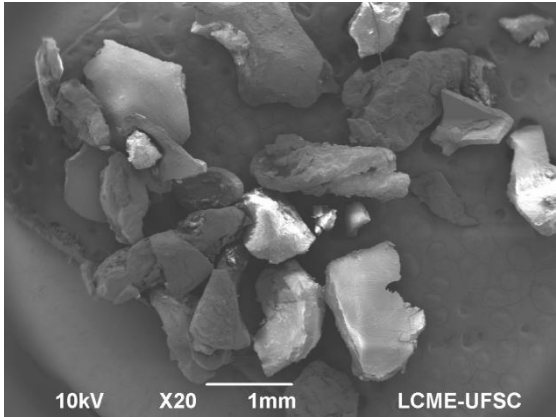


Figura 9: Microfotografia das partículas das sementes de *S. terebinthifolius raddi*. (Ampliação= 20 vezes)

Observando a Figura 9, verifica-se que as partículas das sementes de *S. terebinthifolius* têm formatos irregulares, podendo ser consideradas como partículas esféricas cujo diâmetro médio, conforme determinado pelo software de determinação de tamanho de partículas (*Image J*), é de 1,24 mm.

Segundo Reverchon e De Marco (2006), o tamanho de partículas da matriz sólida, assim como outros parâmetros, é crucial na extração com CO₂ supercrítico. O tamanho de partículas desempenha um papel determinante nos processos de extração controlados pela resistência interna à transferência de massa, pois um menor tamanho médio de partículas reduz o caminho difusional do solvente. No entanto, se as partículas forem muito pequenas pode ocorrer a formação de caminhos preferenciais no leito de extração e, com isso, parte do solvente flui através desses canais formados, sem entrar em contato com o material a ser extraído, o que causa perda na eficiência do processo. De maneira geral, diâmetros médios de partículas entre 0,25 e 2,0mm são utilizados.

5.1.3 Determinação da densidade real das partículas (ρ_r), densidade aparente (ρ_a) e da porosidade do leito (ϵ)

Na Tabela 8 são apresentados os valores obtidos para massa específica real dos sólidos, massa específica aparente do leito e porosidade do leito de partículas de *S. terebinthifolius* R.. Esses

parâmetros não constam na literatura disponível e podem ser importantes para futuras aplicações dessa matriz vegetal.

Tabela 8: Parâmetros do leito fixo

<i>Parâmetros</i>	
Densidade Real (ρ_r , Kg/m ³)	1380 ± 0,2
Densidade aparente (ρ_a , Kg/m ³)	800 ± 0,17
Porosidade do leito (ϵ)	0,421

5.2 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

5.2.1 Extração por Hidrodestilação

A extração do óleo essencial de *S. terebinthifolius* foi realizada pela técnica tradicional de hidrodestilação. Utilizou-se esta técnica por ser o método mais comumente utilizado para a obtenção de óleo essencial de *S. terebinthifolius* (Barbosa, et al., 2007).

O experimento foi realizado em triplicata. A média do rendimento do óleo essencial obtido foi de 5,23% (\pm 0,24%).

Na página seguinte, a Tabela 9 mostra os componentes identificados no óleo essencial de *S. terebinthifolius* obtido por hidrodestilação. Foram identificados 29 compostos.

Os compostos que apresentaram os picos com maior área relativa no cromatogramado óleo essencial de *S. terebinthifolius* foram: alfa-pineno (19,56%), seguido do limoneno (16,15%), o delta-3-carene (10,2%). Em menor proporção se encontraram o beta-pineno (7,88%); sabineno (6,79%); p-cymeno (3,89%) e o beta-felandrenoe (3,6%).

Tabela 9: Composição química do óleo essencial de *S. terebinthifolius* obtido pela técnica de hidrodestilação

Nº	Composto	Area relativa (%)
1	alfa-pineno	19,56
	pineno	0,02
3	alfa-fencheno	0,01
4	camfeno	0,14
5	2-hexaneno	0,03
6	beta-pineno	7,88
7	sabineno	6,79
8	delta-3-careno	10,2
9	beta-myrceno	5,73
10	alfa-felandreno	12
11	alpha-terpileno	0,33
12	limoneno	16,15
13	beta-felandreno	3,6
14	q terpineno	0,46
15	trans-beta-ocimeno	0,05
16	p-cymeno	3,89
17	terpinoleno	0,42
18	perrilleno	0,03
19	delta-elemenno	0,07
20	alfa-copaeno	0,09
21	Cetona desconhecida	0,08
22	Cetona desconhecida	0,13
23	linalool	0,14
24	linalyl acetato	1,68
25	bornyl-acetato	0,11
26	Sesquiterpeno desconhecido	0,13
27	cariofileno	2,1
28	terpinenol-4	0,54
29	myrtenal	0,05

5.2.2 Extração com CO₂ supercrítico (ESC)

5.2.2.1 Rendimento Global da Extração Supercrítica (X₀)

Os resultados de rendimento global de extração (X₀) de *S. terebinthifolius* com CO₂ supercrítico puro são apresentados na

Tabela 10, com os valores de temperatura (T), pressão (P) e densidade de solvente (ρCO₂) correspondente. O rendimento global da extração é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas

de temperatura e pressão para um tempo de processo pré-determinado (MARTÍNEZ et al . 2005).

Tabela 10: Rendimento obtido a partir do planejamento em estrela.

<i>Ensaio</i>	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Pressão</i> (bar)	ρ_{CO_2} Kg/m ³	X_0	<i>Desvio</i> <i>padrão</i> (±)
1	35	100	712,8	5,50	0,07
2	35	200	865,7	9,03	0,04
3	55	100	325,07	1,98	0,04
4	55	200	754,6	9,99	0,06
5	31	150	840,8	10,38	0,05
6	60	150	604,09	7,83	0,06
7	45	80	241,05	1,54	0,04
8	45	220	832,36	8,17	0,06
9	45	150	741,97	8,59	0,04
10	45	150	741,97	9,24	0,07

Os resultados que se mostram no planejamento experimental mostraram que os melhores rendimentos foram obtidos na medida em que as densidades foram mais elevadas. Assim, se obteve o melhor rendimento na condição de 150 bar e 31°C com 10,38%. Já na condição de 80 bar e 45°C se obteve o menor rendimento. De acordo com McHugh e Krukoni (1994), o poder solvente de um fluido sub ou supercrítico está relacionado com sua densidade e, desta forma, espera-se que maiores variações de densidade entre duas condições experimentais proporcionem maiores variações no rendimento final de extrato.

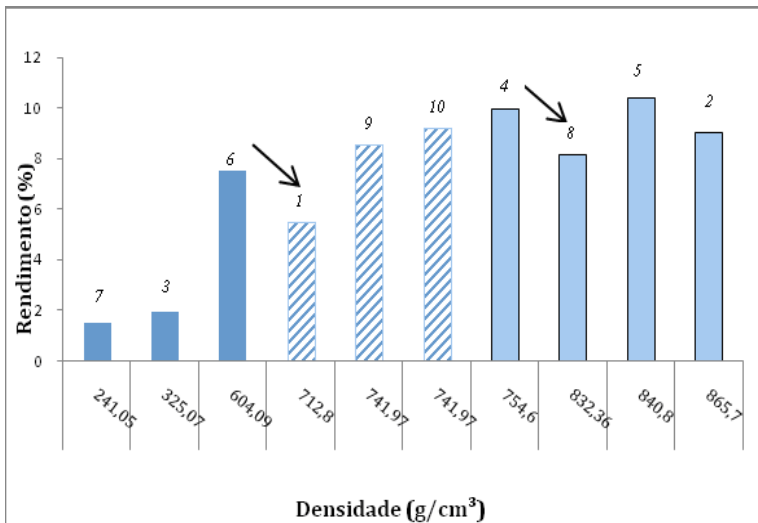


Figura 10: Influência da densidade no rendimento total de cada extração.

Na Figura 10 observa-se claramente a tendência ao aumento no rendimento com o aumento da densidade operacional. Porém, observou-se que mesmo com um aumento na densidade operacional entre os ensaios 4 e 5 houve uma diminuição do rendimento. Isto pode estar relacionado com o fato do ensaio 4 possuir uma temperatura de trabalho elevada (60°C), assim a pressão de vapor do soluto estaria exercendo maior influência na solubilidade dos compostos do que a densidade (CAVALCANTI e MEIRELES, 2012). Este comportamento se repete entre os ensaios 7 e 8.

No gráfico da Figura 11 estão representados os ensaios 1; 2; 3 e 4 do planejamento experimental. Na análise do processo de extração isobárico a 200 bar observou-se que quanto maior a temperatura de extração, maior é o rendimento. Tal fato está relacionado ao aumento da pressão de vapor do extrato em maiores temperaturas, além do incremento na difusividade e menor viscosidade do solvente a 55 °C quando comparado a 35° C (MUKHOPADHYAY, 2000). Este comportamento se repete na pressão de 150 bar.

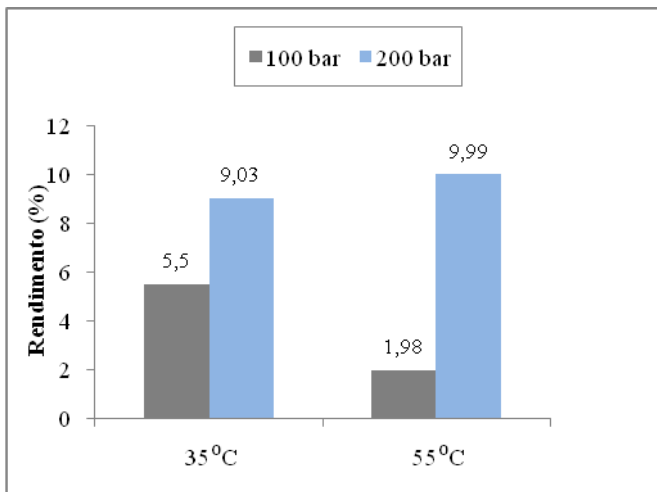


Figura 11: Efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico de *S. terebinthifolius* R.

No caso da pressão de 100 bar, observou-se que na medida em que a temperatura aumenta o rendimento da extração diminui. Isto ocorre devido ao aumento da temperatura que teve um efeito negativo sobre a densidade do solvente, por consequência diminuiu o rendimento ao mesmo tempo em que aumentou a pressão vapor do soluto. Provavelmente isto ocorre pelo fato da pressão se encontrar abaixo do ponto de inversão das isotermas (LEE et al; LEAL et al; MICHELIN et al; 2000, 2003, 2005).

Analisando isotermicamente os experimentos realizados a 45°C (Figura 12), observou-se que o rendimento da extração é significativamente menor em pressões de trabalho menores (80 bar). Assim, a densidade teve um efeito dominante. O efeito da densidade do solvente supercrítico se mostrou mais efetivo do que a pressão de vapor do soluto. Resultados similares no que tange à variação de pressão e densidade de extração foram obtidos por Bensevia et al (2009), que avaliaram os efeitos dos parâmetros da extração com dióxido de carbono supercrítico em *Rosmarinus officinalis*.

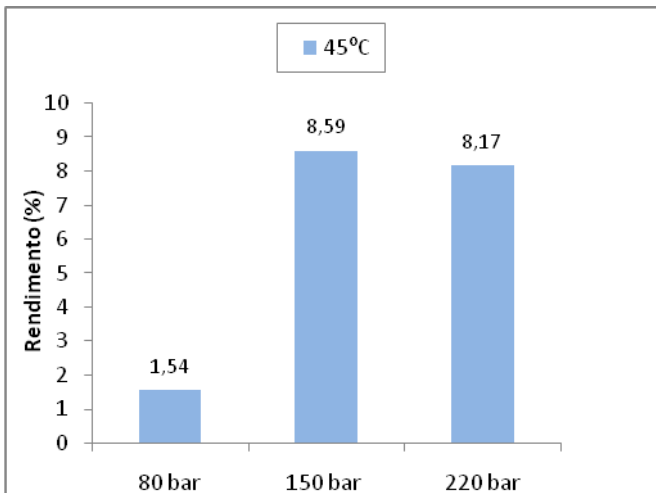


Figura 12: Efeito da pressão sobre o rendimento do extrato supercrítico de *S. terebinthifolius* R.

5.2.2.2 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o *software* STATISTICA 10.0.

Com os resultados apresentados na

Tabela **10** realizou-se uma análise dos efeitos da interação entre os fatores pressão e temperatura, utilizados no planejamento experimental em relação ao rendimento de cada extração.

Os efeitos foram comparados com a estimativa do erro padrão da resposta e considerados estatisticamente significativos caso fossem maiores do que este erro padrão (Barros Neto et al., 1995). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de 5% ($p < 0,05$).

Quando o efeito de uma variável depende do nível da outra, como neste caso, as variações interagem e pode-se calcular o efeito de interação entre elas. Os valores obtidos para os efeitos e seus respectivos índices estatísticos podem ser observados a seguir na Tabela 11.

Tabela 11: Estimativa dos efeitos significativos que influenciaram na variável resposta.

				-95%	+95%
	<i>Efeito</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Nível p</i>	<i>Limite de Confiança</i>	<i>Limite de Confiança</i>
Média/Interações	8,922	0,366	0,000017	7,904	9,940
(1) Pressão (L)	5,258	0,369	0,000141	4,233	6,282
Pressão (Q)	-4,319	0,495	0,000953	-5,695	-2,944
(2) Temperatura (L)	-1,523	0,363	0,013790	-2,533	-0,514
Temperatura (Q)	0,051	0,465	0,917380	-1,241	1,343
1L e 2L	2,240	0,519	0,012497	0,798	3,681

Observa-se que os termos lineares (L), tanto de pressão como de temperatura, apresentam efeitos significativos no rendimento. Já no que se refere aos termos quadráticos (Q), somente a pressão obteve resultado estatisticamente significativo em nível p menor que 0,05. Na página seguinte encontra-se o gráfico de Pareto (Figura 13), nele observam-se os efeitos dos fatores que influenciam no rendimento com a ampliação do seu valor, ultrapassando a linha de corte (linha vermelha).

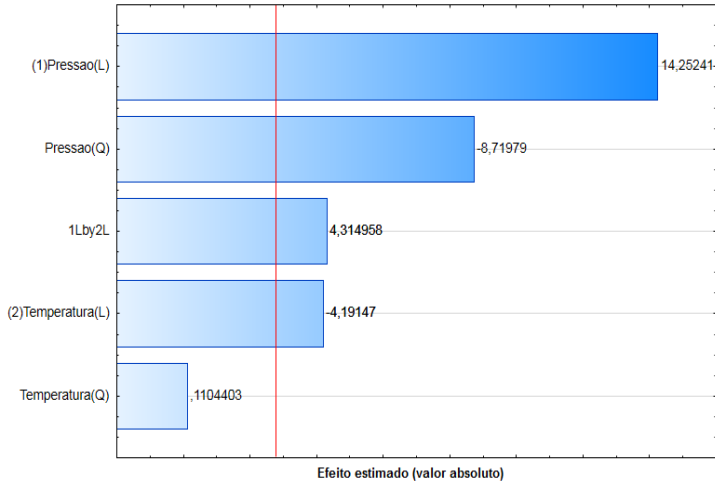


Figura 13: Gráfico de Pareto

Nas Figura 14 e15, podem-se observar, respectivamente, a superfície de resposta gerada pelo modelo e suas correspondentes curvas de nível.

O gráfico de superfície de resposta apresenta o comportamento do rendimento global (

Tabela 10) em função da pressão e temperatura de extração, onde a região mais escura representa a região de maior rendimento.

Os valores negativos de rendimento apresentados nas Figuras 14 e 15 se devem a extrapolação feita pelo modelo no momento de construção dos gráficos. No entanto, estes valores devem ser desconsiderados, uma vez que se encontram fora da faixa de pressão e temperatura analisada.

