UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA - DEPARTAMENTO ENGENHARIA DE QUÍMICA

LUANA LEMOS CARDOSO BRASIL

Extração supercrítica, caracterização e avaliação da ação antiproliferativa em células tumorais *in vitro* de compostos bioativos da Sucupira (*Pterodon pubescens* Benth)

SÃO PAULO

2021

LUANA LEMOS CARDOSO BRASIL

Extração supercrítica, caracterização e avaliação da ação antiproliferativa em células tumorais *in vitro* de compostos bioativos da Sucupira (*Pterodon pubescens* Benth)

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo referente à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Luis A. Follegatti Romero

Coorientadora: Prof. Dra. Mary Ann Foglio

SÃO PAULO

2021

Agência de fomento e nº do processo: FAPESP, 2018/20252-8

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 12 de maio de 2021.

Assinatura do autor

Assinatura do orientador

Luis Alberto Follegatti Romero

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catlogação na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Departamento de Engenharia Química da Universidade de São Paulo

Cardoso-Brasil, Luana Lemos

Extração supercrítica, caracterização e avaliação da ação antiproliferativa em células tumorais humanas *in vitro* de compostos bioativos da Sucupira (*Pterodon pubescens* Benth) / Luana Lemos Cardoso Brasil – São Paulo, 2021.

104 p.

Orientador: Luis Alberto Follegatti Romero.

Coorientadora: Mary Ann Foglio.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

Versão corrigida

1. Extração Supercrítica. 2. *Pterodon pubescens* Benth 3. Ação Antiproliferativa *in vitro*. 4. Biocompostos. I. Follegatti–Romero, Luis Alberto II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química IV. Título.

Nome: CARDOSO-BRASIL, Luana Lemos

Título: Extração supercrítica, caracterização e avaliação da ação antiproliferativa em células tumorais humanas *in vitro* de compostos bioativos da Sucupira (*Pterodon pubescens* Benth).

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – Departamento de Engenharia Química, referente à obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

**Dedico este trabalho ao meu marido Samuel: saiba, você foi o meu sol nessa jornada e
sempre será.**

AGRADECIMENTOS

De tão longa a caminhada a chegada não era vista sob os olhos. De tão tortuoso o caminho a realidade se fez quase inacreditável, mas, para os que tem a “estranha mania de ter fé na vida, se mistura a dor e a alegria” e o coração se enche de agradecimento a todos que fizeram parte desse trabalho. Agradeço a mim, sim, a mim mesma. À minha perseverança e alma de Maria por não desistir fácil frente aos obstáculos da vida, que não foram poucos. Deus sempre renovou a minha esperança através de pequenas coisas, de pessoas, de flores e céus que apareciam no caminho. Agradeço ao dom da vida. Agradeço ao meu marido Samuel, companheiro de alma com quem aprendi e aprendo tantas coisas, como amo e sou grata. Agradeço ao meu pequeno Tito por me trazer tanta doçura e alegria. Gostaria de agradecer aos que me presenteavam com incentivos e orações, meu muito obrigada Vera Brasil, Sidney Brasil e toda minha família.

Gostaria de agradecer ao meu colega Mateus Buriti por compartilhar as angústias, extrações supercríticas e risadas de desespero. Gostaria de agradecer à Denise e Paulo, vocês são verdadeiros mestres na vida, que não precisam de títulos pois ensinam com a alma, ajudando sempre que necessário. Vocês fazem a diferença.

Gostaria de agradecer à professora Dra. Mary Ann Foglio por toda a acolhida em seu grupo de pesquisa, rico de pessoas colaborativas e humanas (Núbia, Kaio, Aline, Dayana, Camila e todos os outros que são igualmente queridos). Me trouxe esperança quanto ao mundo acadêmico Mary. Obrigada pelas orientações, explicações e todo suporte durante essa jornada. Você é uma referência para mim de pesquisadora, profissional e pessoa, sempre buscando fazer o melhor e de uma forma muito humana, acolhendo a todos. Minha imensa e eterna gratidão. Gostaria de agradecer em especial à Ilza, que me auxiliou, me ensinou e sempre me recebeu com um abraço bem caloroso. Muito obrigada Ilzinha, sinto a poesia da Cora em você. Meu agradecimento também à Dra. Ana Lucia Ruiz, por todos os ensinamentos, explicações e entusiasmo ao falar das vastas possibilidades do mundo de análise de células. Minha eterna gratidão a vocês e a todos que fazem parte desse grupo maravilhoso.

Agradeço ao meu orientador, Luis Alberto Follegatti Romero, pelas orientações, ajuda e todo acompanhamento durante essa jornada. Minha eterna gratidão.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Guzzo da Silva pelas sugestões e colaborações na qualificação deste trabalho.

Agradeço às instituições USP e UNICAMP por todo suporte e as agências de fomento FAPESP e CNPQ.

“Já podaram seus momentos
Desviaram seu destino
Seu sorriso de menina
Quantas vezes se escondeu
Mas renova-se a esperança
Nova aurora a cada dia
E há que se cuidar do broto
Para que a vida nos dê
Flor, flor e fruto
Coração de estudante
Há que se cuidar da vida
Há que se cuidar do Mundo
Tomar conta da amizade
Alegria e muito sonho
Espalhados no caminho
Verdes, planta e sentimento
Folhas, Coração
Juventude e Fé”

[Milton Nascimento, Wagner Tiso]

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo o estudo da extração supercrítica dos compostos bioativos dos frutos da Sucupira (*Pterodon pubescens* Benth), utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente. Proveniente do Cerrado brasileiro, a Sucupira é popularmente conhecida como analgésico e anti-inflamatório natural. Para o estudo, foi realizado um delineamento experimental 2^3 para análise da influência da temperatura (32 °C a 52 °C), pressão (200 bar a 300 bar) e da razão S/F (30 a 90) no rendimento do processo. Esses dados foram comparados com a extração em aparelho Soxhlet, utilizando hexano como solvente durante 8 h, que apresentou rendimento mássico de $13,05 \pm 0,29\%$. A extração supercrítica apresentou rendimento ótimo de 20,9% (temperatura de 52 °C, pressão de 300 bar e S/F= 90), sendo a temperatura a variável independente de maior efeito no rendimento mássico. A análise em HPLC demonstrou, quantitativamente, que as amostras resultantes da extração supercrítica apresentaram maior concentração do diterpeno 404 (6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapan-17 β -oato e 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β -oato) e do diterpeno 362 (éster 6 α -7 β -dihidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila), quando comparadas ao extrato hexânico. O ensaio 8, de maior rendimento, apresentou uma concentração de 0,14 mg do diterpeno 404 por mg de droga vegetal e de 0,02 mg do diterpeno 362 por mg de droga vegetal. Em todas as amostras foi identificada a presença do sesquiterpeno β -cariofileno, presente em óleos essenciais, evidenciando que o extrato obtido é uma mistura de óleo essencial e óleo fixo. Por fim, o teste antiproliferativo realizado em células tumorais humanas *in vitro* indicaram maior seletividade do extrato supercrítico para a linhagem 786-0 (Rim), sendo que os ensaios 2 (T=52 °C, P=200 bar e S/F=30), 7 (T=32 °C, P= 300 bar e S/F= 90), 8 (T=52 °C, P=300 bar e S/F=90) e 9 (T=42 °C, P=250 bar e S/F= 60) também mostraram-se seletivos e dependentes da concentração para as linhagens PC-3 (Próstata), MCF-7 (Mama) e NCI/ADR (Ovário). O ensaio 2 (T=52 °C, P=200 bar e S/F= 30), apresentou atividade antiproliferativa moderada para a linhagem 786-0 (Rim), com TGI (*Total Growth Inhibition*) igual a 14 $\mu\text{g/mL}$. Dessa forma, evidenciou-se que o extrato supercrítico da Sucupira apresentou maior concentração de diterpenos vouacapanos quando comparado ao extrato hexânico, juntamente com uma seletividade diferenciada no teste antiproliferativo *in vitro* para a linhagem 786-0 (Rim), quando comparado aos estudos reportados na literatura que utilizaram métodos convencionais de extração.

Palavras-chave: Extração supercrítica, *Pterodon pubescens* Benth, Ação antiproliferativa *in vitro*, Biocompostos.