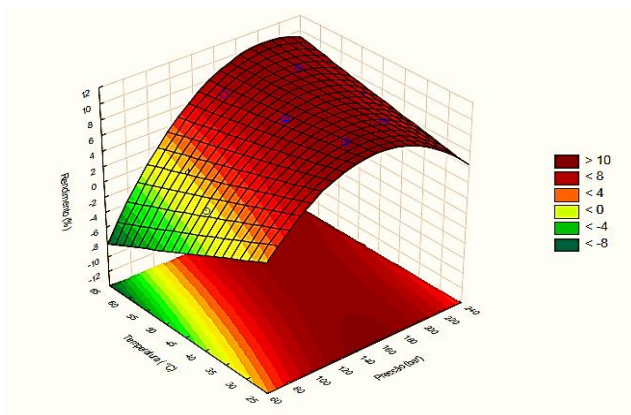


Figura 14: Gráfico de superfície de resposta para o rendimento global da ESC de *S. terebinthifolius* em função da Pressão e a temperatura

Observando a Figura 14, verifica-se que com a redução da temperatura e o aumento da pressão do CO₂ supercrítico, o rendimento da extração aumenta.

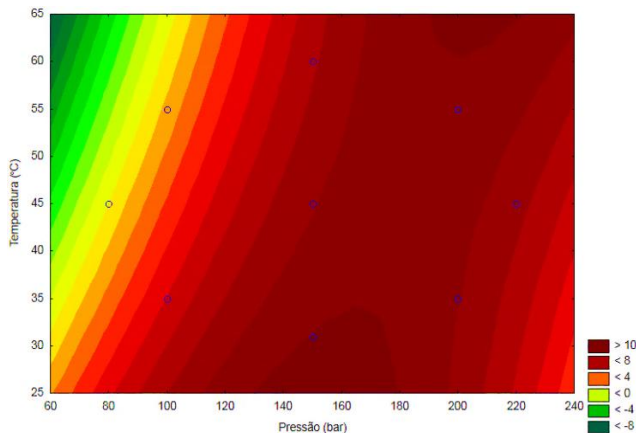


Figura 15: Curvas de nível para os fatores pressão e temperatura.

Pode ser observado que na região compreendida entre 140 e 180 bar as variações na temperatura não alteram significativamente o rendimento da extração. No entanto, a melhor condição de extração é a 150 bar e 31°C, pois são as menores condições pressão e temperatura

em que se obtém o maior rendimento, ou seja, as condições que obtém o maior rendimento com o menor gasto energético.

Pode-se verificar na Figura 15, na faixa de pressão de 80 a 100 bar, o aumento da temperatura provoca uma redução do rendimento. Isto ocorre devido à diminuição da solubilidade do soluto provocada pela diminuição da densidade do CO₂, uma vez que até 100 bar a densidade é mais sensível ao aumento da temperatura do que a volatilidade do extrato. No entanto, entre 120 bar e 220 bar, o efeito competitivo entre a densidade do CO₂ supercrítico e a volatilidade do extrato se iguala e a solubilidade permanece relativamente constante com o aumento da temperatura.

Este tipo de comportamento foi observado por Lee et al. (1994), onde em pressões menores que 250 bar, no caso das extrações de óleo da semente de prímula com CO₂ supercrítico, o efeito da densidade do CO₂ era mais sensível a temperatura do que a volatilidade do soluto e a pressão constante de 250 bar, os efeitos se igualavam.

Embora esse comportamento seja complexo, pode ser considerado que isso ocorra pelo efeito competitivo entre a densidade do solvente e a volatilidade do soluto. Aumentando a temperatura, a densidade do solvente diminui e a volatilidade do soluto aumenta. Diminuindo a densidade do solvente, diminui a probabilidade de uma determinada molécula do soluto na fase sólida interagir com a molécula do solvente tendendo a uma diminuição na solubilidade. Aumentando a volatilidade de um soluto, por outro lado, aumenta a tendência do soluto escapar da fase sólida, tendendo a um aumento de solubilidade (DONELIAN et al, 2009).

O modelo para a extração de *S. terebinthifolius* com CO₂ supercrítico é representado pela equação a seguir:

$$r = 0,6649 + 0,2109 * P - 0,0086 * P^2 + 0,4353 * T - 0,0002 * T^2 + 0,0022 * P * T$$

onde:

P = Pressão do CO₂ (bar);

T = Temperatura do CO₂ (°C).

O modelo de regressão apresentou um ajuste (R²) de 0,9858, isto indica que, o modelo é capaz de prever o rendimento da extração.

5.2.2.3 Curvas globais de extração

A Figura 16 e a Figura 17 mostram as curvas do processo de extração supercrítica de *S.terebinthifolius* para diferentes condições de pressão e temperatura de solvente. Estas curvas apresentam uma etapa de taxa constante de extração (I), uma etapa de taxa decrescente (II) e, finalmente tende a apresentar uma etapa de taxa nula de extração (III), quando o mecanismo de difusão é predominante.

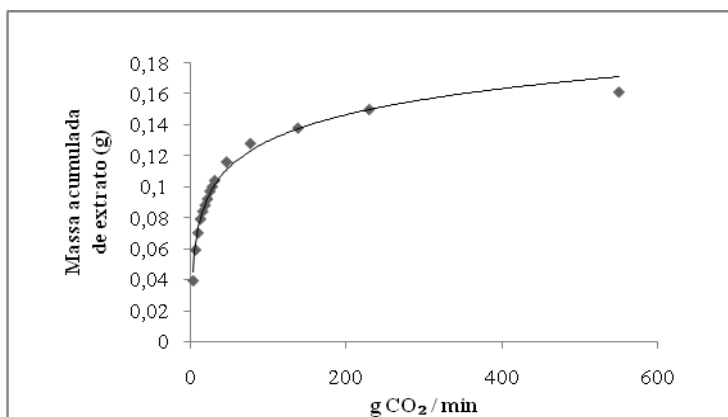


Figura 16: Curva de extração na condição de 100 bar e 55 °C

O comportamento da curva de extração de *S.terebinthifolius* com CO₂ supercrítico é semelhante as demais extrações com CO₂ supercrítico como foi verificado por Brunner (1994). O processo consiste em três etapas principais: a primeira etapa, conhecida como etapa de taxa constante de extração que é inicialmente linear. Nesta etapa o extrato facilmente acessível das células abertas pela moagem é extraído pelo solvente com facilidade, sendo que a extração é controlada pela relação de equilíbrio entre o extrato e a fase fluida.

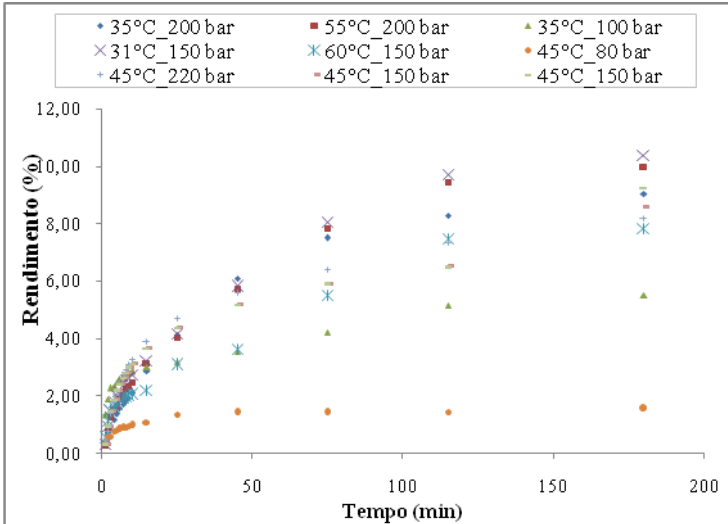


Figura 17: Curvas de extração obtidas em todas as condições operacionais

A última etapa é a de taxa quase nula de extração. Nesta etapa a inclinação da curva diminui e o traçado se aproxima assintoticamente do valor que representa o conteúdo teórico de soluto extraível (X_0) (FERREIRA, 1991). Assim, para a determinação do rendimento (X_0) o tempo de extração deve assegurar que esta etapa de extração quase nula seja alcançada.

Observou-se que todas as curvas possuem uma inclinação pronunciada no início correspondente a primeira etapa, com exceção da condição de 45°C e 80 bar que foi a que menor rendimento. Este fato ajudou na escolha dos fracionamentos a serem discutidos posteriormente.

Na página seguinte a Tabela 12 apresenta os valores de solubilidade experimental, obtidos em diferentes condições de operação a partir das curvas de extração de *S. terebinthifolius*. A solubilidade do soluto na fase solvente é um parâmetro importante, necessário para a aplicação do modelo de transferência de massa de Sovová (1994). Os valores prévios de solubilidade do extrato de *S. terebinthifolius* em dióxido de carbono a alta pressão foram obtidos da inclinação da etapa de taxa constante de extração (etapa I).

Tabela 12: Valores de Solubilidade experimental para cada condição de extração.

Condição	Densidade (kg/m ³)	Rendimento (%) Xo	Solubilidade(g extrato /g CO ₂)
35°C e 100 bar	712,81	5,50	0,0118
35°C e 200 bar	865,72	9,03	0,0058
55°C e 100 bar	325,07	1,98	0,0043
55°C e 200 bar	754,61	9,99	0,0093
31°C e 150 bar	840,81	10,38	0,0101
60°C e 150 bar	604,09	7,83	0,0107
45°C e 80 bar	241,05	1,54	0,0024
45°C e 220 bar	832,36	8,17	0,0093
45°C e 150 bar	741,97	8,59	0,0089
45°C e 150 bar	741,97	9,24	0,0093

Nota-se que na maioria dos casos a solubilidade apresentou uma tendência de comportamento com a variação da densidade do CO₂. O aumento da densidade resultou em menores tempos da etapa de taxa constante de extração (I) o que se deve ao aumento do poder de solvatação do solvente. Porém uma maior solubilidade em função da densidade do solvente significa segundo Brunner (1994) uma menor seletividade dos compostos de interesse.

5.3 MODELAGEM MATEMATICA

Foi realizado o ajuste do modelo matemático de transferência de Sovová (1994) às curvas globais de extração que apresentaram maior rendimento. As condições operacionais utilizadas nos experimentos cinéticos, os parâmetros ajustáveis bem como o erro quadrático médio (EQM) para cada condição operacional modelado descritos na Tabela 13

Tabela 13: ajuste dos parâmetros

P [bar]	T [°C]	Y* [kg/kg solvente]	Kfa [s ⁻¹]	Ksa [s ⁻¹] x10 ⁻⁶	EQM [x10 ⁻³]
150	31	0,00773	8,93 x10 ⁻⁵	1,51	1,54
150	45	0,01588	4,18 x10 ⁻⁵	1,54	2,69
200	35	0,00660	7,45x10 ⁻⁴	1,53	6,52
200	55	0,00527	2,4 x10 ⁻⁴	1,55	1,51

De acordo com os valores de EQM é possível verificar que a condição de 200 bar e 35°C apresentou melhor ajuste aos dados experimentais seguido em ordem decrescente pela condição 150 bar e 45°C, 150 bar e 31°C e finalmente 200 bar e 55°C. Isso provavelmente deve-se ao fato de que o modelo de Sovová (1994) considera matrizes vegetais compostas por dois tipos de partículas: partículas que sofreram dilaceração de suas células através de processos de pré-tratamento, como moagem por exemplo, e partículas inteiras que não sofreram este tipo de processo. As primeiras apresentam material extraível de fácil acesso o que caracteriza bem a etapa CER de extração enquanto que as demais caracterizam partículas intactas o que caracteriza bem a etapa DC de extração.

É possível perceber que em todos os ensaios realizados os valores do coeficiente de transferência de massa na fase sólida (K_{sa}) foram inferiores aos valores do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (K_{fa}). Isto se deve ao fato do soluto que está localizado em partes menos acessíveis da matriz vegetal ter mais dificuldade para ser dissolvido, levando mais tempo para vencer a interface sólido-fluido que o soluto localizado superficialmente. Portanto, os menores valores de K_{sa} obtidos indicam que o mecanismo de difusão é menos representativo quando comparado com a convecção nestes ensaios.

Nas figuras 18, 19, 20 e 21 é possível observar que o modelo de Sovová (1994) apresenta um bom ajuste aos dados experimentais para todas as condições operacionais testadas. Sendo que a condição de 200 bar e 35°C foi a que melhor ajuste apresentou.

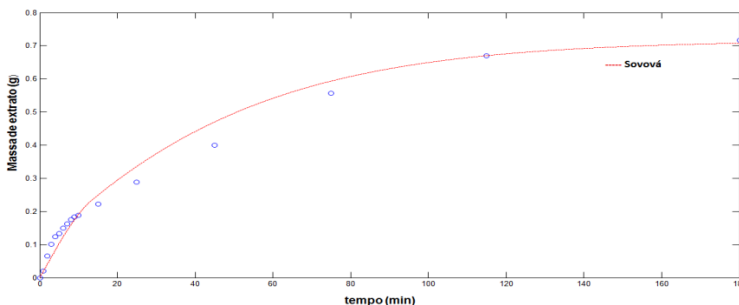


Figura 18: 150 bar e 35°C

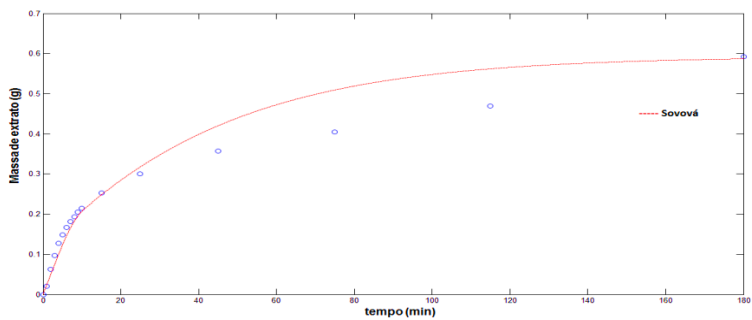


Figura 19: 150 bar e 45°C

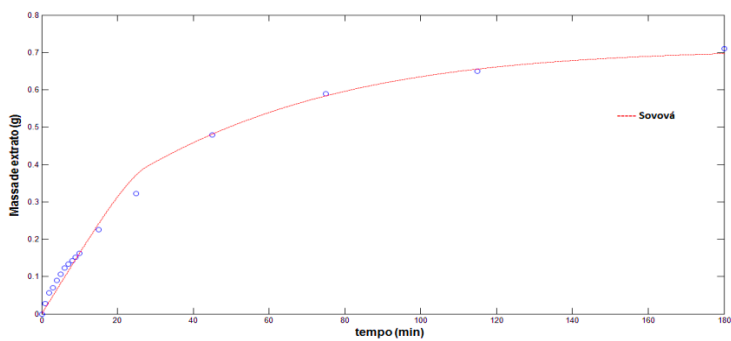


Figura 20: 200 bar e 35°C

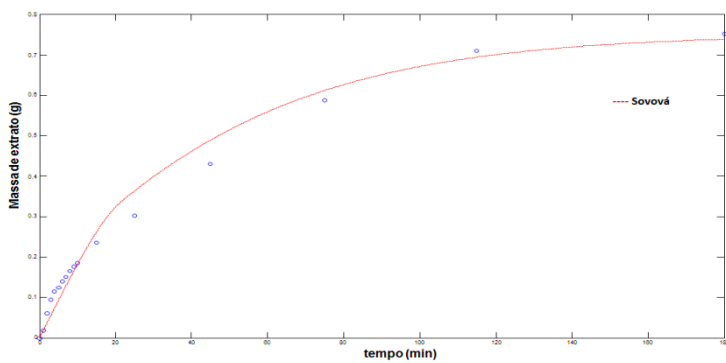


Figura 21: 200 bar e 55°C

O modelo de Sovová (1994) forneceu bons resultados provavelmente pelas curvas experimentais apresentar um período de taxa constante de extração bem definido no seu início como é o caso da condição experimental de 150 bar e 45°C, e sua principal vantagem é a descrição do fenômeno que ocorre no processo de ESC que dá um claro significado físico aos parâmetros ajustáveis. Por outro lado, este modelo é limitado aos sistemas onde a solubilidade do soluto no solvente é conhecida à temperatura e pressão do processo (SOUZA et al., 2004)

5.4 SEPARAÇÃO DOS EXTRATOS

A literatura somente relata a existência de um único estudo que fala da atividade anticancerígena do óleo essencial extraído pelo processo de arraste a vapor das sementes de *S. terebinthifolius* em uma linhagem de células de câncer de seio (BENDAOUD et al., 2010). Sabe-se que a utilização desta técnica tradicional de extração degrada compostos termo-sensíveis, não sendo extraídos totalmente. Outros destes compostos químicos podem permanecer na água após a condensação e assim serem descartados (HEATH, 1981; MUKHOPADHYAY, 2000). Por outro lado, dados da literatura confirmam a alta variabilidade genética desta espécie o que traz como resultado uma composição química diferente em seus extratos (BARBOSA, L.C; DEMUNER, A.J; CLEMENTE, 2007; CERUKS et al., 2007).

Tudo o que precede, motivou a utilização do processo de separação com solvente em estado supercrítico devido à capacidade de modulação contínua do poder de seletividade do solvente e outras vantagens já relatadas na revisão da literatura deste documento.

O processo de separação foi realizado baseado em estudos científicos de deterpenação com dióxido de carbono supercrítico (DIAZ, S.Ç ESPINOSA, E.Ç BRIGNOLE, 2005; GAÑÁN; BRIGNOLE, 2013; OSSÉO et al., 2004; VARONA et al., 2008).

Assim, seguindo a metodologia descrita no item 0 deste documento, realizou-se o fracionamento dos extratos supercríticos de *S. terebinthifolius* para a obtenção de duas frações.

5.4.1 Primeira Etapa: Identificação do número de frações

Por meio de testes exploratórios observou-se durante a construção da curva de extração supercrítica uma notória diferença na cor e viscosidade dos extratos coletados ao longo do tempo. Além disso,

o gráfico de leitura UV setado em 250 nm para uma varredura pontual mostrava duas áreas que coincidiam com a mudança na cor e viscosidade do extrato. Desta maneira, se determinou a coleta de duas frações posto como se mostra na Figura 22.

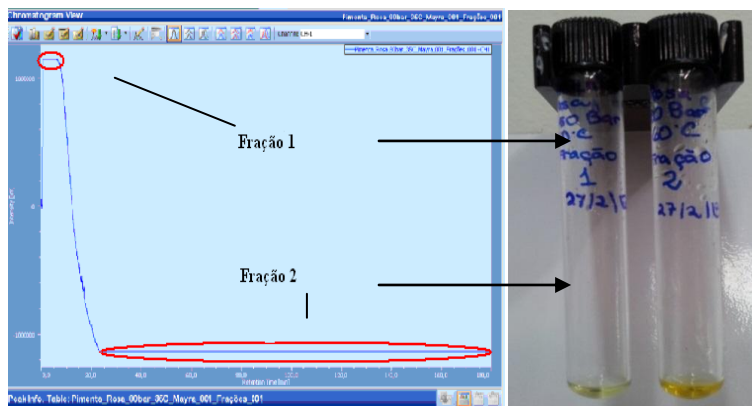


Figura 22: Frações 1 e 2 de extrato supercrítico de *Schinus terebinthifolius*

Determinou-se também que, o tempo de coleta da primeira fração seria de até o minuto 4, isto devido a que se observou que com o aumento da pressão se tornava mais difícil a separação entre as frações.

Todas as condições experimentais citadas no planejamento experimental passaram pela metodologia de fracionamento com a finalidade de determinar qual era a condição experimental que oferecia uma melhor separação dos compostos.

A Tabela 14, localizada na página seguinte, apresenta a massa do extrato obtido para cada fração em cada condição de extração. Foi observado na maioria das condições que a fração 1 possuía menos massa do que a fração 2, o que já era esperado por esta possuir um maior tempo de coleta.

Tabela 14: Massa obtida para cada fração em cada condição de extração.

Condição	ρ_{CO_2} Kg/m ³	Fração 1 (g)	Fração 2 (g)	Proporção F_1/F_2
35°C_100 bar	712,8	0,229	0,315	0,73
35°C_200 bar	865,7	0,09	0,62	0,15
55°C_100 bar	325,07	0,079	0,086	0,92
55°C_200 bar	754,6	0,115	0,636	0,18
31°C_150 bar	840,8	0,124	0,593	0,21
60°C_150 bar	604,09	0,102	0,415	0,25
45°C_80 bar	241,05	0,052	0,054	0,96
45°C_220 bar	832,36	0,127	0,436	0,29
45°C_150 bar	741,97	0,128	0,464	0,27
45°C_150 bar	741,97	0,128	0,367	0,34
35°C_80 bar	419,09	0,128	0,118	1,08

Assim, se testou a condição operacional de 80 bar e 35°C baseada numa densidade média do solvente de extração. Observou-se que foi esta condição a única que apresentou uma massa maior na fração 1 do que na fração 2, como se comprova pela proporção obtida entre a fração 1 e a fração 2. Este fato pode ter acontecido pela seletividade do CO₂ a essas condições de densidade.

5.4.1.1 Caracterização química dos extratos fracionados

Foram selecionadas duas condições de extração para análise cromatográfica GC-MS e GC-FID descrita no item 0.

A Tabela 15, localizada na página seguinte, apresenta a composição química dos extratos de *S. terebinthifolius* para as duas frações coletadas (fração 1 e fração 2), em termos de porcentagem de área relativa no cromatograma nas duas condições de extração estudadas (80 bar e 35°C; 220 bar e 45°C).

Foram identificados 16 compostos. Este resultado é drasticamente menor quando comparado ao método tradicional de

hidrodestilação, no qual foram encontrados identificados 30 compostos. Isto pode ser explicação pela degradação térmica dos compostos químicos a temperaturas elevadas. Também pode ter acontecido a hidrólise de alguns destes assim como a degradação dos mesmos dando origem a formação de novos compostos (MUKHOPADHYAY, 2000; REVERCHON, et al., 2006; SÁNCHEZ-PALOMO et al. , 2009).

Comparando os compostos majoritários obtidos na hidrodestilação descritos na Tabela 9 com os compostos obtidos com CO₂ supercrítico (Tabela 15), observou-se que, houve uma diminuição na porcentagem de área relativa no cromatograma referente ao composto alfa-pineno (%4,8) sendo que na hidrodestilação obteve 19,56%. Isto indica a baixa solubilidade deste monoterpene no CO₂ em estado supercrítico.

No caso dos compostos: delta-3-carene (19,3%), alfa-felandrene (%23,3) e limonene (16,5%) obtidos com CO₂ supercrítico, a porcentagem da área do cromatograma relativa a fração 1 nas duas condições operacionais testadas foram superiores (mais do dobro) em comparação aos resultados obtidos na hidrodestilação.

Esses resultados podem ser explicados pelo fato dos terpenos e terpenoides serem compostos quimicamente instáveis (devido à dupla ligação carbono-carbono) e, por tanto, as moléculas apresentam diferentes reorganizações químicas (isomerização). Além disso, possuem pontos de ebulição semelhantes, e são difíceis de isolar. O ponto de ebulição normal de terpenos varia de 150 a 185 °C, enquanto que o ponto de ebulição normal de derivados oxigenados está na gama de 200-230 °C, por isso a grande desvantagem da técnica de hidrodestilação (FORNARI et al, 2012).

Tabela 15: Composição química (% área GC-MS) dos extratos separados de *S. terebinthifolius*.

<i>N°</i>	<i>RT</i>	<i>Composto</i>	<i>80 bar 35°C Fração1</i>	<i>80bar 35°C Fração 2</i>	<i>220 bar 45°C Fração 1</i>	<i>220bar 45°C Fração2</i>
1	7,767	alfa-pineno	4,86	-	3,52	0,50
2	9,376	sabineno	1,28	-	1,05	-
3	10,168	myrceno	3,88	-	3,26	0,55
4	10,820	alfa-felandreno	23,3	0,19	20,47	2,58
5	11,084	delta-3-careno	19,37	0,18	16,99	2,28
6	11,651	para-cimeno	1,81	0,12	1,67	0,37
7	11,935	limoneno	21,37	0,25	19,66	2,93
8	14,634	terpinoleno	1,33	-	1,3	0,33
9	20,028	Alfa-felandreno-epoxido	0,32	0,87	0,38	0,87
10	26,276	eneldo-pimenta	0,36	4,49-	0,75	1,79
11	27,048	delta-elemeno	0,62	1,93	0,75	1,77
12	28,677	cariofileno	1,06	4,81	1,05	3,39
13	29,825	germacrene-D	3,21	4,45	3,77	6,54
14	32,417	beta-elemen-7-alfa-ol	5,91	14,37	7,44	11,68
15	35,154	elemol	4,68	42,35	8,11	15,06
16	40,004	beta-elemeno	6,01	23,65	8,22	17,37

Devido as diferenças quantitativas (% área no cromatograma) na composição química das frações 1 e 2, pode-se observar que houve

uma separação com CO₂ supercrítico dos extratos de *S. terebinthifolius* nas condições experimentais testadas.

Os resultados mostram que, na condição de 80 bar e 35°C houve uma melhor separação dos compostos. Isto pode ser observado de maneira qualitativa nos cromatogramas (Figura 23 e Figura 24). A fração 1 apresentou uma porcentagem de área no cromatograma alta de monoterpenos (1-8) e baixa em sesquiterpenos (12-16).

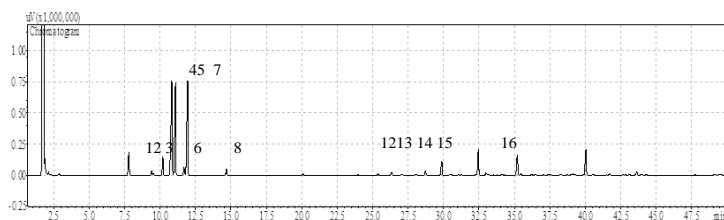


Figura 23: Cromatograma obtidos por GC-MS para Fração 1 na condição de 80bar e 35C. (Compostos identificados por números segundo Tabela 15)

Já, o cromatograma da fração 2 na mesma condição, observou-se que não houve presença dos primeiros compostos, resultando em uma fração com 7 compostos identificados. Estes resultados sugerem que os compostos com menor peso molecular foram os primeiros a sair deixando por último os mais pesados.

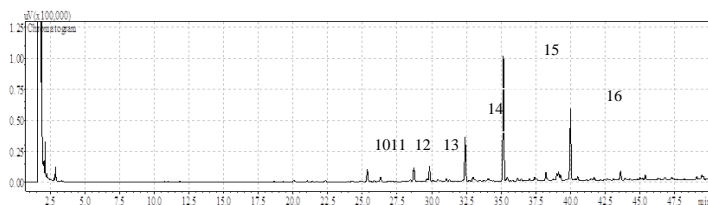


Figura 24: Cromatograma obtido por GC-MS para Fração 2 na condição de 80bar e 35C. (Compostos identificados por números segundo Tabela 14)

Este resultado está de acordo com os estudos realizados por Gupta, et al., (2007), demonstraram que a solubilidade de monoterpenos hidrocarbonados como o limoneno em CO₂ supercrítico é maior quando se trabalha em condições operacionais menores que 96 bar e 50°C.

Nas Figuras 25 e 26 se apresentam os cromatogramas das frações obtidas na condição de 220 bar com 45°C.

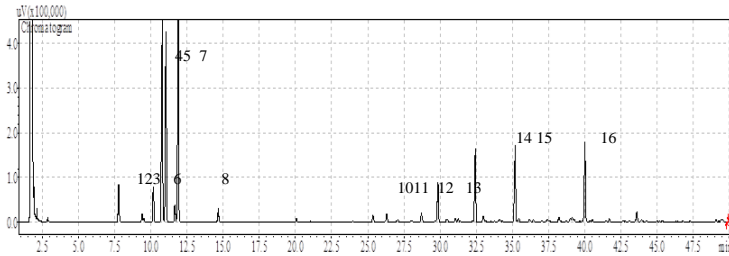


Figura 25: Cromatograma obtido por GC-MS para Fração 1, na condição de 220 bar e 45°C. (Compostos identificados por números segundo Tabela 15)

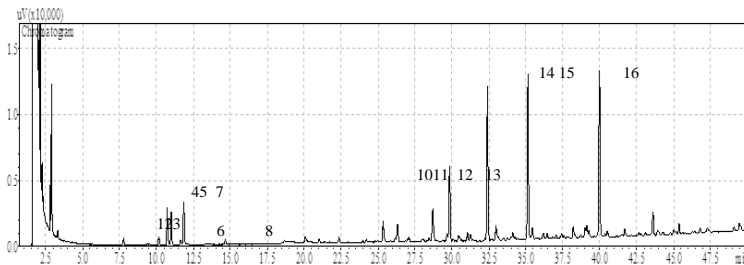


Figura 26: Cromatograma obtido por GC-MS para Fração 2, na condição de 220 bar e 45°C. (Compostos identificados por números segundo Tabela 15)

Na Figura 25, observa-se que para fração 1, os primeiros oito compostos identificados se apresentaram em menor proporção em comparação com a fração 2 para condição operacional de 220 bar e 45°C.

Analisando a Figura 26 (220 bar e 45°C), observa-se que, os compostos identificados se encontraram em uma maior proporção do que não fração 2 na condição de 80 bar e 35 °C. Este fato pode ser explicado pela perda de seletividade do CO₂ supercrítico por se encontrar a uma pressão elevada (BRUNNER, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000).

Os resultados do processo de separação com CO₂ supercrítico de *S. terebinthifolius* demonstram que a densidade do solvente jogou um papel importante no processo. Isto está de acordo com estudos realizados por Oca et. al, (1999) em fracionamento de Alecrim. Eles determinaram que a densidades baixas são extraídos em maior quantidade compostos solúveis em dióxido de carbono em estado supercrítico. Já em densidades elevadas ($\cong 900 \text{ Kg/m}^3$) são extraídos os compostos menos solúveis, como por exemplo, os sesquiterpenos e ceras.

5.4.2 Segunda etapa: Comportamento dos compostos químicos ao longo do tempo no processo de extração supercrítica

Uma vez que o processo foi identificado o número de frações e a condição operacional que apresentou a melhor separação, procedeu-se a avaliar o comportamento dos compostos ao longo do processo de extração com a finalidade de encontrar o tempo certo de coleta para cada fração. Vale lembrar que na literatura não foram encontrados estudos científicos parecidos.

Desta maneira, se realizou a construção de uma curva de extração na condição operacional de 80bar e 35°C e desta vez foram coletados 25 pontos. Os primeiros pontos foram coletados de um em um minuto, após isso a cada 5 minutos, logo após 10 e depois após 20 até completar 180 que dura o processo. Assim se obteve a curva que se mostra na Figura 27.

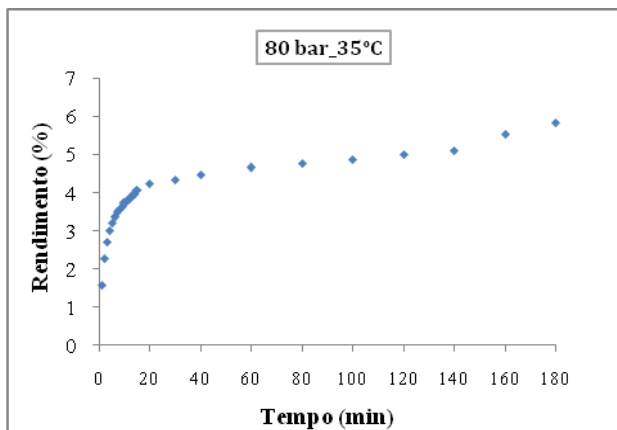


Figura 27: Gráfico do processo e extração na condição de 80bar e 35°C com 25 pontos de coleta.

Cada ponto de coleta foi analisado cromatograficamente, para observar o comportamento dos compostos.

Nas figuras seguintes estão representados os compostos encontrados na Fração 1.