ABSTRACT

This work aims the supercritical extraction study of bioactive compounds from Sucupira fruits (*Pterodon pubescens* Benth), using supercritical carbon dioxide as extraction solvent. Coming from Brazilian Cerrado, Sucupira is popularly considered a natural analgesic and anti-inflammatory. With the purpose of investigating the operational variables, an experimental design 2^3 was carried out to survey the influence of temperature (32 °C to 52 °C), pressure (200 bar to 300 bar) and S/F rate (30 to 90) on process yield. These data were compared with Soxhlet apparatus extraction, using hexane as solvent for 8 h, which showed a mass yield of $13.05 \pm 0.29\%$. The top level of experimental design for supercritical extractions demonstrated 20.9% yield for a temperature of 52 °C, pressure of 300 bar and S/F= 90, being the temperature the independent variable with the greatest effect on mass yield. High liquid pressure chromatography (HPLC) analysis showed quantitatively that the samples resulting from the supercritical extraction showed a higher concentration of 404 diterpene (6 α -acetoxy-7 β -hydroxy-vouacapan-17 β -oate methyl ester and 6 α -hydroxy-7 β -acetoxy-vouacapan-17 β -oate methyl ester) and 362 diterpene (6 α -7 β -dihydroxy-vouacapan-17 β -oate methyl ester), when compared to the hexane extract. For the sample 8, of higher yield, a concentration of 0.14 mg of 404 diterpene per mg of plant drug and 0.02 mg of 362 diterpene per mg of drug was presented. Furthermore, all samples presented the sesquiterpene β -caryophyllene, quite common in essential oils, showing that the extract obtained was a mixture of essential oil and fix oil. Emphasis was placed on antiproliferative *in vitro* test, performed against a panel of human tumor cells line, and indicated greater selectivity of the supercritical extract when compare to hexane extract. The samples 2 (T=52 °C, P=200 bar and S/F=30), 7 (T=32 °C, P=300 bar and S/F=90), 8 (T=52 °C, P=300 bar and S/F=90) and 9 (T=42 °C, P=250 bar and S/F= 60) were also selective and concentration dependent way for PC-3 (Prostate), MCF-7 (Breast) and NCI-ADR/RES (Multidrug-resistant ovarian). The sample 2 (T=52 °C, P=200 bar and S/F=30), demonstrated moderate antiproliferative activity for human cancer cells 786-0 (Kidney), with TGI (*Total Growth Inhibition*) equal to 14 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, it was evidenced that the supercritical extract of Sucupira presented a higher concentration of vouacapan diterpenes when compared to the hexane extract. Moreover, the supercritical extract presents a differentiated selectivity in the *in vitro* antiproliferative test for the 786-0 (Kidney) strain, when compared to the studies reported in literature that used conventional extraction methods.

Keywords: Supercritical extraction, *Pterodon pubescens* Benth, *in vitro* antiproliferative action, Biocompounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore da Sucupira (<i>Pterodon pubescens</i>) em área do Cerrado brasileiro.....	7
Figura 2: Esquema geral das rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.	17
Figura 3: Principais monoterpenos encontrados na literatura.	19
Figura 4: Representação gráfica da origem das drogas anticâncer realizadas por Cragg & Newmann (2020) no período de 1981 a 2019, totalizando 247.	21
Figura 5: (a) Vapor proveniente de fonte externa, (b) Vapor gerado	22
Figura 6: Gráfico do volume específico (log) versus pressão para um composto puro.	24
Figura 7: Diagrama de uma unidade de extração supercrítica.	27
Figura 8: Diagrama pressão-temperatura do dióxido de carbono e linhas de densidade.	28
Figura 9: Curva global de extração para o sistema cravo-da-índia + CO ₂ a 100 bar	29
Figura 10: Fluxograma experimental das etapas realizadas no presente trabalho.....	31
Figura 11: Frutos coletados da Sucupira (<i>Pterodon pubescens</i>).	32
Figura 12: Esquema do sistema de extração supercrítica.	35
Figura 13: Equipamento de extração supercrítica do laboratório LASPE-USP.....	37
Figura 14: Esquema da placa de CCD para análise de densitometria.	41
Figura 15: Equipamento de HPLC/UV-vis Shimadzu utilizado para análise	42
Figura 16: Representação da placa utilizada nos testes de atividade antiproliferativa.....	46
Figura 17: Placas cromatográficas com os padrões <i>m/z</i> 362 (362), <i>m/z</i> 404	51
Figura 18: Curva padrão do diterpeno 404 em placa cromatográfica por técnica	52
Figura 19: Curva de calibração da área (cm ²) versus a massa do padrão 404 para análise de densitometria em placa cromatográfica.	52
Figura 20: Identificação do padrão de diterpeno vouacapano 404 com tempo de retenção em torno de 12 min.....	54
Figura 21: Identificação do padrão de diterpeno vouacapano 362 com tempo de retenção em torno de 8 min.....	55
Figura 22: Identificação do padrão de β -cariofileno com tempo de retenção em torno de 13,5 min.	55
Figura 23: Cromatograma do ensaio 9 (T=42 °C, P=250 bar, S/F=60) de extração supercrítica indicando a presença dos diterpenos 404 (12 min), 362 (8 min) e β -cariofileno (13,5 min). ..	56

Figura 24: Cromatograma do ensaio 8 (T=52 °C, P=300 bar, S/F=90) de extração supercrítica (maior rendimento: 20,9 %) indicando a presença dos diterpenos 404 (12 min), 362 (8 min) e β -cariofileno (13,5 min).....	57
Figura 25: Rendimento mássico em função das variáveis de processo da extração supercrítica, com desvio padrão de 1,65 pontos percentuais.	60
Figura 26: Gráfico de Pareto para as variáveis de processo e suas possíveis interações em um nível de significância de 5%.....	62
Figura 27: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P.pubescens</i> (ensaio 2) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.	64
Figura 28: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P.pubescens</i> (ensaio 8) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.	65
Figura 29: Diferencial citotóxico para as linhagens celulares em relação à média (TGI).....	69
Figura 30: Placa com as amostras e o radical DPPH para análise de poder antioxidante.	71
Figura 31: Curva de calibração Trolox® (% de inibição versus conc. de Trolox®) utilizada na estimativa do equivalente em Trolox® das amostras analisadas.	72
Figura 32: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 1.	86
Figura 33: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 2.	87
Figura 34: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 3.	87
Figura 35: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 4.	88
Figura 36: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 5.	88
Figura 37: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 6.	89
Figura 38: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 7.	89
Figura 39: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 8.	90
Figura 40: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 9 (Ponto Central).....	90
Figura 41: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 10 (Ponto Central).....	91
Figura 42: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 11 (Ponto Central).....	91
Figura 43: Cromatograma HPLC/UV-vis da amostra produzida em sistema Soxhlet.	92
Figura 44: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (ensaio 1) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento	93
Figura 45: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (ensaio 2) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.	94
Figura 46: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (ensaio 3) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.	95

Figura 47: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (ensaio 4) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.	96
Figura 48: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (ensaio 5) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.	97
Figura 49: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (ensaio 6) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.	98
Figura 50: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (ensaio 7) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.	99
Figura 51: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (ensaio 8) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento	100
Figura 52: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (ensaio 9 - Ponto Central) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento	101
Figura 53: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> (amostra Soxhlet) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.	102
Figura 54: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. pubescens</i> em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento, para a amostra de Doxorubicina (controle).	103
Figura 55: Aparelhagem Soxhlet utilizada para extração com solvente orgânico.	104
Figura 56: Aparelhagem da destilação à vácuo.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos realizados com a Sucupira para identificação dos efeitos farmacológicos apresentados.....	14
Tabela 2: Propriedades de substâncias presentes em alguns óleos essenciais.....	17
Tabela 3: Propriedades medicinais ou terapêuticas de algumas espécies botânicas.	18
Tabela 4: Valores de massa específica, difusividade e viscosidade conforme estado físico....	23
Tabela 5: Propriedades de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos.	25
Tabela 6: Representação do delineamento fatorial 2 ³ com triplicata no ponto central, com as variáveis temperatura (32-52 °C), pressão (200-300 bar) e razão S/F (30-90) nos níveis a serem analisados (alto (+1), baixo (-1) e ponto central (0)).....	38
Tabela 7: Linhagens de células utilizadas, órgão e origem embrionária.....	45

Tabela 8: Especificações das faixas de diâmetro médio da partícula de <i>Pterodon pubescens</i> e distribuição granulométrica do seu peneiramento.	48
Tabela 9: Conteúdo de umidade, massa específica real, massa específica aparente, diâmetro médio e porosidade do leito.....	49
Tabela 10: Estimativa das concentrações do diterpeno 404 por amostra via densitometria.....	53
Tabela 11: Resultado das variáveis resposta do delineamento experimental.....	58
Tabela 12: Coeficientes da regressão linear, erro padrão, t_{calc} e p-valor para o planejamento experimental realizado em relação à resposta rendimento.	61
Tabela 13: Resultado da ANOVA para o modelo obtido através da regressão linear.....	62
Tabela 14: Concentração efetiva TGI (<i>Total growth inhibition</i>) das amostras de extração supercrítica, em sistema Soxhlet e Doxorubicina para as linhagens de células tumorais e não tumoral estudadas.	68
Tabela 15: Resultados do método DPPH para os ensaios 6, 8, 9 (PC) e produzido em sistema Soxhlet.	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estrutura de algumas substâncias encontradas nas folhas de <i>Pterodon pubescens</i> . ..	9
Quadro 2: Estrutura de algumas substâncias encontradas nos frutos e sementes de <i>Pterodon pubescens</i>	12
Quadro 3: Principais efeitos observados no teste antiproliferativo para as amostras de extração supercrítica e em sistema Soxhlet nas linhagens de células humanas tumorais e não tumoral <i>in vitro</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>P. pubescens</i> :	<i>Pterodon pubescens</i>
CCD:	Cromatografia de camada delgada
HPLC:	<i>High Liquid Pressure Chromatography</i>
DPPH:	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
PI:	Potencial de Inibição
DMSO:	Dimetil sulfóxido

TCA:	Ácido Tricloroacético
SRB:	Sulforrodamina B
TGI:	Concentração que inibe totalmente o crescimento celular
LC ₅₀ :	Concentração na qual ocorre 50% de morte celular
PC:	Ponto central do delineamento experimental
CO ₂ :	Dióxido de carbono
404:	Isômeros éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila (404 m/z) e éster 6 β -acetoxi-7 α -hidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila (404 m/z).
362: (362 m/z)	Éster 6 α -7 β -dihidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila

LISTA DE SÍMBOLOS

T _c	Temperatura crítica	[°C]
P _c :	Pressão crítica	[bar]
S/F	Razão massa de CO ₂ /massa de matéria-prima	[-]
D _m	Diâmetro médio da partícula	[mm]
+d _i	Abertura nominal da i-ésima peneira	[mm]
-d _{i-1}	Abertura de uma peneira maior que a i-ésima peneira	[mm]
w _i	Massa do material retido na i-ésima peneira	[g]
ρ_{ap}	Massa específica aparente do leito de partículas	[g/mL]
ρ_r	Massa específica real da partícula	[g/mL]
ε	Porosidade do leito de extração supercrítica	[-]
T	Temperatura	[°C]
P	Pressão	[bar]
x _i	Fração mássica do material retido na i-ésima peneira.	[%]

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	5
2.1 Objetivo geral	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Cerrado brasileiro	6
3.1.1. <i>Pterodon pubescens</i> Benth (Sucupira)	6
3.2. Óleo Essencial.....	16
3.2.1. Terpenos, fenilpropanóides e flavonóides.....	18
3.3. O Câncer e os produtos naturais	20
3.4. Métodos convencionais e não convencionais de extração	21
3.4.1. Extração com fluido supercrítico	23
3.5. Planejamento de experimentos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Fluxograma com as etapas de trabalho	31
4.2 Material vegetal	31
4.2.1 Preparo e Caracterização da Matéria-Prima.....	32
4.3 Extração com dióxido de carbono (CO ₂) supercrítico	34
4.3.1 Procedimento experimental da extração supercrítica.....	36
4.4 Planejamento Experimental 2 ³ para análise dos efeitos.....	38
4.5 Extração com solvente orgânico (Soxhlet) e hidrodestilação (Clevenger).....	39
4.6 Caracterização fitoquímica e métodos analíticos.....	40
4.6.1 Análise em cromatografia de camada delgada (CCD)	40
4.7 Análise em HPLC/UV-vis (High Liquid Pressure Chromatography)	42
4.8 Análise de atividade antioxidante (DPPH)	43
4.9 Análise da Atividade Antiproliferativa.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Caracterização da matéria-prima	48
5.2 Análise em cromatografia de camada delgada (CCD).....	49
5.2.1 Análise semiquantitativa via CCD por densitometria	51
5.3 Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	53
5.4 Análise dos efeitos das variáveis de processo	59
5.5 Análise do teste antiproliferativo com células de câncer <i>in vitro</i>	64

5.6 Análise do teste inicial de potencial antioxidante (Método DPPH)	70
6. CONCLUSÃO.....	73
7. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICE A – Cromatogramas das amostras na análise em HPLC/UV-vis	86
APÊNDICE B – Resultados do teste de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	93
APÊNDICE C – Aparelhagem utilizada no procedimento experimental.....	104

1. INTRODUÇÃO

A busca por matérias-primas naturais e processos mais sustentáveis tem permeado ao longo dos anos o setor industrial e, particularmente, a indústria de cosméticos e fármacos (BUTLER, 2004; CLARKE *et al.*, 2018; GWEHENBERGER & NARODOSLAWSKY, 2008; NEWMAN & CRAGG, 2020). Os produtos naturais são uma importante fonte de medicamentos para o combate ao câncer de forma que, no período de 1940-2014, mais de 60% dos medicamentos anticâncer eram derivados direta ou indiretamente de fontes naturais (NEWMAN & CRAGG, 2016, 2020). Esse é um dado muito importante, visto que estimativas do INCA (Instituto Nacional do Câncer) para incidência de câncer em 2020 no Brasil totalizam mais de 626 mil casos. No cenário dessa estimativa, o câncer de próstata representa 29,2% entre os tipos de câncer que mais atingem os homens, sendo que nas mulheres o câncer de mama representa 29,7% (INCA/MS, 2020).

As plantas são utilizadas desde a antiguidade na medicina popular e, mesmo após os avanços das indústrias farmacêuticas e química na síntese de fármacos, são utilizadas como alternativa aos medicamentos e métodos convencionais de tratamento (HARTWELL, 1984; NEWMAN & CRAGG, 2005; SOLÓRZANO-SANTO; MIRANDA-NOVALES, 2012). Os fitoterápicos ou produtos que tenham compostos bioativos naturais estão deixando o mercado de nicho e ganhando mais valor para o consumidor. Nessa mesma direção, tem sido crescente a tendência para cosméticos naturais e veganos, que utilizam insumos naturais e de baixo impacto ambiental (COLE; HEARD, 2007; ZHAO, 2008; FATIMA *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais são subprodutos do metabolismo secundário das plantas e alvo de grande interesse científico por apresentarem, em muitos casos, potencial bioativo. São compostos, principalmente, de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanóides, com álcoois, ésteres e ácidos de cadeia curta e média, conferindo-lhes baixo ponto de ebulição e características organolépticas (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; NEWMAN & CRAGG, 2005; HARVEY, 2007). Os terpenos, particularmente, são derivados de unidades de isopreno e possuem variada função farmacológica como efeitos antinociceptivo, ansiolítico e analgésico, além de evidências de sua ação contra várias doenças incluindo alguns tipos de câncer (GONZÁLEZ-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012; PATLOLLA & RAO, 2012; RABI; BISHAYEE, 2009; PASSOS *et al.*, 2009). Nesse direcionamento, estudos evidenciaram atividade anti-inflamatória e antitumoral *in vitro* de diterpenos furânicos (vouacapanos) e de

cadeia linear indicando, inclusive, sinergismo dessas substâncias bioativas do extrato da Sucupira (*Pterodon pubescens*) (SPINDOLA *et al.*, 2009; HOSCHEID *et al.*, 2012; DA SILVA SANTOS *et al.*, 2016; LLORET *et al.*, 2016; GRANDO, 2017).