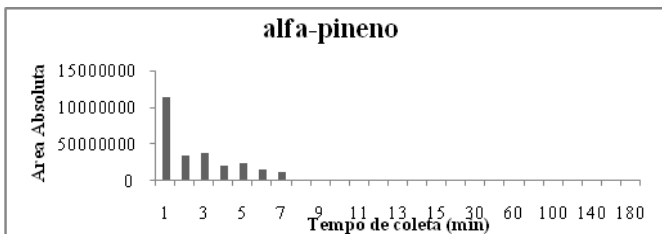


Figura 28: Quantidade de alfa-pineno ao longo do tempo

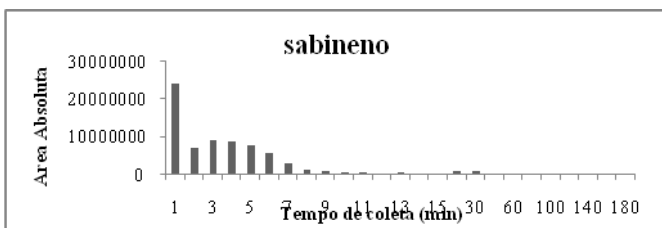


Figura 29: Quantidade de sabineno ao longo do tempo

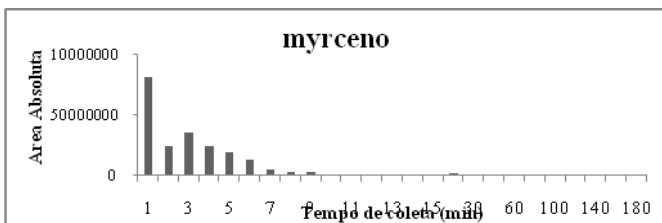


Figura 30: Quantidade de myrceno ao longo do tempo

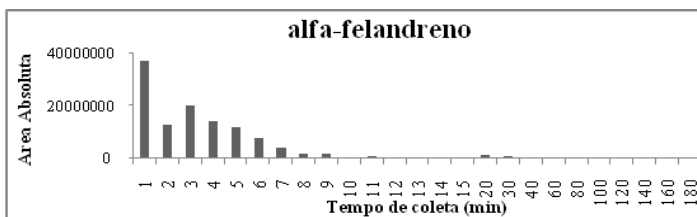


Figura 31: Quantidade de alfa-felandreno ao longo do tempo.

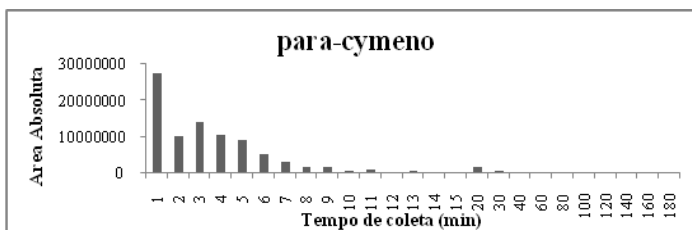


Figura 32: Quantidade de para-cymeno ao longo do tempo.

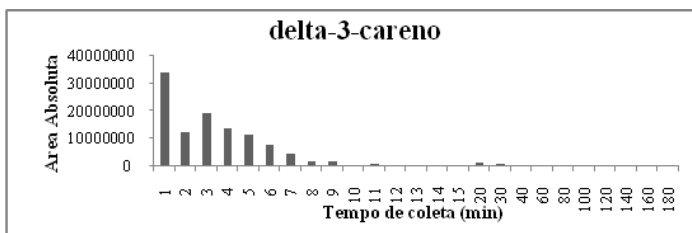


Figura 33: Quantidade de delta-3-careno ao longo do tempo.

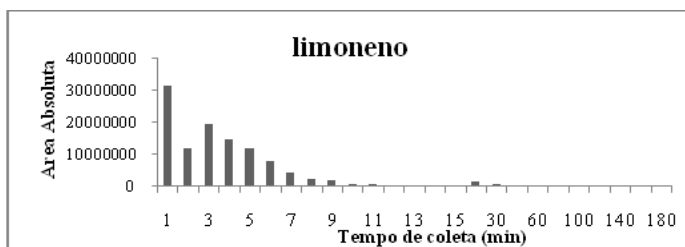


Figura 34: Quantidade de limoneno ao longo do tempo.

Pode-se observar que os 7 primeiros compostos no cromatograma na condição testada apresentaram o mesmo comportamento. Assim, eles terminam de sair quase completamente no minuto 9, em tanto que o ultimo composto da fração 1 (terpinoleno) ainda continua saindo ate o minuto 30.

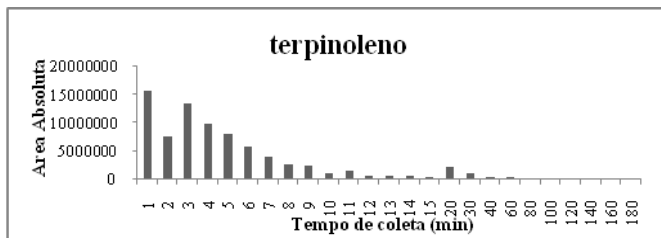


Figura 35: Quantidade de terpinoleno ao longo do tempo de extração.

Com este resultado pode-se afirmar que a primeira fração seria coletada até os 9 minutos na condição de 80 bar e 35°C mesmo que o terpinoleno continue saindo pois seria em concentrações muito baixas. Este comportamento condiz com os trabalhos de desterpenação, que mesmo não utilizando a metodologia descrita, afirmam que os compostos mais leves saem primeiro ao longo do tempo de extração (DIAZ, ESPINOSA, BRIGNOLE, 2005; FORNARI et al., 2012).

Desde o ponto de vista econômico também é uma informação relevante. Segundo Rosa e Meireles (2005), um processo de extração supercrítica não precisa chegar no seu tempo máximo de extração, porque a maior parte do rendimento total se apresenta na primeira fase da curva. Com este tipo de análise se saberia exatamente até que minuto poderia ser realizada a coleta e volver ainda mais seletivo o processo de extração supercrítica sem a necessidade de utilizar cossolvente que modifique a polaridade do CO₂ além de trabalhar em condições supercríticas amenas.

A seguir se apresentam os gráficos dos compostos que conformam a fração 2:

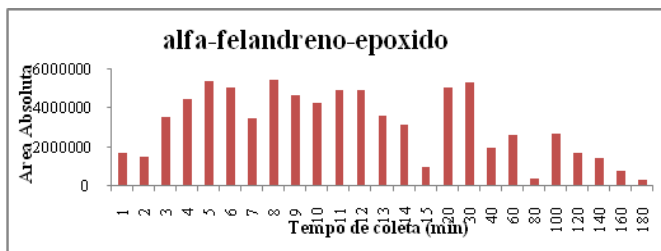


Figura 36: Quantidade de alfa-felandreno-epoxido ao longo do tempo.

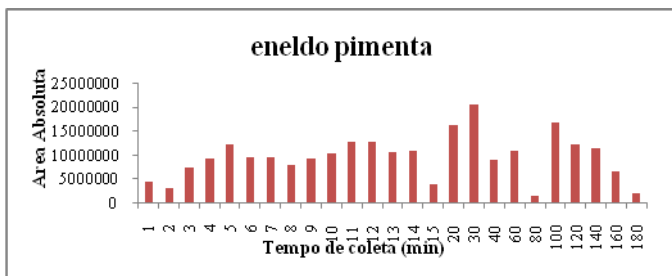


Figura 37: Quantidade de eneldo pimenta ao longo do tempo.

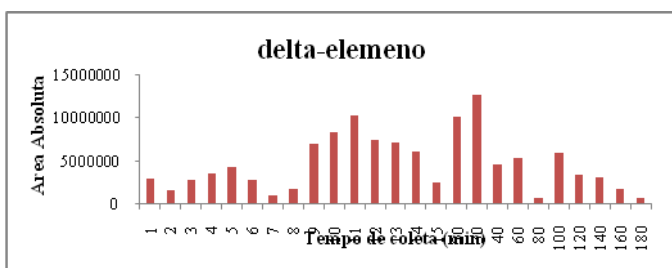


Figura 38: Quantidade de delta-elemeno ao longo do tempo

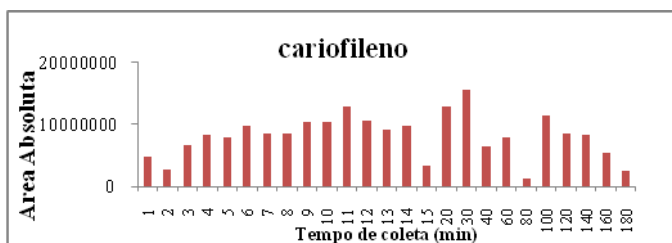


Figura 39: Quantidade de cariofileno ao longo do tempo.

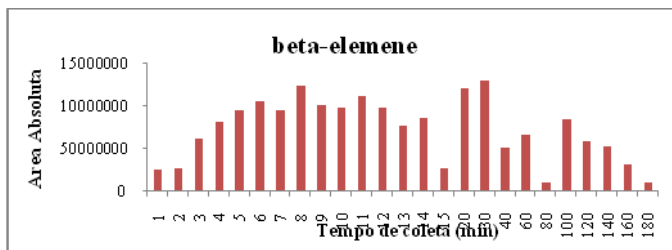


Figura 40: Quantidade de beta-elemene ao longo do tempo.

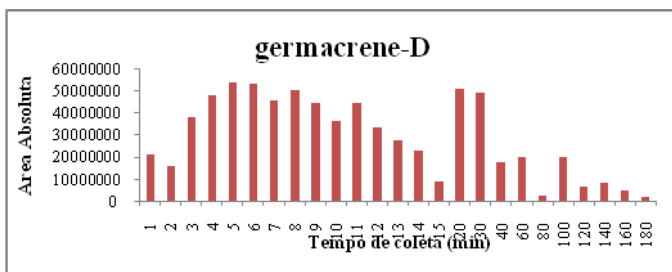


Figura 41: Quantidade de germacrene D ao longo do tempo.

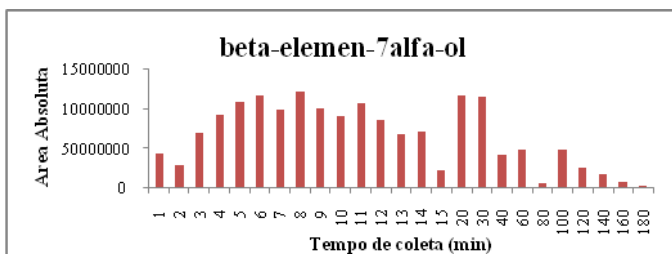


Figura 42: Quantidade de terpinoleno ao longo do tempo.

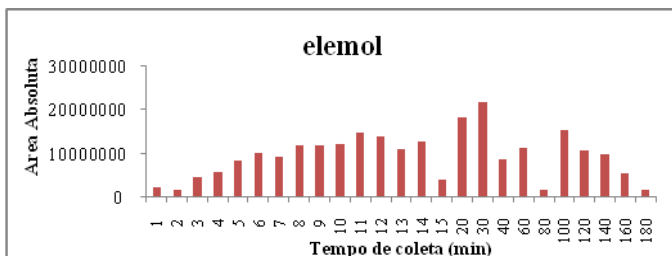


Figura 43: Quantidade de terpinoleno ao longo do tempo.

Pode-se verificar a partir da observação dos gráficos que os compostos químicos que formam a fração 2 apresentam um comportamento similar entre todos.

Os compostos aumentam a medida que avança o tempo de extração, sendo que do minuto 14 ao minuto 15 apresentam uma drástica queda, para depois entre os minutos 20 e 30 obter as maiores quantidades

Pode-se afirmar com este estudo que os compostos mais leves saem quase por completo nos primeiros 9 minutos, e já os compostos pesados vão se incrementando ao longo do tempo para depois diminuir até o final do processo.

5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS FRACIONADOS EM CÉLULAS LEUCÊMICAS.

Avaliou-se a atividade citotóxica dos compostos químicos separados pelo processo de extração supercrítica de *S.terebinthifolius*.

A avaliação da viabilidade celular após a inoculação dos extratos fracionados permitiu verificar o efeito citotóxico em células de Jurkat (Leucemia aguda linfoblástica) e células K562 (Leucemia mieloide crônica agudizada).

A Tabela 16 apresenta a identificação das frações que foram testadas.

Tabela 16: Identificação dos extratos testados.

	<i>Condição operativa</i>	<i>Fração</i>
A	45°C_220 bar	2
B	35°C_80 bar	1
C	35°C_80 bar	2
D	45°C_220 bar	1

No gráfico que se mostra na página seguinte na Figura 44, se observam os resultados de viabilidade celular após serem incubadas por 24 horas com as frações 1 e 2 identificadas na Tabela 16.

Analisando a Figura 44, observa-se que tanto para Leucemia linfoblástica quanto para Leucemia mieloide crônica houve um comportamento semelhante frente a atividade das 4 frações testadas.

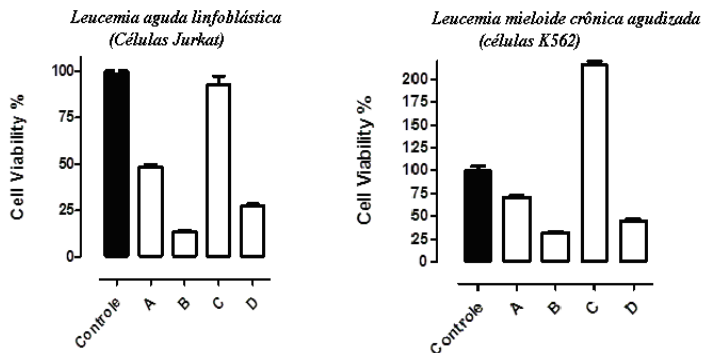


Figura 44: Gráfico da viabilidade celular em células Jurkat e K562 após serem inoculadas com as frações 1 e 2 nas condições experimentais estudadas.

Os resultados evidenciam que as frações A, B e D, possuem uma melhor atividade citotóxica, sendo que os 3 extratos diminuíram a viabilidade das células cancerígenas para os dois tipos de leucemia.

A fração B, identificada como fração 1 na condição de extração de 80 bar e 35 °C, foi a que melhor atividade anticancerígena apresentou. Assim, podem ser destacados nesta fração os compostos majoritários: Alfa-felandreno (23, 3%), delta-3 carene (19,37%), e limonene (21,37%), assim como em menor proporção o alfa pineno e o myrceno. Este resultado biológico é semelhante ao obtido por Bendaoud et al., (2010), que testaram a atividade anticancerígena para células de mama. Porém, eles utilizaram a técnica tradicional de hidrodestilação para a obtenção do óleo essencial de pimenta rosa, o qual possuía como composto majoritário o alfa-felandreno em quase 47%.

Já a fração C, identificada como fração 2 na condição de extração de 80 bar e 35°C, não só não matou as células cancerígenas como estimulou o seu crescimento no caso da Leucemia mieloide crônica agudizada (K562). Nesta fração, é necessário destacar que possui em sua composição química uma expressiva quantidade de Elemol.e beta-elemeno, sendo que, ecompostos majoritários encontrados na fração 1 da mesma condição experimental não tiveram uma presença significativa no extrato. Estes resultados contradizem aos resultados obtidos por Li, et al., (2010) mostraram os efeitos anticancerígenos do Elemol e o beta elemeno e linhagens de células de câncer de próstata, esses resultados não estão de acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa. Porém, estudos mais aprofundados precisam ser realizados,

pois, sabe-se que, nos extratos naturais pode existir uma sinergia entre os compostos que o compõem para evidenciar uma atividade biológica.

A diferença na atividade biológica dos extratos obtidos evidencia o fato dos extratos ter sido fracionado com dióxido de carbono supercrítico. Já que este é um processo muito difícil como é o caso de uma matriz vegetal a qual possui muitos compostos químicos.

Após esta triagem, realizaram-se diferentes incubações dos extratos em várias concentrações diferentes para assim determinar qual IC_{50} .

IC_{50} é uma medida da eficácia de um composto na função biológica ou bioquímica de inibição. Esta medida quantitativa indica a quantidade de um fármaco ou outra substância especial (inibidor) é necessária para inibir o processo biológico, quanto menor for o valor deste parâmetro, maior ser a eficácia (MAIORAL et al., 2013).

A Tabela apresenta os valores de IC_{50} para cada célula após 4 horas de incubação com as 3 frações testadas Tabela 16.

Tabela 16: Valores de IC_{50} encontrados nas linhagens K562, Jurkat após incubação por 24 horas com extratos de *S. terebinthifolius*

Fração	K562 ($\mu\text{g/mL}$)	Jurkat ($\mu\text{g/mL}$)
1	25,96 \pm 1,07	52,57 \pm 0,46
2	1525 \pm 13,01	1644 \pm 36,62
HD	76,28 \pm 2,39	94,83 \pm 1,97

Note-se que em todos os ensaios realizados o IC_{50} da fração 1 se apresenta como muito citotóxico. O óleo essencial como os estudos de Bendaoud et al. (2010), apresenta também uma atividade citotóxica alta, em comparação com a fração 2, porém, a efetividade da fração 1 se revela em praticamente 50% mais efetivo. Este fato desde o ponto de vista econômico é muito relevante, devido que não se precisaria de grandes quantidades de fração 1 abaratanando assim os custos de produção.