Dentro desse contexto, o Brasil apresenta rica biodiversidade e biomas únicos no Mundo, como o Cerrado e Caatinga, apresentando flora rica em compostos bioativos e plantas medicinais (SIMÕES *et al.*, 2004; BRANDON, 2005; SOUZA, 2011). No Cerrado brasileiro, uma das plantas que faz parte do catálogo de fitoterápicos é a Sucupira (*Pterodon pubescens* Benth), também conhecida como fava-de-santo-inácio. Nativa do Cerrado brasileiro, essa planta pertence à família Fabaceae e é conhecida popularmente pelo seu uso no tratamento de dores articulares e de fraturas ósseas. Todas as partes da planta são utilizadas, desde a raiz até as folhas, na forma de decocção ou infusão, sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de diabetes e reumatismo.

Dentre os processos mais comuns de obtenção de compostos voláteis, estão a destilação por arraste à vapor, hidrodestilação e enfleurage. Já para a obtenção de compostos não voláteis, como o óleo fixo, são utilizadas as técnicas de extração por percolação, maceração, em sistema Soxhlet, por refluxo ou prensagem à frio. Porém, a toxicidade de alguns solventes, como diclorometano (classe de risco 6), atrelada à geração de resíduos tem aumentado a necessidade de aperfeiçoamento e escalabilidade de outros métodos, como é o caso da extração com fluido supercrítico, que possibilita a extração tanto de compostos voláteis quanto do óleo fixo. Outro fator relevante é que, nos processos de hidrodestilação e extração com solvente orgânico, as temperaturas de processo maiores que 50 °C podem acarretar degradação térmica de compostos termolábeis (BRUSOTTI *et al.*, 2014; MEJRI *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; TUREK; STINTZING, 2013).

Uma das técnicas que se faz alternativa aos métodos convencionais é a extração com fluido supercrítico, na qual o solvente utilizado apresenta temperatura e pressão maiores que seus valores críticos. Na extração supercrítica, o dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais utilizado por apresentar ponto crítico relativamente baixo (73,8 bar e 31,05 °C), ser atóxico, não inflamável e de baixo custo (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Algumas das vantagens da extração supercrítica está na facilidade de separação do solvente e na não toxicidade do solvente, além da utilização de temperaturas relativamente baixas. Além disso, o poder de solvatação do fluido supercrítico, que depende das condições de temperatura e pressão, também é um diferencial quanto à seletividade e otimização do processo de extração. A seletividade,

por sua vez, pode ser modificada com a adição de outras compostos ao fluido, conhecidos como cossolventes, que apresentam diferentes polaridades (REVERCHON *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2002; MEIRELES, 2003; BRUNNER, 2005; FOLLEGATTI-ROMERO, 2007).

O processo de extração com fluido supercrítico apresenta duas etapas: extração e separação. A primeira é formada pelo sistema matriz vegetal + solvente + extrato e na segunda etapa predomina a interação entre solvente e extrato. A etapa de extração é caracterizada pelas curvas globais de extração (*OEC- Overall Extraction Curves*) e pela modelagem cinética baseada em equações diferenciais de balanço de massa em leito fixo (GOTO; SATO; HIROSE, 1993; SOVOVÁ *et al.*, 1994; RODRIGUES *et al.*, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2003). A determinação do rendimento global e de parâmetros de transferência de massa são importantes para a caracterização do processo e sua modelagem (CONDORI, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2003; BRAGA, 2005). Já a segunda etapa é caracterizada pela diminuição da solubilidade para separação do soluto e solvente, apresentando potencial de otimização através da modelagem termodinâmica do equilíbrio de fases e da hidrodinâmica do processo (QUISPE-CONDORI, 2005; SERVAT *et al.*, 2012).

Porém, no cenário industrial brasileiro, a extração supercrítica ainda é pouco desenvolvida principalmente pelo alto custo de instalação da planta industrial, que requer equipamentos especializados e sistemas de controle e automação instrumental (PERRUT, 2000; MEIRELES, 2006). Até 2008 não havia nenhuma planta industrial de extração supercrítica no país (MEIRELES, 2008) sendo observado, entretanto, um movimento crescente de fomento às parcerias entre o meio acadêmico e startups do segmento de cosméticos para utilização dessa tecnologia (COSMÉTICOS DO BEM, 2020). A primeira planta de extração supercrítica teve origem na Alemanha, sendo utilizada principalmente para descafeinação, extração de resinas de lúpulo e, posteriormente, para a extração de aromas e corantes. Mais plantas industriais foram instaladas nos Estados Unidos, França e Itália, sendo que os dois últimos utilizavam a extração supercrítica para obtenção de princípios ativos destinados à indústria farmacêutica e cosmética (PERRUT, 2000). No período de 1980 a 2003, a Ásia apresentou crescimento no segmento, com a implantação de 31 plantas de extração supercrítica (FUKUZATO, 2003; MEIRELES, 2006). Dessa forma, para a extração supercrítica se justificar em termos de custo, é necessário agregar valor aos produtos obtidos, sendo isso possível quando são envolvidos compostos bioativos com alto grau de pureza (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Nesse cenário, estudos realizados com o extrato de *P. pubescens* comprovaram sua função anti-inflamatória e ação antitumoral em células de câncer *in vitro* relacionada aos diterpenos vouacapanos do extrato diclorometânico (SPINDOLA *et al.*, 2009; CABRAL *et al.*, 2013). Outros estudos revelaram ação antifúngica (ROQUE *et al.*, 2015) e bactericida (FERREIRA; DANTAS; CATÃO, 2005) do óleo da semente da Sucupira. Da Silva Santos *et al.* (2016) comparou três métodos de extração de *P. pubescens*: turbo extração utilizando etanol, maceração dinâmica com etanol e extração supercrítica utilizando CO₂, com o intuito de analisar o poder antiproliferativo *in vitro* desses extratos contra o parasita *L. amazonenses*. Observou-se que os extratos supercríticos apresentaram maior atividade antileishmania, principalmente, devido ao diterpeno linear geranilgeraniol, indicando maior seletividade do extrato obtido por extração supercrítica.

Diante dos resultados promissores, ressalta-se a importância de mais estudos da Sucupira através de diferentes métodos de extração para avaliação e mapeamento do seu poder farmacológico e mecanismos de ação. É válido mencionar que, na literatura, não foram encontrados trabalhos que tenham investigado a ação antiproliferativa *in vitro* em linhagens tumorais humanas do extrato da Sucupira obtido por extração supercrítica.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Realizar a extração supercrítica de compostos bioativos, terpenos vouacapânicos, a partir dos frutos da espécie *Pterodon pubescens* Benth com a análise da ação antiproliferativa do extrato em células tumorais humanas *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

Este trabalho tem como objetivos específicos:

- I. Determinar as características físicas e químicas da matéria-prima;
- II. Avaliar o efeito das variáveis de processo temperatura, pressão e razão S/F sobre o rendimento do processo de extração supercrítica;
- III. Realizar análise em CCD (Cromatografia de camada delgada), HPLC (*High Liquid Pressure Chromatography*) e de atividade antioxidante através do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil);
- IV. Analisar a atividade antiproliferativa do extrato supercrítico em células tumorais humanas *in vitro*, comparando os resultados obtidos com os encontrados em literatura para o extrato obtido através de métodos convencionais de extração.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cerrado brasileiro

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, apresentando uma rica biodiversidade de espécies animais, solos e plantas. Está presente nos estados Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Tocantins, Piauí e Distrito Federal (WERNER; OLIVEIRA; VIVEIRO, 2012).

Nos últimos anos as áreas do Cerrado vêm sendo ocupadas por pastos e lavouras, resultado da expansão do agronegócio na região. Segundo Klink e Machado (2005), a área do Cerrado correspondente à 2 milhões de km², sendo que deste total apenas 1,7% correspondem às áreas de preservação.

Até 2006 dados descreviam que o Cerrado apresentava cerca de 10.000 espécies de plantas (SILVA *et al.*, 2006), dentre as quais se destacam as plantas medicinais, vastamente utilizadas pela medicina popular da região. Como exemplo, está a *Echinodorus grandiflorus* e outras plantas do mesmo gênero, popularmente conhecida como cegonha do brejo ou chapéu-de-couro, que apresenta propriedades diuréticas, tônicas e depurativas, sendo que seus rizomas são aplicados diretamente nas áreas afetadas. Espécies como *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) e *Hancornia speciosa* (Mangaba-do-Norte) também são conhecidas por suas ação antibacteriana e no combate às cólicas menstruais e diabetes, respectivamente (MARONI; STASI; MACHADO, 2006).

3.1.1. *Pterodon pubescens* Benth (Sucupira)

Pterodon pubescens Benth é popularmente conhecida como fava-de-santo-inácio ou faveiro e pertencente à família Fabaceae. Também conhecida como Sucupira ou Sucupira branca, é típica do Cerrado brasileiro sendo vastamente utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças como reumatismo, diabetes e pelo seu poder anti-inflamatório (CARVALHO *et al.*, 1999; LORENZI; MATOS, 2002; SPINDOLA *et al.*, 2009; GRANDO *et al.*, 2017; FREITAS, 2019). Na Figura 1 é apresentada a árvore da Sucupira (*Pterodon pubescens*) em área do Cerrado brasileiro.

Figura 1 - Árvore da Sucupira (*Pterodon pubescens*) em área do Cerrado brasileiro.

Fonte: Autora.

O gênero *Pterodon* (Leguminosae) anteriormente compreendia cinco espécies sendo que, atualmente, sabe-se que as espécies *P. emarginatus* Vog. e a *P. pubescens* Benth. são sinônimos botânicos ficando, portanto, quatro espécies: *Pterodon pubescens* Benth, *Pterodon abruptus* Benth, *Pterodon polygalaeiflorus* Benth e *Pterodon apparicioi* Pedersoli (SPINDOLA *et al.*, 2009; LIMA; LIMA, 2015). Este gênero é conhecido pelas suas propriedades terapêuticas atribuídas às suas espécies e amplamente utilizadas na medicina popular. Os frutos e folhas do gênero são geralmente utilizados em infusões e ingeridos em pequenas doses sob certa frequência para o tratamento de doenças como o reumatismo, doenças respiratórias e ainda

como anti-inflamatório (CARVALHO *et al.*, 1999; HOSCHEID *et al.*, 2012; GRANDO *et al.*, 2017; FREITAS, 2019).

Pterodon pubescens Benth, é uma espécie arbórea, aromática, nativa da flora brasileira com distribuição geográfica que abrange as regiões Norte (Rondônia e Tocantins); Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí); Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) (LIMA; LIMA, 2015). Essa espécie é um tipo de leguminosa que apresenta árvores de porte médio podendo chegar a 20 metros de altura. Possui tronco ereto de 40-50 centímetros de diâmetro e são comuns tanto nas fitofisionomias do Cerrado brasileiro como na Mata Atlântica (zonas de transição) (LORENZI; MATOS, 2002; MASCARO; TEIXEIRA; GILBERT, 2005). Os frutos da espécie, tipo vagens, caem espontaneamente e, devido ao seu formato circular, se dispersam com facilidade. Cada fruto possui uma semente imatura, podendo mais dificilmente apresentar duas sementes, rica em compostos fenólicos e terpênicos, que conferem alta dureza e baixa permeabilidade à água. Elas apresentam um tamanho de cerca de 4-5 cm, apresentando embriões com cotilédones carnosos, ricos em lipídios e proteínas (LORENZI; MATOS, 2002; OLIVEIRA; PAIVA, 2005; HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010).

Análises fitoquímicas demonstraram a presença de sesquiterpenos, esteroides, flavonoides, taninos catequínicos, flavonas e xantonas nas folhas do gênero *Pterodon* (CAMPOS; CRAVEIRO; TEIXEIRA, 1990; SANTOS *et al.*, 2010; ARRAIS-SILVA *et al.*, 2014; DONATI *et al.*, 2015). Na oleorresina obtida a partir dos frutos, também foi encontrada uma grande variedade de substâncias como terpenóides do tipo furanoditerpenos (esqueleto vouacapânico) (ARRIAGA *et al.*, 2000; SPINDOLA *et al.*, 2009; HOSCHEID *et al.*, 2012; CABRAL *et al.*, 2013; NUCCI-MARTINS *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; NETO, 1976; NUNAN *et al.*, 1982 apud OLIVEIRA, 2016). Na casca também foram encontrados triterpenóides envolvidos no efeito anti-inflamatório (DE MORAES *et al.*, 2012). As estruturas de algumas das substâncias mapeadas estão demonstradas nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1: Estrutura de algumas substâncias encontradas nas folhas de *Pterodon pubescens*.

Sesquiterpenos	Ref.: (SANTOS <i>et al.</i> , 2010; MIRANDA <i>et al.</i> , 2014).
(rel)-2 β ,6 β -epóxi-5 β -hidróxi-isodaucano
Oplopanona
1 β ,6 α -di-hidróxi-4(15)-eudesmeno
Óxido de cariofileno
α -cadinol

Cont. Quadro 1: Estruturas de algumas substâncias encontradas nas folhas de *Pterodon pubescens*.

Sesquiterpenos	Ref.: (SANTOS <i>et al.</i> , 2010; MIRANDA <i>et al.</i> , 2014).
γ -muuroleno
biciclogermacreno
β -elemeno
allo-aromadendreno

Cont. Quadro 1: Estruturas de algumas substâncias encontradas nas folhas de *Pterodon pubescens*.

Flavonóides	Ref.: (SANTOS <i>et al.</i> , 2010; MIRANDA <i>et al.</i> , 2014).
quercetina
(+) - catequina
quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo

Fonte: Adaptado de Oliveira (2016).

Quadro 2: Estrutura de algumas substâncias encontradas nos frutos e sementes de *Pterodon pubescens*

Monoterpeno	Ref.: (EVANGELISTA <i>et al.</i> , 2007; DUTRA <i>et al.</i> , 2009; ALVES <i>et al.</i> , 2013; VELOZO <i>et al.</i> , 2013; NUCCI-MARTINS <i>et al.</i> , 2015).
Acetato de citronelila
Sesquiterpeno	Ref.: (EVANGELISTA <i>et al.</i> , 2007; DUTRA <i>et al.</i> , 2009; ALVES <i>et al.</i> , 2013; VELOZO <i>et al.</i> , 2013; NUCCI-MARTINS <i>et al.</i> , 2015).
α - cubebeno
α -ylangeno

Cont. Quadro 2: Estruturas de algumas substâncias encontradas no fruto e sementes de *Pterodon pubescens*.

Diterpeno	(ARRIAGA <i>et al.</i> , 2000; SPINDOLA <i>et al.</i> , 2009; SERVAT <i>et al.</i> , 2012; VELOZO <i>et al.</i> , 2013; LLORET <i>et al.</i> , 2016; OLIVEIRA, 2016).
Éster 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β - oato de metila (m/z 404)
Éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila (isômero m/z 404)
Éster 6 α -7 β -dihidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila (m/z 362)

Fonte: Adaptado de Oliveira (2016).

Devido às características e perfil fitoquímico apresentado pela Sucupira, vários estudos presentes na literatura foram realizados a fim de identificar os efeitos farmacológicos desses compostos bioativos, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Estudos realizados com a Sucupira para identificação dos efeitos farmacológicos apresentados.

Parte da planta	Técnica utilizada	Resultado	Referência
Frutos	Hidrodestilação	Efeito negativo em cepas bacterianas padrão de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) e <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).	Ferreira <i>et al.</i> (2005)
Casca	Maceração à frio com etanol	Efeito antimicrobiano para bactérias gram-positivas, gram-negativas e o fungo <i>Candida albicans</i> .	Bustamante <i>et al.</i> (2010)
Frutos	Soxhlet com diclorometano	Modesta atividade antifúngica do componente desconhecido ($m/z = 355$) isolado do extrato contra quatro espécies de <i>Candida</i> .	Roque <i>et al.</i> (2015)
Frutos	Prensagem mecânica	Efeito vasorrelaxante do diterpeno isolado 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila.	Reis (2015)
Frutos	Soxhlet com hexano	Inibição da penetração de cercarias na pele, sendo que as substâncias responsáveis pela atividade foram o 14,15-epoxigeranilgeraniol e o 14,15-dihidroxigeranilgeraniol.	Carvalho (2004)
Frutos	Maceração à frio com diclorometano	O composto isolado m/z 404 apresentou baixa toxicidade (categoria 4), sendo que a partir de doses diárias altas foram observados danos à saúde.	Souza (2017)

Fonte: Autora.