Nas figuras 41, 42 e 43 observa-se de maneira clara o efeito citotóxico da fração 1 em ambas linhagens de células.

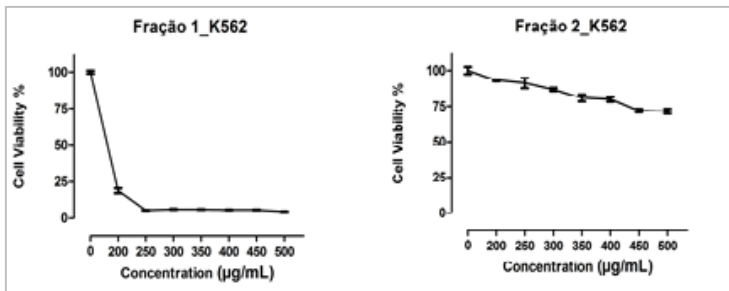


Figura 45: Efeito citotóxico das frações em células K562

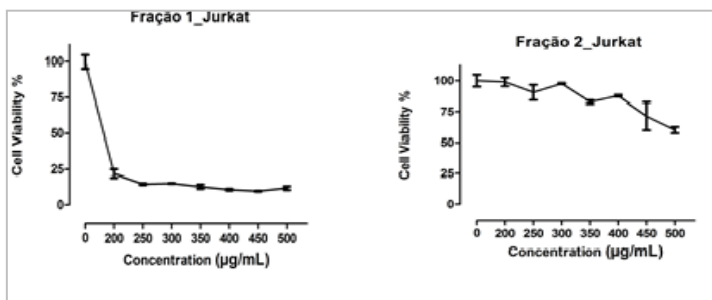


Figura 46: Efeito citotóxico das frações em células Jurkat

O óleo essencial obtido pela técnica tradicional de hidrodestilação apresentou também atividade citotóxica, porém, em menor grau do que a fração 1. Ou seja, se precisaria de uma maior quantidade de extrato para obter a citotoxicidade da fração 1.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho permitem concluir que:

- a) Ao utilizar o processo de extração e separação com dióxido de carbono em estado supercrítico, determinou-se que para a obtenção de frações com composição química diferente, a densidade do solvente deve ser mantida em valores baixos com pressões e temperaturas moderadas, a fim de garantir um bom fracionamento dos extratos. Assim, a condição de 80 bar com 35°C, foi a que apresentou frações mais definidas em sua composição química;
- b) Foram identificados como compostos majoritários na matriz vegetal. Na fração 1: alfa felandrene, delta-3 carene e limonene. Na fração 2: beta-Elemen-7 alfa-ol e elemol;
- c) Ao analisar o comportamento dos compostos ao longo da extração comprovou-se que os compostos mais leves saem nos 10 primeiros minutos na condição de 80 bar e 35°C.
- d) O extrato com maior atividade citotóxica foi o obtido na primeira fração (fração 1) na condição de 80 bar e 35°C. Já a segunda fração (fração 2) obteve um efeito contrário, provocando o aumento nas células de leucemia mieloide agudizada (K562). Estudos sugerem que o elemol (composto majoritário da contido na fração 2) possui atividade citotóxica, porém, a fração que o continha foi a que estimulou o aumento de células cancerosas. As diferenças na atividade biológica das frações comprovam que houve um fracionamento dos extratos. Porém, existem estudos que coincidem com o fato da Fração 2 composta basicamente por sesquiterpenos não agir como citotóxico celular e sim como um estimulador do crescimento celular.
- e) Ao comprovar a efetividade da capacidade inibitoria dos extratos notou-se que tanto a fração 1, como o óleo essencial obtido por hidrodestilação possuem atividade citotóxica, porém a fração 1 é cerca de um 50% mais efetiva.
- f) A separação de compostos em condições moderadas de pressão e temperatura indica a possibilidade de se-obter um processo industrial economicamente viável.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir da avaliação dos resultados apresentados neste trabalho podem ser sugeridos alguns pontos para serem desenvolvidos em trabalhos futuros:

- a) Obtenção de dados de equilíbrio de fases do extrato de pimenta rosa visando aprofundar estudo do fracionamento;
- b) Avaliar a variação de outros parâmetros do processo de extração com CO₂ supercrítico para pimenta rosa, tais como vazão de solvente e tempo de extração;
- c) Avaliar a utilização de cossolvente durante o processo de fracionamento.
- d) Purificação dos extratos (coluna de sílica Flash) para isolamento das substâncias responsáveis pela atividade citotóxica;
- e) Avaliação da atividade citotóxica de cada fração colhida durante o processo de extração;
- f) Avaliar a aplicação comercial/industrial do produto, potenciais mercados e viabilidade do processo (custo de fabricação x qualidade do produto);

8 BIBLIOGRAFIA

AJITH T. A.; JANARDHANAN K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *hellinusrimosus* (Berk) Pilat. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 84. - pp. 157-162, 2003.

ARAUS K., UQUICHE E.; DEL VALLE J.M. Matrix effects in supercritical CO₂ extraction of essential oils from plant material. *Journal of Food Engineering*. 4 : Vol. 92. - pp. 438-447, 2009

BAGETTI M.; FACCO, E. M.; RODRIGUES D. B; VIZZOTTO M.; EMANUELLI T.; Antioxidant capacity: composition of pitanga seeds. *Ciência Rural*. - Santa Maria : 8 : Vol. 39. - pp. 2504-2510, 2009.

BAKKALI, F. S. AVERBECK, D. AVERBECK, AND M. IDAOMAR. Biological effects of essential oils--a review. *Food ; chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 46, n. 2, p. 446–75, fev. 2008.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A D. Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*, v. 78, n. 5, p. 431–41, 22 dez. 2005.

BARBOSA, L.C; DEMUNER, A.J; CLEMENTE, A. D. Seasonal variation in the composition os volatile oils from *Schinus terebenthifoolius* Raddi. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1959–1965, 2007.

BARTH, D.; , CHOUCHE, D.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E.; PERRUT, M. Desorption of lemon peel oil by supercritical carbon dioxide: deterpenation and psoralens elimination. *J. Supercritical Fluids*. Vol. 7. - pp. 177–183, 1994.

BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 6, p. C466–C472, 2010.

BENSEBIA, O.; BARTH D.; BENSEBIA, B.; DAHMANI, A. Supercritical CO₂ extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling. *J. of Supercritical Fluids*, v. 49, p. 161–166, 2009.

BERNA A.; MIRA, B.; BLASCO, M.; BERNA, A.; SUBIRATS, S. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed. J. of Supercritical Fluids. 3 : Vol. 18 . - pp. 227-237. 2000

BLOCK, L. C; SANTOS, A. D. R. S; DE SOUZA, M. M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, M. A.; MONACHE, F.D.; CECHINEL, V. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa* Journal of Ethnopharmacology. 1 : Vol. 61. - pp. 85-89, 1998.

BRANDÃO, H. N., DAVID, J. P., COUTO, R. D., NASCIMENTO, J. A. P., DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. Química Nova, 33(6), 1359-1369, 2010.

BRUNNER, G. Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. New york : Springer, 1994.

BUTLER M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery Journal of Natural Products. 12 : Vol. 67. - pp. 2141-2153, 2004.

CALIXTO J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. J. Ciências e Cultura. 3 : Vol. 55, 2003

CARVALHO M.C.; BARCA, F.N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.R. Research Article evaluation of mutagenic activity in extract of pepper tree bark (*S. terebinthifolius* R.). J Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 42. - pp. 185-191. 2003.

CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A. Fundamentals of Supercritical Fluid Extraction. In: Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists. Campinas-SP, Brazil: Elsevier. v. 2p. 117–133, 2012

CERUKS, M. ROMOFF, P., FÁVERO, O. A., LAGO, J. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (anacardiaceae). Química Nova, v. 30, n. 3, p. 597–599, 2007.

CLEMENTE, A. D. Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta-rosa (schinus. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2006.

Chouchi, D.; Barth, D.; Reverchon, E.; Della Porta, G. Supercritical CO₂ desorption of bergamot peel oil. J. Industrial & Engineering Chemistry Research. Vol. 34. - pp. 4508–4513, 1995.

CHERMAHINI, S. H. MAJID, F. A.; SARMIDI, M. R.; TAGHIZADEH, E.; SALEHNEZHAD, S. Impact of saffron as an anti-cancer and anti-tumor herb. v. 4, n. November, p. 834–840, 2010.

DANIELSKI L, MICHIELIN E.M.Z. ; FERREIRA S.R.S Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. Journal of Food Engineering. - - Vol. 78. - pp. 1054–1059, 2007.

DAUKSAS E.; VENSKUTONIS, P. R.; SIVIK, B.; NILLSON, B. T. Effect of fast CO₂ pressure changes on the yield of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) and celery (*Apium graveolens* L.) extracts. J. Supercrit. Fluids. Vol. 22. - pp. 20–2101, 2002.

DAUKSAS E., VENSKUTONIS P. R.; SIVIK B. Supercritical fluid extraction of borage (*Borago officinalis* L.) seeds with pure CO₂ and its mixture with caprylic acid methyl ester. J. of Supercritical Fluids. 3 : Vol. 22. - pp. 211-219, 2002.

DE LIMA M. R.; DE SOUZA, J.; DOS SANTOS, A.; DE ANDRADE, M.C.; GOULART, A. E.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol . Vol. 105. - pp. 137–47, 2006.

DE MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEGUIN, F.; ESPINDOLA, L. S.; Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 123. - pp. 439-45, - 2009.

DEL VALLE J.M. ; AGUILERA J.M. DEL VALLE J.M. ; AGUILERA J.M.; Rewiew: High pressure CO₂ Extraction. Fundamentals and applications in the food industry. J. Food Science and Technology International. 1 : Vol. 5. - pp. 1-24, 1999.

DE OLIVEIRA, P. F. et al. Supercritical fluid extraction of hernandulcin from *Lippia dulcis* Trev. The Journal of Supercritical Fluids, v. 63, p. 161–168, mar. 2012.

DIAZ, S.Ç ESPINOSA, E.Ç BRIGNOLE, E. A. Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids. J. of Supercritical Fluids, v. 35, p. 49–61, 2005.

DONELIAN, A.; CARLSON, L.H.C.; LOPES, T.J.; MACHADO, R. A. F. Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. The Journal of Supercritical Fluids, v. 48, n. 1, p. 15–20, fev. 2009.

EAHAMBAN, K.; ANTONISAMY, J. M. Preliminary Phytochemical, UV-VIS, HPLC and Anti-bacterial Studies on *Gracilaria corticata* J. Ag. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 2, n. 2, p. S568–S574, fev. 2012.

FELIPE, K. B. Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris*. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VASQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M.R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid review.pdf. Journal of Chromatography A, v. 1250, p. 34–48, 2012.

GAÑÁN, N.; BRIGNOLE, E. A. Supercritical carbon dioxide fractionation of *T. minuta* and *S. officinalis* essential oils: Experiments and process analysis. The Journal of Supercritical Fluids, v. 78, p. 12–20, jun. 2013.

GASPAR F.; LU, T.; MARRIOT, R.; MELLOR, E.; WATKINSON, C.; AL-DURI, B.; SANTOS, R. SEVILLE, J. Solubility of Echium , Borage and Lunaria seeds oils in compressed CO₂. Journal of Chemical & Engineering Data. 1 : Vol. 48. - pp. 107-109, 1999.

GERARD D. Continuous removal of terpenes from essential oils by countercurrent extraction with compressed carbon dioxide. *Chemical Engineering & Technology*. Vol. 56. - pp. 794–795, 1984.

GÜÇLÜ- ÜSTÜNDAG Ö. ; TEMELLI F. Solubility behavior of ternary systems of lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects. *Journal of supercritical fluids*. Vol. 36. - pp. 1-15, 2005.

GUPTA R.B.; SHIM J. J. Solubility in supercritical carbon dioxide. New York : Taylor and Francis Group,. 1 st., 2007.

HERZI, N.; CAMY, S.; BOUAJILA, J.; DESTRAC, P.; ROMDHANE, M.; CONDORET, J. Supercritical CO₂ extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 82, p. 72–82, out. 2013.

HONG, S.-A.; KIM, S. J.; CHUNG, K. Y.; CHUN, M.-S.; LEE, B. G.; KIM, J. Continuous synthesis of lithium iron phosphate (LiFePO₄) nanoparticles in supercritical water: Effect of mixing tee. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 73, p. 70–79, jan. 2013.

KONDO, M.; KODAMA, A; HIROSE, T. Fractional Extraction by Supercritical Carbon Dioxide for the Deterpenation of Bergamot Oil. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 39, n. 12, p. 4745–4748, dez. 2000.

KÖSE, O.; AKMAN U. HORTACSU Ö. Semi-batch deterpenation of origanum oil by dense carbon dioxide. *J. Supercritical Fluids*. Vol. 18. - pp. 49–63., 2000.

KUMAR A. *Medicinal Plants*. - Nova Delhi : International scientific publishing academy. ISBN 81-8293-066-9, 2010.

LENZI, M. Fenologia reprodutiva , morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina , Brasil. v. 17, n. 2, p. 67–89, 2004.

LI Q.; WANG, G.; HUANG, F.; BANDA, M.; REED, E. Antineoplastic effect of beta-elemene on prostate cancer cells and other types of solid tumour cells. *J. Pharm. Pharmacol.* Vol. 62. - pp. 1018–1027, 2010.

LORENZI H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas. São Paulo: Inst. Plantarum de estudos da flora Ltda., - 8586714070, 1998.

MAIORAL, M. F.; GASPAR, P.C.; ROSA SOUZA, G.R.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L.D.; LICÍNIO, M. A.; MORAES, A.C.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; SANTOS-SILVA, M.C. Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. *Biochimie*, v. 95, n. 4, p. 866–74, abr. 2013.

MACHMUDAH, S.; SULASWATTY, A.; SASAKI, M.; GOTO, M.; HIROSE, T. Supercritical CO₂ extraction of nutmeg oil: Experiments and modeling. *J. of Supercritical Fluids.* Vol. 39. - pp. 30–39, 2006.

MARONGIU B.; PORCEDDA, S.; PIRAS, A.; ROSA, A.; DEIANA, M.; DESSÌ, M. A. Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp. *Inodora*. *J. Phytother. Res.* Vol. 18. -789–792, 2004.

MAITRA, A.; HRUBAN, R. H. Pancreatic cancer. *Annual review of pathology*, v. 3, p. 157–88, jan. 2008.

MATOS F.J.A. O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha. 2nd ed. Fortaleza, Brazil: UFC. ISBN 85-7282035-3., 1997.

MICHIELIN E. M. Z.; BRESCIANI, L.; DANIELSKI, L.; YUNES, R.; FERREIRA, S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organics solvents extraction. *The Journal of supercritical Fluids.* Vol. 33. - pp. 131-138. 2005.

MINISTÉRIO DE SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer Estimativa do câncer no Brasil, 2012 Site do Instituto Nacional do Câncer. - 2012. - <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em Março 30, 2012.

MOLERO, A.; GÓMEZ, E.; OSSA MARTINEZ DE, L. A. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. J.* Vol. 88. - pp. 103–109, 2002.

MONDELLO, L.; DUGO, P.; DUGO, G.; LEWIS, A. C.; BARTLE, K. High-performance liquid chromatography coupled on-line with high resolution gas chromatography State of the art *Journal of Chromatography A.* - Vol. 842. - pp. 373–390, 1999.

MOREIRA R. C. [et al.] Abordagem Etnobotânica acerca do Uso de Plantas Mediciniais na Vila Cachoeira , Ilhéus , Bahia, Brasil .*Acta Bonaerense.* . - 3. - pp. 205-212, 2002.

MOUAHID, A.; CRAMPON, C.; TOUDJI, S-A.; BADENS, E. Supercritical CO₂ extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling. *J of Supercritical Fluids*, v. 77, p. 7–16, maio. 2013.

MUKHOPADHYAY M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. - Washington : CRC Press, 2000.

NCI National Cancer institute. EE.UU <http://www.cancer.gov/statistics>. - - acesso em janeiro 2013.

NEWMAN, D.J. CRAGG, J. M.; SNADER, K.M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*: Vol. 66. - pp. 1002-1037, 2003.