Outras pesquisas também constataram a atividade antinociceptiva de frações do extrato etanólico das sementes da Sucupira, além do efeito anti-artrite do extrato hidroalcólico (COELHO *et al.*, 2005). Paula *et al.* (2005) avaliaram a ação protetora do extrato hexânico bruto dos frutos de *Pterodon pubescens* em *stress* oxidativo e nitrosativo induzido em ratos, obtendo resultados promissores quanto à atividade antioxidante do extrato. Carvalho *et al.* (1998) também avaliaram a ação anti-inflamatória em modelos animais, comprovando a

atividade e sugerindo estar relacionada à presença de terpenos, e o edema gerado à liberação de prostaglandinas e outros mediadores do sistema de cininas. Já Vieira *et al.* (2008) encontraram resultados promissores na análise da atividade antiproliferativa do extrato etanólico das sementes de *Pterodon pubescens* em linhagem humana de melanoma. Além disso, também foram identificadas atividades de eficácia tripanosomida (IZUMI *et al.*, 2011), anti-inflamatória (HOSCHEID *et al.*, 2012) e antinociceptiva (NUCCI-MARTINS *et al.*, 2015). Oliveira (2016) obteve produtos nanoestruturados bioativos a partir da oleorresina, óleo essencial e diterpeno obtidos dos frutos de *P. pubescens*, comprovando melhor disponibilidade dessas estruturas em atividade larvívora frente à *A. aegypti* e *Culex*.

Lloret *et al.* (2016) realizaram monitoramento mensal dos frutos de *P. pubescens* proveniente de São Carlos (SP) e Ponto Chique (MG) quanto às concentrações dos biocompostos geranilgeraniol e diterpenos furânicos. Foi observado que, para a maior proporção (3,14) do diterpeno 6 α -acetoxi-7 α -hidroxivouacapano (*m/z* 360) em relação ao total de diterpenos vouacapanos presentes no extrato, uma maior seletividade e inibição do crescimento de células humanas de câncer de próstata *in vitro* foi apresentada, com TGI de 11,43 μ g/mL. Uma relação direta entre a diminuição da concentração de estabilidade do geranilgeraniol e do aumento geral da concentração de diterpenos vouacapanos também foi observada.

Cabral *et al.* (2013) estudaram a identidade química (*fingerprinting*) do extrato bruto das sementes da *P. pubescens*, propondo uma metodologia de caracterização e padronização rápida através de EASI (+) -MS, sendo identificados 12 diterpenos.

Spindola *et al.* (2009) realizaram o fracionamento biomonitorado do extrato diclorometânico das sementes de *Pterodon pubescens* Benth identificando de forma inédita o diterpeno 6 α -acetóxi-7 β -hidróxi-vouacapano, além de outros quatro diterpenos furânicos. O composto diterpênico inédito apresentou alta seletividade e inibição para o crescimento de células PC-3 *in vitro* (câncer de próstata).

Favareto (2016) realizou a extração supercrítica com dióxido de carbono dos frutos da Sucupira avaliando o rendimento, perfil químico e atividade antioxidante do extrato. No caso, o rendimento mássico com maior teor de diterpenos vouacapanos (35,66%) foi obtido nas condições de 40 °C e 220 bar e a maior atividade antioxidante (77,59%) foi obtida nas condições de 50 °C e 160 bar. Houve a comparação da extração supercrítica com a hidrodestilação, sendo que a primeira técnica apresentou maior rendimento (21,2% versus 2,6%).

Da Silva Santos *et al.* (2016) estudaram a otimização do método de extração da *Pterodon pubscens* e avaliaram a atividade anti-leishmaniose do óleo e de nanoemulsões. Foi averiguado que o extrato proveniente da extração supercrítica foi mais efetivo contra o protozoário *L. amazonenses*, se comparado aos métodos tradicionais. Isso foi atribuído à significativa quantidade de derivados do composto geranilgeraniol (álcool diterpênico) no extrato supercrítico. A extração supercrítica foi realizada com vazão volumétrica de 2 mL/min, e delineamento experimental 2², em triplicata, avaliando o efeito de temperatura (20 °C a 60 °C) e da pressão (80-120 bar).

3.2. Óleo Essencial

Os óleos essenciais constituem as substâncias voláteis contidas em muitos órgãos vegetais, sendo basicamente uma mistura de monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados (STEFFANI, 2003). Podem ser extraídos dos frutos, folhas, casca e galhos. Os óleos essenciais fazem parte do metabolismo secundário das plantas, que tem origem no processo de conversão da energia luminosa em energia química, possibilitando sua resposta a diferentes fatores do meio externo (ALMEIDA, 2017). De forma geral, os metabólitos secundários são subdivididos em três classes químicas: terpenoides, alcalóides e compostos fenólicos, conforme demonstrado no esquema resumido da rota biossintética na Figura 2.

Segundo Bhavnani e Ballow (2000), tem-se atestado cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% apresentam propriedades antibacterianas, como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3. Já Lima *et al.* (2006) comprovaram em seu trabalho atividade antifúngica dos óleos essenciais de *C. Zeylanicum* e *P. Boldus* sobre espécies de *Candida*, causadora da candidíase.

Figura 2: Esquema geral das rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.

Fonte: Adaptado de Santos (2002).

Tabela 2: Propriedades de substâncias presentes em alguns óleos essenciais.

Componentes	Propriedade
d-limoneno	Anticancerígeno, herbicida, inseticida, insetífugo.
1,8-Cineol	Alopático, anestésico, anti-bronquítico, antisséptico.
Linalol	Antisséptico, insetífugo, termitífugo.
Timol	Anti-inflamatório, bactericida.

Fonte: Adaptado de Steffani (2003).

Tabela 3: Propriedades medicinais ou terapêuticas de algumas espécies botânicas.

Espécie	Nome popular	Medicina popular
<i>Cinnamomum Zeylanicum</i>	Canela	Aromática, tônica e antipasmódica.
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Eucalipto	Feridas da pele, bronquite, tosse.
<i>Peumus boldus</i>	Boldo do Chile	Dor abdominal, colerético.
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Verme e tosse em associação à outras plantas.

Fonte: Adaptado de Lima *et al.* (2005).

Foram realizados estudos fitoquímicos com o óleo essencial dos frutos de *P. pubescens*, que indicaram a presença dos sesquiterpenos β -cariofileno, γ -muuroleno, espatulenol e α -humuleno como substâncias majoritárias. Além dessas substâncias também foram identificados outros terpenos aromáticos voláteis e fenilpropanóides (ALVES *et al.*, 2013; DUTRA *et al.*, 2012; ALBERTI *et al.*, 2014).

Dutra *et al.* (2009) investigaram a ação anti-inflamatória e antiulcerogênica do óleo essencial das sementes de *P. pubescens* obtendo bons resultados e sugerindo que sesquiterpenos, como biciclogermacreno, *trans*-cariofileno e α -humuleno, fossem os possíveis responsáveis pela atividade. A análise em ratos possibilitou inferir que, em parte, essas atividades seriam uma consequência da modulação de óxido nítrico e de interleucina-1. Outro resultado relevante obtido nesse estudo foi o fato de o óleo essencial de *P. pubescens* reduzir o número de leucócitos migratórios ao local da lesão e aumentar os agentes mediadores, acarretando o efeito anti-inflamatório.

3.2.1. Terpenos, fenilpropanóides e flavonóides

Os terpenos são substâncias de origem vegetal e resultado da condensação de unidades de isopreno (estrutura de 5 carbonos), podendo ser monoterpenos (Figura 3), composto por 10 carbonos, e sesquiterpenos, com 15 átomos de carbono, que podem ser hidrocarbonados ou oxigenados. Essas substâncias, através de reações secundárias, originarão álcoois, aldeídos,

cetonas, fenóis, éteres e ésteres (BRUNETON, 1991; SIMÕES; MENTZ; BORDIGNOM, 2004). Já os fenilpropanóides são compostos fenólicos formados a partir do ácido chiquímico, que forma unidades básicas de ácido cinâmico e p-cumárico (STEFFANI, 2003). Através de reações enzimáticas de oxidação, redução e ciclização são formados compostos como propilbenzeno, aldeídos aromáticos e cumarinas (SIMÕES; MENTZ; BORDIGNOM, 2004).

Figura 3: Principais monoterpênos encontrados na literatura.

Fonte: Souza, Mello e Lopes (2012).

Os flavonóides, por sua vez, fazem parte dos compostos fenólicos e apresentam capacidade antioxidante (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006; STALIKAS, 2007). São compostos heterocíclicos oxigenados, frequentemente encontrados associados com glicosídeos. Os flavonoides são termodinamicamente mais hábeis para reduzirem radicais livres altamente oxidados como, por exemplo, superóxido, peroxila, alquoxila e hidroxila, por meio de doação de átomos de hidrogênio (CARVALHO, 2004).

Dos frutos de *Pterodon pubescens* é obtido um oleorresina bastante viscoso, de coloração castanho-clara. Diversos estudos já demonstraram que suas substâncias, principalmente terpenóides, são os responsáveis pelas atividades biológicas relatadas. Os marcadores químicos desse oleorresina são diterpenos de esqueleto vouacapânico, sendo possível também a obtenção de um óleo essencial rico em sesquiterpenos.

3.3. O Câncer e os produtos naturais

Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer, 2020), câncer é o termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos. Ele pode ser do tipo carcinoma, quando começam em tecidos epiteliais como pele e mucosas, ou do tipo sarcoma, quando ocorrem em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem. A estimativa do INCA era que, em 2020 no Brasil, ocorresse mais de 620 mil casos de câncer, sendo que destes, a incidência de câncer de próstata nos homens correspondesse a 29,2% e o câncer de mama nas mulheres representasse 29,7%.

Desde a antiguidade as plantas são utilizadas pelo homem no combate às doenças infecciosas e, alguns desses medicamentos tradicionais, ainda são utilizados como parte do tratamento de várias doenças (NEWMAN & CRAGG, 2005). Como exemplo, pode ser citado o uso de *bearberry* (*Arctostaphylos uva-ursi*) e suco de *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*) no tratamento de infecção urinária, enquanto espécies como a cidreira (*Melissa officinalis*), alho (*Allium sativum*) e *tea tree* (*Melaleuca alternifolia*) são utilizados como agentes antimicrobianos.

Dentro desse contexto, segundo mapeamento realizado por Newman & Cragg (2020), no período de 1981 a 2019 mais de 60% das drogas anticâncer produzidas tinham origem direta ou indireta de plantas medicinais, conforme demonstrado na Figura 4. Nesse mapeamento está a Aplidina, um produto natural marinho não modificado que foi aprovado na Austrália no final de 2018 para o tratamento de mieloma múltiplo (câncer de células da medula óssea).

No processo de investigação dos efeitos farmacológicos de produtos naturais são realizados os experimentos de citotoxicidade de células *in vitro*, possibilitando descobertas e elucidações em relação aos prováveis mecanismos de ação da droga testada e a biologia das células tumorais (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011). Esses testes apresentam relevância na fase de triagem das substâncias, reduzindo o número de animais utilizados em testes *in vivo*, além de serem relativamente baratos e de fácil reprodutibilidade (MARTINS, 2014).

Figura 4: Representação gráfica da origem das drogas anticâncer realizadas por Newman & Cragg (2020) no período de 1981 a 2019, totalizando 247.

Fonte: Adaptado de Newman & Cragg (2020).

3.4. Métodos convencionais e não convencionais de extração

Os processos de extração consistem na retirada de uma substância ou princípio ativo (soluto) de uma matriz por meio de um solvente, sendo a separação baseada em diferentes graus de solubilidade dos constituintes. Na área de óleos vegetais e essenciais estão presentes os processos de prensagem, destilação, extração com solventes voláteis, *enfleurage*, maceração e extração supercrítica (SHREVE; BRINK, 2012).

A destilação por arraste à vapor (Figura 5b) é um dos processos mais utilizados nos casos de separação de componentes que apresentam diferentes volatilidades, mas que, através da destilação comum, poderiam sofrer degradação térmica. O vapor de água superaquecido (quando é produzido em uma caldeira externa, Figura 5a) ou saturado (quando é produzido no extrator) escoa pela matriz vegetal, formando uma mistura imiscível com os óleos voláteis e de menor ponto de ebulição, proporcionando uma destilação em temperatura constante e menor

que 100 °C. A matriz vegetal geralmente fica separada da água dentro do extrator. O vapor juntamente com os volatilizados são condensados e decantados, formando a fase de hidrolato e o óleo volátil como esquematizado na Figura 5 (MUKHOPADHYAY, 2000).

Um dos atrativos da destilação à vapor, já que se utiliza água como agente de separação, é a obtenção de produtos livres de solventes orgânicos. Porém, quando o soluto é um produto natural, dificilmente a degradação térmica de algum componente é evitada, gerando oligômeros e levando à degradação de alguns ativos fitoterápicos presentes nos óleos (MEIRELES, 2009).

Já na hidrodestilação (Figura 5c), a matriz vegetal é submersa em água que, após aquecimento, entra em ebulição e produz o vapor responsável pela mistura com os compostos voláteis de menor temperatura de ebulição. As etapas de condensação e separação são parecidas com a destilação por arraste à vapor, sendo formada duas fases: o hidrolato (água e compostos hidrossolúveis) e o óleo essencial.

Figura 5: (a) Vapor proveniente de fonte externa, (b) Vapor gerado no interior do extrator, (c) Hidrodestilação. Na figura à direita observa-se o sistema de separação física do óleo volátil e hidrolato (etapa comum aos processos (a), (b), (c)).

Fonte: Correa (2010).

A extração sólido-líquido ou extração com solvente ocorre com a dissolução seletiva de um ou mais solutos da matriz sólida através de um solvente líquido (MEIRELES, 2009). Essa operação unitária também é designada como lixiviação ou decocção e apresenta como desvantagens a necessidade de grandes quantidades de solventes e a geração de resíduos nos produtos, muitas vezes proibidos pela toxicidade apresentada (CAVALCANTI, 2013).

Solventes com baixo ponto de ebulição como, por exemplo, o metanol, acetato de etila e diclorometano, têm sido vastamente empregados no isolamento de biocompostos, óleos de sementes e outros produtos provenientes de plantas; sendo também utilizados para descafeinação do café e chá (SHI, 2007).

A extração com fluido supercrítico é um método não convencional de técnica relativamente nova, apresentando vantagens quanto à sustentabilidade de seu processo e a não utilização de solventes orgânicos para obtenção de biocompostos.

3.4.1. Extração com fluido supercrítico

Uma substância pura é considerada um fluido supercrítico quando o sistema de pressão e temperatura se encontra acima do seu ponto crítico, T_c e P_c , sendo que nessa região o fluido pode ser considerado tanto um gás comprimido quanto um líquido expandido. Ademais, a substância é considerada um fluido de uma única fase e não condensável, apresentando propriedades físico-químicas de gás e outras propriedades características de um líquido, como pode ser observado na Tabela 4 (BRUNNER, 1994; TAYLOR, 1996).

Tabela 4: Valores de massa específica, difusividade e viscosidade conforme estado físico.

Estado de Agregação	Massa específica (g/cm ³)	Difusividade (cm ² /s)	Viscosidade (g/cm.s)
Gás			
P = 1 atm, T = 15-30 °C	(0,6-2,0) x 10 ⁻³	0,1-0,4	(0,6-2,0) x 10 ⁻⁴
Líquido			
P = 1 atm, T = 15-30 °C	0,6-1,6	(0,2-2,0) x 10 ⁻⁵	(0,2-3,0) x 10 ⁻²
Fluido Supercrítico			
P = P _c , T = T _c	0,2-0,5	0,7 x 10 ⁻³	(1-3) x 10 ⁻⁴
P = 4P _c , T = T _c	0,4-0,9	0,2 x 10 ⁻³	(3-9) x 10 ⁻⁴

Fonte: Brunner (1994).

Fluidos supercríticos apresentam massa específica relativamente alta e baixa viscosidade, fatores estes resultantes do poder de solvatação dependente da pressão e de um alto coeficiente de difusão ao fluido; respectivamente. Essas características acabam proporcionando certo poder de seletividade do fluido supercrítico. Além disso, a ausência de tensão superficial permite rápida penetração na matriz da amostra, proporcionando maior eficiência no processo de extração (TAYLOR, 1996). Uma outra análise importante é o comportamento do fluido na região do ponto supercrítico ($T=T_c$), em que pequenas variações na pressão acarretam grandes variações na massa específica, no poder de solubilização e compressibilidade isotérmica (VASCONCELLOS, 2007; CAVALCANTI, 2013). Já para mudanças significativas na massa específica quando a temperatura é superior a T_c , é necessário altas pressões de processo. Na Figura 6 é possível verificar a alta taxa de variação da massa específica com a pressão através da isoterma crítica ($T=T_c$) para um composto puro, no qual a inflexão da curva é o ponto crítico (BRUNNER, 2005; CAVALCANTI, 2013). Com isso, observa-se variação mais pronunciada na região próxima ao ponto crítico, não somente da massa específica, mas também de propriedades de transporte como difusividade e viscosidade. A viscosidade de um fluido supercrítico diminui com a temperatura até um valor mínimo, após o qual apresenta aumento. Tem-se assim que, para temperaturas acima desse mínimo, o fluido comporta-se como um gás e, abaixo do mínimo, como um líquido apresentando diminuição da viscosidade com a temperatura (CAVALCANTI, 2013).