NIST , The National Institute of Standars and Technology <http://webbook.nist.gov/chemistry/> [Online]// NIST Chemistry WebBook. - - <http://webbook.nist.gov/chemistry/>, acesso em Janeiro 25, 2013.

NOBILI, S. et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research. The official journal of the Italian Pharmacological Society*, v. 59, n. 6, p. 365–78, jun. 2009.

OCA, E.; IBÁÑEZ, E.; DE MURGA G.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, S. , TABERA, J.; REGLERO G. Supercritical fluid extraction of different

processed of rosemary plant. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47. - p. 1400, 1999.

OSSÉO, L. S.; CAPUTO, G.; GRACIA, I.; REVERCHON, E. Continuous fractionation of used frying oil by supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 81, n. 9, p. 879–885, set. 2004.

ÖZEL M. Z.; BARTLE, K.; CLIFFORD, A.; BURFORD, M. Extraction, solubility and stability of metal complexes using stainless steel supercritical fluid extraction system. *Analytica Chimica Acta.* 417 : Vol. 2. - pp. 177-184, 2000.

PARISOTTO, E. B. et al. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 61, p. 101–107, jan. 2012.

POURMORTAZAVI S. M.; HAJMIRSADEGHI S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis Review [Journal] // *Journal of Chromatography A.* - - Vol. 1163 . - pp. 2–24, 2008.

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

REVERCHON E. Supercritical desorption of limonene and linalool from silica gel: experiments and modelling. *Chemical Engineering Science.* 6 : Vol. 52. - pp. 1019–1027, 1997.

REVERCHON E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *Journal of supercritical Fluids.* Vol. 10, 1997.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 80–4, 22 ago. 2005.

ROTH, B. J.; KRILOV, L.; ADAMS, S.; AGHAJANIAN, C. A.; BACH, P.; BRAITEH, F.; BROSE, M. S.; ELLIS, M.; ERBA, H.; GEORGE, D.; GILBERT, M. R.; JACOBSON, J. O.; LARSEN, E. C.;

LICHTMAN, S. M.; PARTRIDGE, A. H.; PATEL, J. D.; QUINN, D. I.; ROBISON, L. L.; VON ROENN, J. H.; SAMLOWSKI, W.; SCHWARTZ, G. K.; VOGELZANG, N. J. Clinical cancer advances 2012: annual report on progress against cancer from the american society of clinical oncology. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 31, n. 1, p. 131–61, 1 jan. 2013.

SAJFRTOVA, M. Sovova, H.; Karban, J.; Rochova, K.; Pavela, R.; Barnet, M. Effect of separation method on chemical composition and insecticidal activity of Lamiaceae isolates. *Industrial Crops and Products*, v. 47, p. 69–77, maio. 2013.

SALGIN U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. *The Journal of Supercritical Fluids 3* : Vol. 39. - pp. 330-337, 2007.

SALGIN, U.; DÖKER, O.; ÇALIMLI, A. Extraction of sunflower oil with supercritical CO₂: Experiments and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, n. 3, p. 326–331, out. 2006.

SALGIN, U.; SALGIN, S. Effect of main process parameters on extraction of pine kernel lipid using supercritical green solvents: Solubility models and lipid profiles. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 73, p. 18–27, jan. 2013.

SAMUELSSON. Gunnar Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy - Stockholm : [s.n.], 1999.

SÁNCHEZ-PALOMO, E.; ALAÑÓN, M. E.; DÍAZ-MAROTO, M. C.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A.; PÉREZ-COELLO, M. S. Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice. *Talanta*, v. 79, n. 3, p. 871–6, 15 ago. 2009.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R.; ALVIANO, C.; COSTA, S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 96 . - pp. 563-568, 2005.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; ANDRADE, N. J.; NASCIMENTO, E.A.; PINHEIRO, A. L. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* chell. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Vol. 1. - pp. 63-70, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro, RJ : LTC. - 6a edição, 2001.

SOUZA, A. T. CORAZZA, M. L.; CARDOSO-FILHO, L.; GUIRARDELLO, R.; MEIRELES, M. A. Phase Equilibrium Measurements for the System Clove (*Eugenia caryophyllus*) Oil + CO₂. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 49, p. 352–356, 2004.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. *Fisiologia Vegetal - Castello de la Plana* : Publicacions de la Universitá de Jaume I,. - 978-84-8021-601-2, 2006.

TEBERIKLER, L.; KOSEOGLU, S.; AKGERMAN A. Selective extraction of phosphatidylcholine from lecithin by supercritical carbon dioxide/ethanol mixture. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2 : Vol. 78. - pp. 115-120, 2001.

TEMELLI, F.; O'CONNELL, J. P.; CHEN, C. H.; BRADDOC, R. J. Thermodynamic analysis of supercritical carbon dioxide extraction of terpenes from cold-pressed orange oil. *J. Industrial & Engineering Chemistry Research*. Vol. 29. - pp. 618–624, 1990.

TEMELLI, F.; CHEN, C. H.; BRADDOC, R. J. Supercritical fluid extraction in citrus oil processing. *J. Food Technology*. Vol. 6. - pp. 145–150, 1988.

TONTHUBTHIMTHONG, P.; DOUGLAS, P. L.; DOUGLAS, S.; LUEWISUTTHICHAT, W.; TEPPAITOON, W.; PENG SOPA, L. Extraction of nimbin from neem seeds using supercritical CO₂ methanol mixture. *The Journal of Supercritical Fluids*. Vol. 30. - pp. 287-301, - 2004.

UNNATI, S.; SHAH, R.; ACHARYA, S.; ACHARYA, N.

Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 11, n. 1, p. 16–23, 2013.

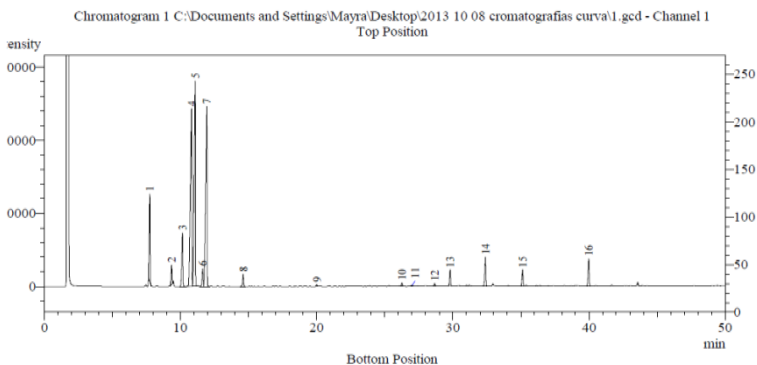
VARONA, S.; MARTIN, A.; COCEROB, M. J.; GAMSEA, T. Supercritical carbon dioxide fractionation of Lavandin essential oil: Experiments and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 45, n. 2, p. 181–188, jun. 2008.

VELAZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *J. Fitoterapia*. Vol. 74. - pp. 91-97, 2003.

WÜST ZIBETTI, A.; AYDIB, A.; LIVIA, M. A.; BOLZAN, A.; BARTH, D. Solvent extraction and purification of rosmarinic acid from supercritical fluid extraction fractionation waste: Economic evaluation and scale-up. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 83, p. 133–145, nov. 2013.

YANG C. S; LAMBERT J.D.; JU J.; LU G.; SANG S. Tea and Cancer Prevention: Molecular Mechanisms and Human Relevance. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 224, n. 3, p. 265–273, 2009.

ANEXO A – CROMATOGRAMAS REALIZADOS PARA ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS NA CONDIÇÃO DE 80 bar E 35°C.



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7,764	alfa-pineno	7,9572	2945130
2	9,363	sabineno	1,6833	623039
3	10,163	myrceno	5,6851	2104195
4	10,829	alfa-felandreno	26,1886	9693003
5	11,094	delta-3-careno	23,5677	8722935
6	11,643	para cymeno	1,9239	712067
7	11,939	limoneno	21,8593	8090614
8	14,617	terpinoleno	1,1018	407783
9	20,014	alfa-felandreno-epoxide	0,1158	42848
10	26,265	eneldo pimenta	0,3182	117776
11	27,034	delta-elemeno	0,2030	75124
12	28,663	cariofileno	0,3289	121734
13	29,810	germacrene-D	1,4519	537374
14	32,392	beta-elemen-7-alfa-ol	3,0061	1112613
15	35,132	elemol	1,6783	621178
16	39,982	beta-elemeno	2,9311	1084867
Total			100,0000	37012280

Figura 47: Composição química no intervalo de coleta de 0 a 1 minuto.

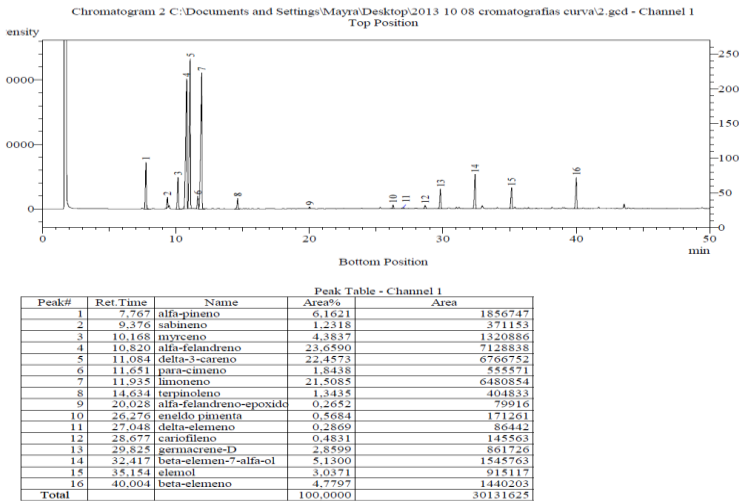


Figura 48: Composição química no intervalo de coleta de 1 a 2 minutos.

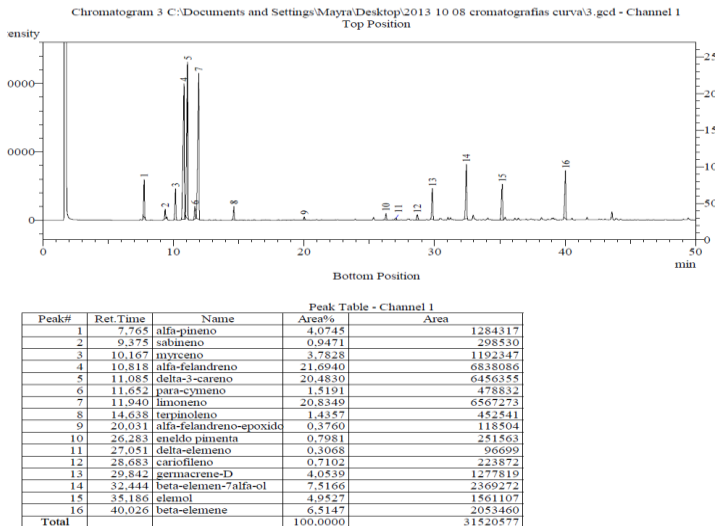
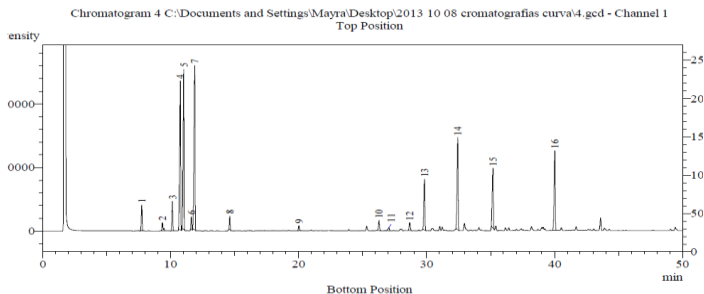
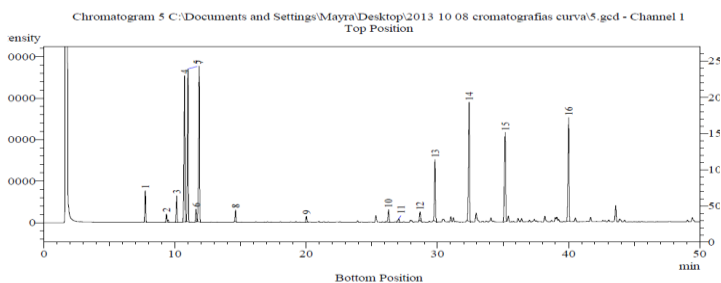


Figura 49: Composição química no intervalo de coleta de 2 a 3 minutos.



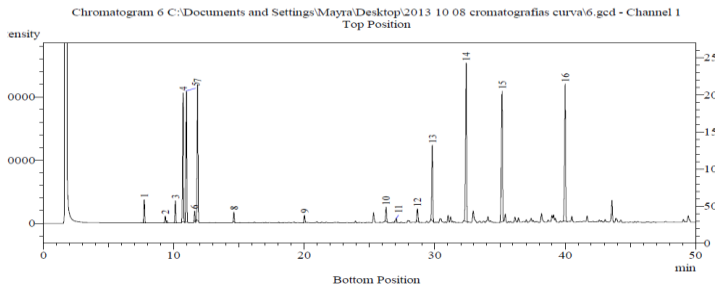
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret Time	Name	Area%	Area
1	7.753	alfa-pineno	2,6950	499298
2	9.268	sabineno	1,0988	203575
3	10.148	myrceno	3,0143	558458
4	10.766	alfa-felandreno	17,6093	3262435
5	11.031	delta-3-careno	16,8388	3119684
6	11.630	para-cimeno	1,3179	244160
7	11.887	limoneno	18,2401	3379312
8	14.629	terpinoleno	1,2264	227221
9	20.030	alfa-felandreno-epoxido	0,5518	102236
10	26.281	eneldo pimentita	1,1765	217974
11	27.053	delta-elemene	0,4480	83009
12	28.680	cariofileno	1,0553	195506
13	29.836	germacreno-D	5,9703	1106110
14	32.434	beta-elemen-7/alfa-ol	11,4638	2123877
15	35.183	elemol	7,1453	1323792
16	40.016	beta-elemene	10,1483	1880166
Total			100,0000	18526813

Figura 50: Composição química no intervalo de coleta de 3 a 4 minutos.



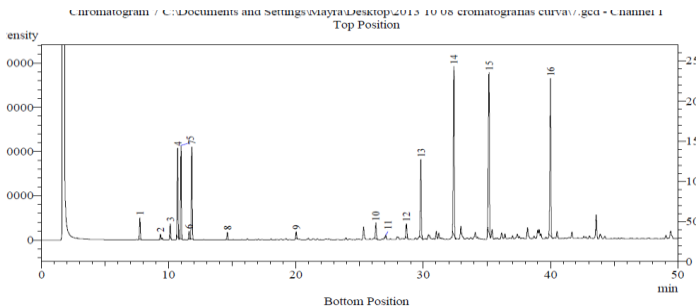
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret Time	Name	Area%	Area
1	7.753	alfa-pineno	3,0179	361621
2	9.267	sabineno	0,9837	117877
3	10.141	myrceno	2,4272	290846
4	10.741	alfa-felandreno	14,8845	1783546
5	11.006	delta-3-careno	14,6302	1753083
6	11.620	para-cimeno	1,1545	138333
7	11.858	limoneno	14,9723	1794067
8	14.627	terpinoleno	1,0028	120161
9	20.029	alfa-felandreno-epoxido	0,6794	81408
10	26.280	eneldo pimentita	1,8512	185879
11	27.053	delta-elemene	0,5480	65670
12	28.682	cariofileno	1,0092	120927
13	29.828	germacreno-D	6,7633	810418
14	32.422	beta-elemen-7/alfa-ol	13,7971	1653252
15	35.174	elemol	10,8976	1269872
16	40.008	beta-elemene	11,9810	1435641
Total			100,0000	11982601

Figura 51: Composição química no intervalo de coleta de 4 a 5 minutos.



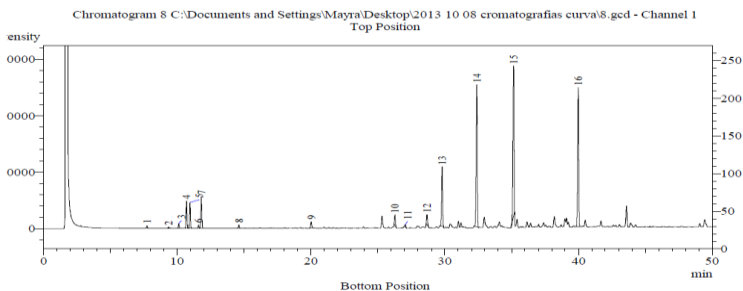
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret Time	Name	Area%	Area
1	7.751	alfa-pineno	2.1769	180845
2	9.366	sabineno	0.8020	66628
3	10.137	myrceno	1.9875	165111
4	10.725	alfa-felandreno	11.5546	959910
5	10.991	delta-3-careno	11.5464	959224
6	11.615	para-cimeno	0.7898	65616
7	11.840	limoneno	11.6328	966405
8	14.625	terpinoleno	0.8230	68374
9	20.028	alfa-felandreno-epoxido	0.7334	60924
10	26.279	eneldo pimentita	1.4038	116621
11	27.053	delta-elemeno	0.4179	34714
12	28.680	cariofileno	1.4116	117266
13	29.824	germacrenea-D	7.6951	639273
14	32.416	beta-elemen-7alfa-ol	16.9459	1407796
15	35.170	elemol	14.8055	1229979
16	39.999	beta-elemene	15.2759	1268895
Total			100,0000	8307581

Figura 52: Composição química no intervalo de coleta de 5 a 6 minutos.



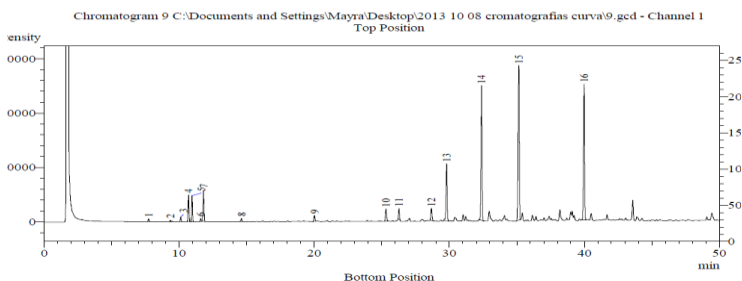
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret Time	Name	Area%	Area
1	7.751	alfa-pineno	2.2174	119661
2	9.366	sabineno	0.5627	30365
3	10.136	myrceno	1.0735	57929
4	10.716	alfa-felandreno	8.4122	453951
5	10.982	delta-3-careno	8.9298	481887
6	11.612	para-cimeno	0.6462	34872
7	11.828	limoneno	8.8675	478523
8	14.625	terpinoleno	0.7511	40530
9	20.029	alfa-felandreno-epoxido	0.6635	35807
10	26.282	eneldo pimentita	1.8426	99434
11	27.053	delta-elemeno	0.1959	10569
12	28.678	cariofileno	1.6528	89192
13	29.822	germacrenea-D	8.7984	474793
14	32.407	beta-elemen-7alfa-ol	19.0352	1027211
15	35.166	elemol	18.2045	982381
16	39.995	beta-elemene	18.1468	979266
Total			100,0000	5396371

Figura 53: Composição química no intervalo de coleta de 6 a 7 minutos.



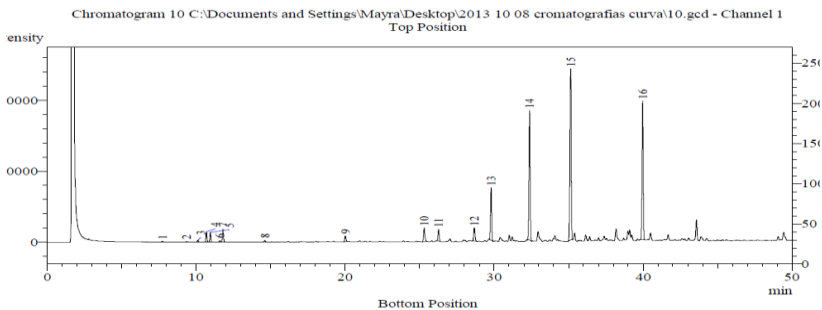
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.751	alfa-pineno	0.3337	9676
2	9.367	sabineno	0.2106	6107
3	10.134	myrceno	0.6790	19686
4	10.707	alfa-felandreno	3.7760	109471
5	10.974	delta-3-careno	3.7317	108188
6	11.610	para-cymeno	0.3638	10548
7	11.821	limoneno	4.5311	131364
8	14.624	terpinoleno	0.5106	14804
9	20.028	alfa-felandreno-epoxide	1.0667	30926
10	26.279	eneldo pimenta	1.5739	45630
11	27.051	delta-elemeno	0.3469	10057
12	28.674	cariofileno	1.6821	48766
13	29.812	germacreno-D	9.8584	285809
14	32.394	beta-elemen-7alfa-ol	23.7105	687404
15	35.154	elemol	23.5794	683604
16	39.981	beta-elemene	24.0454	697114
Total			100.0000	2899154

Figura 55: Composição química no intervalo de coleta de 7 a 8 minutos.



Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.749	alfa-pineno	0.3440	10686
2	9.365	sabineno	0.1653	5135
3	10.133	myrceno	0.6419	19942
4	10.706	alfa-felandreno	3.6370	112994
5	10.971	delta-3-careno	3.6576	113634
6	11.609	para-cymeno	0.3705	11511
7	11.818	limoneno	4.2237	131219
8	14.624	terpinoleno	0.4774	14832
9	20.024	alfa-felandreno-epoxide	1.0089	31345
10	25.319	eneldo pimenta	2.0573	63915
11	26.277	delta-elemeno	1.5407	47865
12	28.677	cariofileno	2.2692	70498
13	29.812	germacreno-D	9.7164	301865
14	32.390	beta-elemen-7alfa-ol	21.8275	678123
15	35.153	elemol	26.2616	815885
16	39.981	beta-elemene	21.8012	677312
Total			100.0000	3106761

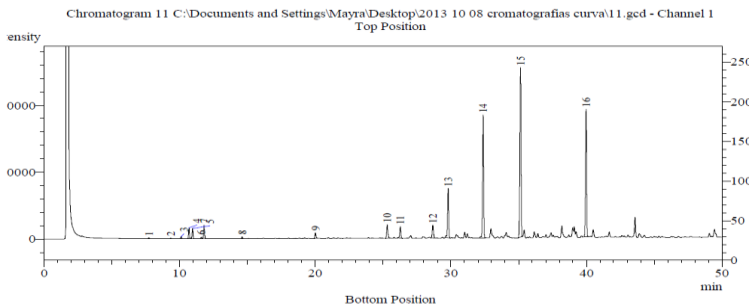
Figura 56: Composição química no intervalo de coleta de 8 a 9 minutos.



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.749	alfa-pineno	0.1210	2687
2	9.365	sabineno	0.0634	1409
3	10.133	myrceno	0.2870	6371
4	10.702	alfa-felandreno	1.5292	33950
5	10.969	delta-3-careno	1.4456	32095
6	11.608	para-cymeno	0.2059	4571
7	11.816	limoneno	1.8691	41498
8	14.622	terpinoleno	0.2411	5352
9	20.023	alfa-felandreno-epoxide	1.0389	23066
10	25.316	eneldo pimenta	2.5491	56595
11	26.277	delta-elemeno	2.0666	45882
12	28.673	cariofileno	2.5905	57512
13	29.806	germacrene-D	9.0010	199837
14	32.383	beta-elemen-7alfa-ol	22.4544	498524
15	35.144	elemol	30.5442	678132
16	39.973	beta-elemene	23.9930	532685
Total			100.0000	2220166

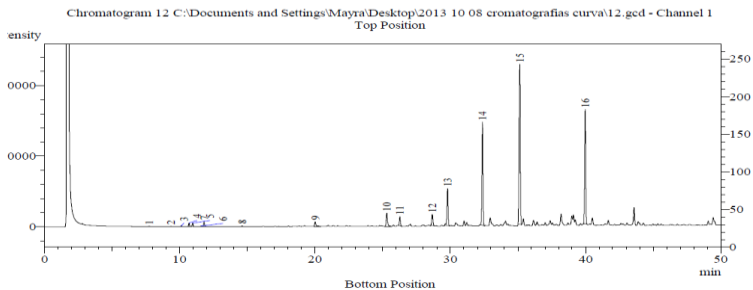
Figura 58: Composição química no intervalo de coleta de 9 a 10 minutos.



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.749	alfa-pineno	0.1256	2897
2	9.362	sabineno	0.0731	1686
3	10.132	myrceno	0.2875	6631
4	10.703	alfa-felandreno	1.6402	37828
5	10.970	delta-3-careno	1.5515	34782
6	11.609	para-cymeno	0.2149	4956
7	11.816	limoneno	1.9077	43996
8	14.622	terpinoleno	0.2923	6740
9	20.025	alfa-felandreno-epoxide	1.0162	23436
10	25.318	eneldo pimenta	2.6518	61158
11	26.278	delta-elemeno	2.1208	48912
12	28.673	cariofileno	2.6954	62163
13	29.808	germacrene-D	9.2485	213297
14	32.385	beta-elemen-7alfa-ol	22.1370	510542
15	35.147	elemol	30.9879	714669
16	39.972	beta-elemene	23.0495	531586
Total			100.0000	2306279

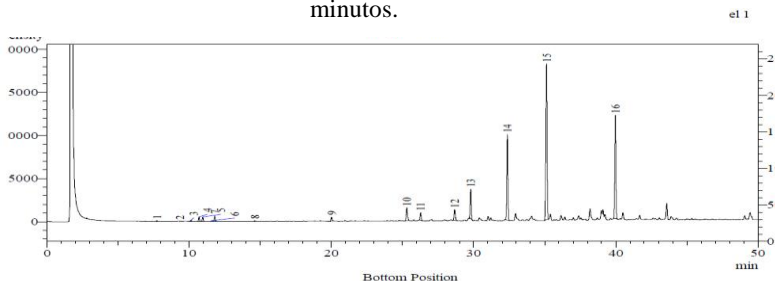
Figura 59: Composição química no intervalo de coleta de 10 a 11 minutos.



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7,752	alfa-pineno	0,0627	1153
2	9,369	sabineno	0,0156	287
3	10,135	myrceno	0,1359	2498
4	10,704	alfa-felandreno	0,6550	12039
5	10,970	delta-3-careno	0,5919	10878
6	11,611	para-cymeno	0,1008	1852
7	11,816	limoneno	0,8134	14951
8	14,624	terpinoleno	0,1139	2093
9	20,025	alfa-felandreno-epoxido	1,2270	22552
10	25,316	eneldo pimenta	3,1998	58810
11	26,276	delta-elemeno	1,8640	34259
12	28,672	cariofileno	2,6667	49011
13	29,806	germacrene-D	8,2489	151610
14	32,380	beta-elemen-7alfa-ol	21,2141	389899
15	35,144	elemol	34,6682	637177
16	39,972	beta-elemene	24,4220	448859
Total			100,0000	1837928

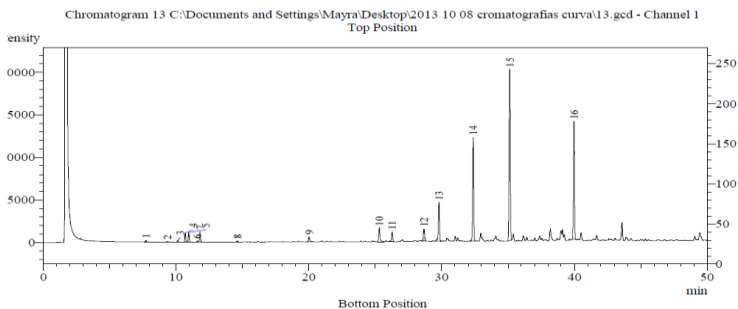
Figura 61: Composição química no intervalo de coleta de 11 a 12 minutos.



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7,750	alfa-pineno	0,1392	1895
2	9,368	sabineno	0,0464	632
3	10,134	myrceno	0,1868	2543
4	10,704	alfa-felandreno	0,9109	12405
5	10,971	delta-3-careno	0,8995	12250
6	11,613	para-cymeno	0,1306	1779
7	11,816	limoneno	1,0566	14389
8	14,625	terpinoleno	0,1174	1599
9	20,024	alfa-felandreno-epoxido	0,8829	12023
10	25,314	eneldo pimenta	3,1521	42927
11	26,278	delta-elemeno	1,7386	23677
12	28,671	cariofileno	2,8257	38481
13	29,805	germacrene-D	6,4507	87848
14	32,377	beta-elemen-7alfa-ol	20,1261	274084
15	35,138	elemol	36,9315	502945
16	39,969	beta-elemene	24,4049	332354
Total			100,0000	1361831

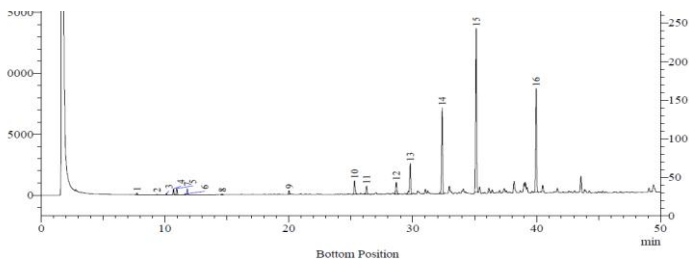
Figura 62: Composição química no intervalo de coleta de 12 a 13 minutos.



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.750	alfa-pineno	0.2790	4647
2	9.367	sabineno	0.0743	1237
3	10.134	myrceno	0.2904	4837
4	10.705	alfa-felandreno	1.5728	26193
5	10.972	delta-3-careno	1.6042	26717
6	11.611	para-cymeno	0.1814	3022
7	11.818	limoneno	1.7150	28561
8	14.624	terpinoleno	0.1761	2932
9	20.025	alfa-felandreno-epoxido	1.0765	17928
10	25.314	eneldo pimenta	3.1679	52759
11	26.277	delta-elemeno	2.1511	35824
12	28.673	cariofileno	2.7386	45609
13	29.807	gamma-curene-D	8.2116	136758
14	32.379	beta-elemen-7alfa-ol	20.3777	339373
15	35.136	elemol	33.6259	560010
16	39.968	beta-elemene	22.7575	379006
Total			100.0000	1665413

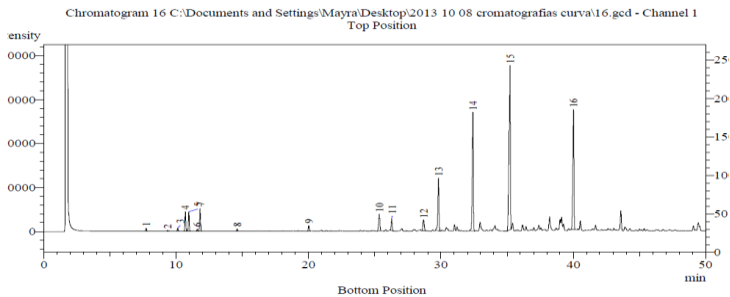
Figura 64: Composição química no intervalo de coleta de 13 a 14 minutos.



Peak Table - Channel 1

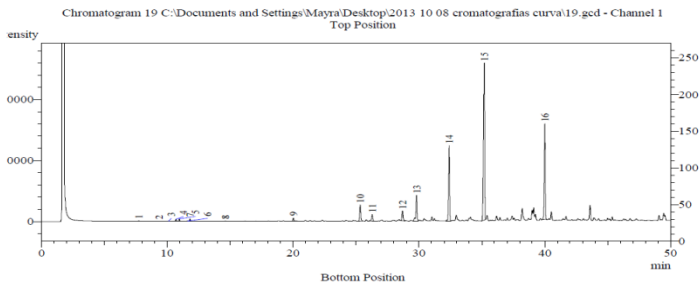
Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.749	alfa-pineno	0.3465	3543
2	9.366	sabineno	0.0887	906
3	10.133	myrceno	0.2470	2526
4	10.703	alfa-felandreno	1.0610	10848
5	10.970	delta-3-careno	1.2135	12407
6	11.610	para-cymeno	0.1603	1639
7	11.816	limoneno	1.1876	12142
8	14.625	terpinoleno	0.1260	1288
9	20.026	alfa-felandreno-epoxide	0.8095	8184
10	25.310	eneldo pimenta	3.4597	35373
11	26.277	delta-elemeno	2.2014	22507
12	28.670	cariofileno	3.0139	30815
13	29.807	gamma-curene-D	7.6619	78337
14	32.374	beta-elemen-7alfa-ol	19.4195	198550
15	35.129	elemol	35.7434	365449
16	39.961	beta-elemene	23.2693	237911
Total			100.0000	1022425

Figura 65: Composição química no intervalo de coleta de 14 a 15 minutos.



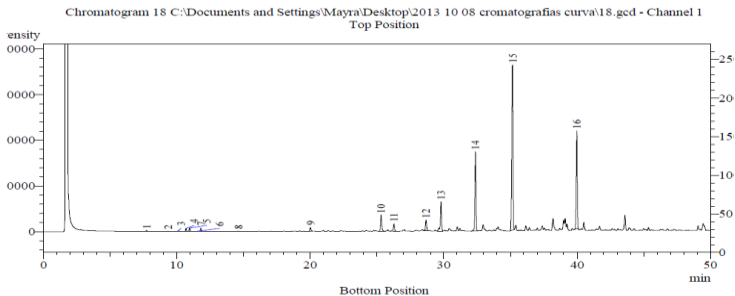
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret.Time	Name	Area%	Area
1	7.749	alfa-pineno	0.4461	34503
2	9.366	sabineno	0.0918	7100
3	10.134	myrceno	0.4357	33699
4	10.708	alfa-felandreno	2.6891	207977
5	10.975	delta-3-careno	2.7076	209407
6	11.610	para-cymeno	0.2995	23165
7	11.821	limoneno	3.0992	239696
8	14.626	terpinoleno	0.3511	27156
9	20.027	alfa-felandreno-epoxido	0.8802	68073
10	25.356	eneldo pimenta	2.8426	219849
11	26.283	delta-elemeno	1.7716	137020
12	28.692	cariofileno	2.2626	174989
13	29.825	germacrene-D	8.8963	688052
14	32.422	beta-elemen-7alfa-ol	20.2795	1568434
15	35.218	elemol	32.1006	2482689
16	40.017	beta-elemene	20.8465	1612290
Total			100.0000	7734099

Figura 67: Composição química no intervalo de coleta de 15 a 20 minutos.



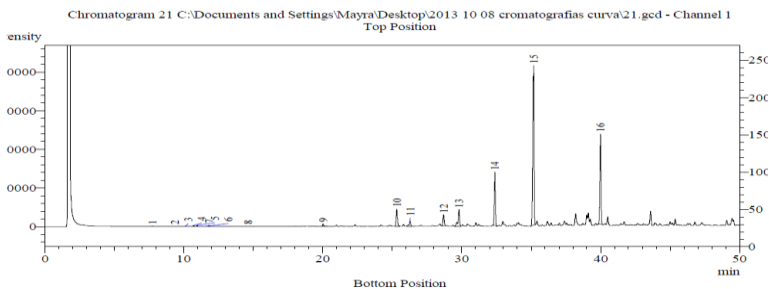
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret.Time	Name	Area%	Area
1	7.752	alfa-pineno	0.1120	4320
2	9.369	sabineno	0.0288	1112
3	10.138	myrceno	0.0835	3222
4	10.709	alfa-felandreno	0.4418	17045
5	10.975	delta-3-careno	0.4431	17097
6	11.618	para-cymeno	0.0673	2595
7	11.822	limoneno	0.4827	18625
8	14.632	terpinoleno	0.0713	2751
9	20.031	alfa-felandreno-epoxido	0.9149	35301
10	25.345	eneldo pimenta	3.9160	151096
11	26.287	delta-elemeno	1.9201	74084
12	28.700	cariofileno	2.8704	110751
13	29.819	germacrene-D	7.0810	273215
14	32.400	beta-elemen-7alfa-ol	17.7191	683679
15	35.190	elemol	40.6249	1567485
16	39.999	beta-elemene	23.2233	896057
Total			100.0000	3858435

Figura 68: Composição química no intervalo de coleta de 20 a 30 minutos.



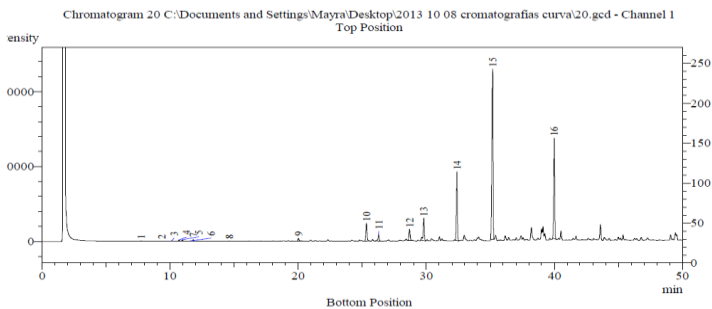
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.748	alfa-pineno	0.1614	4225
2	9.365	sabineno	0.0100	262
3	10.132	myrceno	0.1200	3141
4	10.702	alfa-felandreno	0.6243	16340
5	10.969	delta-3-careno	0.6150	16099
6	11.613	para-cymeno	0.0901	2350
7	11.816	limoneno	0.6797	17790
8	14.625	terpinoleno	0.0918	2402
9	20.022	alfa-felandreno-epoxido	0.8459	22142
10	25.324	eneldo pimenta	3.9892	104416
11	26.278	delta-elemeno	2.0686	54145
12	28.679	cariofileno	2.8681	75073
13	29.810	germacrene-D	7.6877	201224
14	32.386	beta-elemen-7alfa-ol	18.4406	482677
15	35.164	elemol	39.2475	1027554
16	39.983	beta-elemene	22.4501	587627
Total			100.0000	2617476

Figura 69: Composição química no intervalo de coleta de 30 a 40 minutos.



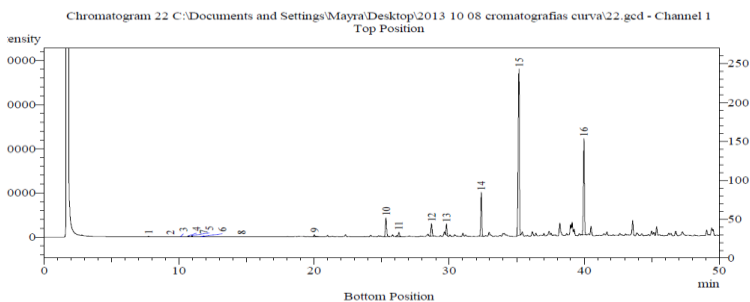
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.751	alfa-pineno	0.0683	1856
2	9.373	sabineno	0.0150	409
3	10.139	myrceno	0.0498	1352
4	10.709	alfa-felandreno	0.3252	6117
5	10.975	delta-3-careno	0.2384	6475
6	11.627	para-cymeno	0.0420	1140
7	11.822	limoneno	0.2257	6131
8	14.633	terpinoleno	0.0336	914
9	20.030	alfa-felandreno-epoxido	0.7687	20877
10	25.338	eneldo pimenta	4.8429	131531
11	26.284	delta-elemeno	1.7483	47485
12	28.699	cariofileno	3.3576	91189
13	29.811	germacrene-D	5.7987	157491
14	32.387	beta-elemen-7alfa-ol	13.9084	377748
15	35.174	elemol	44.5436	1209793
16	39.987	beta-elemene	24.1337	655463
Total			100.0000	2715971

Figura 70: Composição química no intervalo de coleta de 40 a 60 minutos.



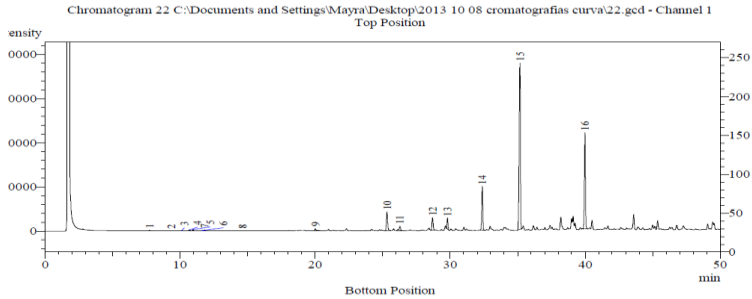
Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.752	alfa-pineno	0,0727	2272
2	9.372	sabineno	0,0168	526
3	10.138	myrceno	0,0653	2041
4	10.707	alfa-felandreno	0,2911	9097
5	10.975	delta-3-careno	0,3016	9424
6	11.623	para-cymeno	0,0486	1520
7	11.821	limoneno	0,3127	9773
8	14.634	terpinoleno	0,0509	1591
9	20.030	alfa-felandreno-epoxido	0,9062	28318
10	25.337	eneldo pimenta	4,4982	140568
11	26.283	delta-elemeno	1,8488	57776
12	28.698	cariofileno	3,0672	95850
13	29.814	germacrene-D	6,1550	192344
14	32.393	beta-elemen-7alfa-ol	16,1741	505442
15	35.181	elemol	42,6763	1333637
16	39.991	beta-elemene	23,5145	734828
Total			100,0000	3125007

Figura 72: Composição química no intervalo de coleta de 60 a 80 minutos.



Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.752	alfa-pineno	0,1288	3005
2	9.374	sabineno	0,0194	451
3	10.138	myrceno	0,0540	1259
4	10.707	alfa-felandreno	0,2523	5885
5	10.974	delta-3-careno	0,2845	6635
6	11.629	para-cymeno	0,0441	1028
7	11.820	limoneno	0,2208	5149
8	14.631	terpinoleno	0,0201	468
9	20.030	alfa-felandreno-epoxido	0,7149	16675
10	25.334	eneldo pimenta	5,3987	125924
11	26.282	delta-elemeno	1,5353	35811
12	28.699	cariofileno	3,7831	88240
13	29.810	germacrene-D	2,7464	64060
14	32.382	beta-elemen-7alfa-ol	11,9266	273521
15	35.171	elemol	47,3293	1103946
16	39.985	beta-elemene	25,7417	600420
Total			100,0000	2332477

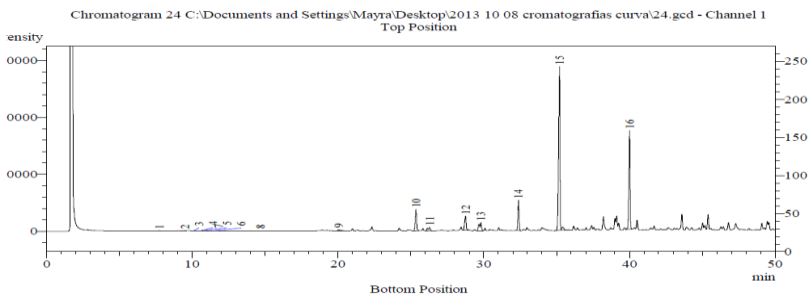
Figura 73: Composição química no intervalo de coleta de 80 a 100 minutos.



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7.752	alfa-píteno	0,1288	3005
2	9,374	sabineno	0,0194	451
3	10,138	myrceno	0,0540	1259
4	10,707	alfa-felandreno	0,2523	5885
5	10,974	delta-3-careno	0,2845	6635
6	11,629	para-cymeno	0,0441	1028
7	11,820	limoneno	0,2208	5149
8	14,631	terpinoleno	0,0201	468
9	20,030	alfa-felandreno-epoxide	0,7149	16675
10	25,334	eneldo pimenta	5,3987	125924
11	26,282	delta-elemeno	1,5553	35811
12	28,699	cariofileno	3,7831	88240
13	29,810	germacrenea-D	2,7464	64060
14	32,382	beta-elemen-7alfa-ol	11,7266	273521
15	35,171	elemol	47,3293	1103946
16	39,985	beta-elemene	25,7417	600420
Total			100,0000	2332477

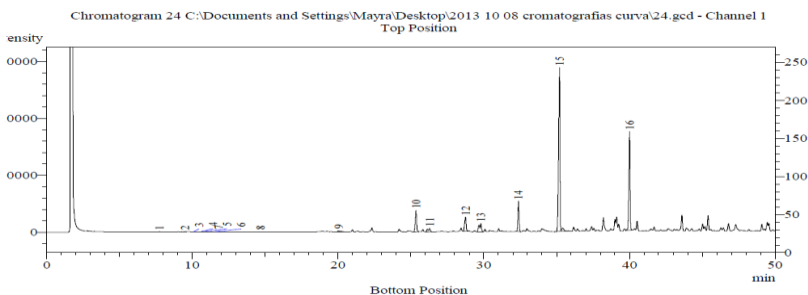
Figura 74: Composição química no intervalo de coleta de 100 a 120 minutos.



Peak Table - Channel 1

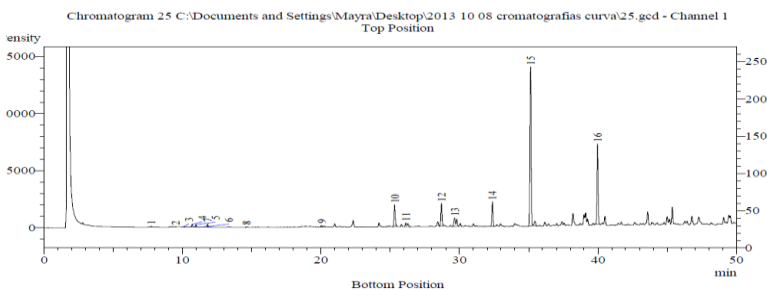
Peak#	Ret Time	Name	Area%	Area
1	7,754	alfa-píteno	0,0705	2696
2	9,503	sabineno	0,0359	1372
3	10,143	myrceno	0,0320	1222
4	10,711	alfa-felandreno	0,1370	5236
5	10,977	delta-3-careno	0,1311	5012
6	11,641	para-cymeno	0,0230	881
7	11,825	limoneno	0,1239	4735
8	14,680	terpinoleno	0,0300	1149
9	20,040	alfa-felandreno-epoxide	0,6317	24149
10	25,361	eneldo pimenta	5,7454	219646
11	26,288	delta-elemeno	1,6132	61671
12	28,760	cariofileno	4,7969	183385
13	29,815	germacrenea-D	4,2212	161373
14	32,388	beta-elemen-7alfa-ol	7,6119	291000
15	35,204	elemol	48,5108	1854550
16	40,008	beta-elemene	26,2856	1004887
Total			100,0000	3822964

Figura 75: Composição química no intervalo de coleta de 120 a 140 minutos.



Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7,754	alfa-pineno	0,0705	2696
2	9,503	sabineno	0,0359	1372
3	10,143	myrceno	0,0320	1222
4	10,711	alfa-felandreno	0,1370	5236
5	10,977	delta-3-careno	0,1311	5012
6	11,641	para-cymeno	0,0230	881
7	11,825	limoneno	0,1239	4735
8	14,680	terpinoleno	0,0300	1149
9	20,040	alfa-felandreno-epoxido	0,6317	24149
10	25,361	eneldo pimenta	5,7454	219646
11	26,288	delta-elemeno	1,6132	61671
12	28,760	cariofileno	4,7969	183385
13	29,815	germacrene-D	4,2212	161373
14	32,388	beta-elemen-7alfa-ol	7,6119	291000
15	35,204	elemol	48,8108	1854550
16	40,008	beta-elemene	26,2856	1004887
Total			100,0000	3822964

Figura 77: Composição química no intervalo de coleta de 140 a 160 minutos.



Peak Table - Channel 1				
Peak#	Ret. Time	Name	Area%	Area
1	7,754	alfa-pineno	0,1161	1374
2	9,517	sabineno	0,0165	140
3	10,143	myrceno	0,1122	957
4	10,712	alfa-felandreno	0,5081	4334
5	10,978	delta-3-careno	0,5582	4761
6	11,627	para-cymeno	0,0868	741
7	11,825	limoneno	0,6639	5662
8	14,636	terpinoleno	0,0706	602
9	20,042	alfa-felandreno-epoxido	0,6592	5622
10	25,326	eneldo pimenta	6,0973	52001
11	26,132	delta-elemeno	1,9422	16564
12	28,702	cariofileno	6,9790	59520
13	29,653	germacrene-D	5,1956	44311
14	32,382	beta-elemen-7alfa-ol	7,0563	60180
15	35,141	elemol	46,8405	399480
16	39,973	beta-elemene	23,0523	196602
Total			100,0000	852851

Figura 76: Composição química no intervalo de coleta de 160 a 180 minutos.