Figura 6: Gráfico do volume específico (log) versus pressão para um composto puro.

Fonte: Adaptado de Vasconcellos (2007).

Essas características permitem altas taxas de extração e fácil separação do solvente-soluto, que é possível através da diminuição da pressão ou aumento de temperatura da mistura que deixa a coluna de extração (MEIRELES, 2009). Porém, os solutos podem formar gotículas ou aerossóis acarretando uma recuperação incompleta ou parcial. Quando o soluto apresenta alta volatilidade, como os óleos essenciais, pode ocorrer a vaporização junto com o CO₂, de forma que o conhecimento do equilíbrio de fases do sistema extrato + CO₂ é de grande importância para otimização dessa etapa (CLIFFORD, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2002). Na Tabela 5 estão presentes as propriedades críticas dos principais solventes utilizados na extração por fluido supercrítico.

Tabela 5: Propriedades de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos.

Substância	T _c (°C) ¹	P _c (bar) ²
Xenônio	16,6	58,4
Trifluormetano	26,2	48,6
Clorotrifluormetano	28,9	38,7
Dióxido de Carbono	31	73,8
Etano	32,2	48,7
Óxido Nitroso	36,4	72,6
Hexafluoreto de enxofre	45,5	37,7
Propano	96,7	42,5
Amônia	132,4	113,5
Dióxido de enxofre	157,7	78,8
Triclorofluormetano	198	44,7
Metanol	239,4	80,8
Etanol	240,9	61,4
Água	374	220,6

¹T_c: Temperatura Crítica, ²P_c: Pressão crítica. Fonte: adaptado de Lide (1997).

O dióxido de carbono (CO₂) é um dos fluidos supercríticos mais utilizados por possuir ponto crítico relativamente baixo de 73,8 bar e 31 °C. Além dessa característica, ele é atóxico, não inflamável e inerte, apresentando alta pureza. O CO₂ é um bom solvente para compostos hidrofóbicos ou levemente hidrofílicos. De forma geral, o aumento de pressão do sistema acarreta maior extração de componentes hidrofóbicos, sendo que a polaridade do solvente pode ser modificada adicionando solventes orgânicos polares como o etanol e metanol, chamados de cossolventes (MEIRELES, 2009).

A extração com fluido supercrítico é caracterizada basicamente por 4 etapas: extração, expansão, separação e condicionamento do solvente; sendo que a eficácia da extração depende de duas fases: a fase estacionária, composta pelo leito fixo formado pela matriz vegetal na coluna de extração, sendo o sistema ternário (matriz vegetal + extrato + solvente supercrítico) e a separação, na qual ocorre a fase dinâmica da extração (extrato + solvente supercrítico) (SHI, 2007).

3.4.1.1. Etapas da extração com fluido supercrítico

O diagrama de uma unidade de extração supercrítica pode ser observado na Figura 7. Segundo Brunner (1994), o processo de extração supercrítica passa por uma etapa inicial na qual a matriz vegetal absorve o fluido supercrítico mais cossolvente, se utilizado, na estrutura vegetal facilitando o transporte de massa. Os compostos dissolvidos (extrato) são levados à superfície do sólido dando início à difusão e possíveis mudanças de fase. Nessa etapa, os compostos são arrastados pelo solvente supercrítico e serão encaminhados para a separação.

Na etapa de extração, são selecionadas a temperatura e pressão ótimas para maximizar o rendimento dos compostos de interesse, enquanto na fase de separação a redução da solubilidade é preferível com o intuito de separar o extrato e reciclar o solvente (CAVALCANTI, 2013). Quispe-Condori (2005) descreve a operação de extração com fluido supercrítico da seguinte forma:

- I. No extrator (E), o leito fixo é formado pela matriz vegetal (folhas, flores, galhos, sementes), sendo que a matéria-prima deve conter até 10% de água (b.u.-base úmida) para extração com CO₂ puro (MEIRELES, 2003);
- II. O solvente é alimentado no extrator por meio de uma bomba (B) ou compressor para alcançar a pressão de extração (BRUNNER, 2005), sendo posteriormente aquecido até a temperatura ótima de extração. Nessa etapa ocorre a adição de cossolvente, caso utilizado;
- III. Quando as condições de processo são atingidas, as válvulas de redução são abertas para permitir o fluxo de solvente ao longo do leito;
- IV. A separação da mistura extrato + CO₂ acontece no separador (S). Na temperatura e pressão reduzidas, o extrato precipita no separador, enquanto o solvente, livre ou com baixo teor de extrato, é recirculado no sistema, passando por estágios prévios de resfriamento e compressão (BRUNNER, 1994).

Figura 7: Diagrama de uma unidade de extração supercrítica.

Fonte: Adaptado de Meireles (2009).

3.4.1.2. Solubilidade de óleos vegetais em CO₂ supercrítico

Durante o processo de extração supercrítica um dos fatores mais importantes é a solubilidade entre a substância a ser extraída e o solvente utilizado. Os fatores que mais afetam a solubilidade do soluto em CO₂ supercrítico é a temperatura e a pressão, modificando propriedades físicas do óleo vegetal e a densidade do solvente (FOLLEGATTI-ROMERO, 2007).

O CO₂ é uma molécula apolar apresentando, dessa forma, moderada ou baixa solubilidade com substâncias polares, como ácidos fenólicos, flavonoides não glicosilados e de alta massa molecular (TAYLOR, 1996; MUKHOPADHYAY, 2000; BRUNNER, 2005). Com isso, são utilizados cossolventes para aumentar a interação e solubilidade do CO₂ em compostos polares, sendo que os mais utilizados são o metanol e etanol, que apresentam interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio (CAMPIOL DOS SANTOS, 2011).

Na Figura 8 está representado o diagrama de pressão-temperatura do dióxido de carbono. Em um fluido supercrítico, a densidade aumenta com a pressão à temperatura constante e diminui com a temperatura à pressão constante (QUISPE-CONDORI, 2005).

Figura 8: Diagrama pressão-temperatura do dióxido de carbono e linhas de densidade.

Fonte: adaptado de Brogle (1982).

Povh *et al.* (2001), Favareto *et al.* (2017) e Rodrigues *et al.* (2002) utilizam o rendimento da primeira etapa de extração (Y_{CER}), no qual predomina o fenômeno de convecção, como estimativa da solubilidade do extrato no solvente crítico através das curvas globais de extração.

Através das curvas globais de extração (OEC – *Overall Extraction Curves*) é possível saber qual é a taxa de extração (dw/dt), ou seja, qual é a massa de extrato acumulada em função do tempo ou de solvente utilizado (CAVALCANTI, 2013). As curvas globais de extração são de grande importância para caracterização e otimização do processo de extração, sendo a modelagem matemática uma das principais ferramentas de predição. Através das curvas globais os modelos são ajustados aos dados experimentais, sendo possível dimensionar o volume necessário do extrator, assim como a vazão requerida de solvente para a taxa de extração

desejada, entre outros parâmetros, possibilitando assim projetar o processo em escala industrial (BRAGA, 2005).

Geralmente, as OECs apresentam dois tipos gerais: No Tipo 1 observa-se regime permanente nos estágios iniciais seguido por regime transiente. No Tipo 2 o regime transiente está presente desde o início da extração (BRUNNER, 1994).

Para ambos os tipos de OEC, a taxa de extração pode ser dividida em 3 etapas: A primeira etapa CER (*Constant Extraction Rate*) é caracterizada por uma velocidade constante, sendo predominante o mecanismo de convecção. Na segunda etapa, FER (*Falling Extraction Rate*), a transferência de massa é dada por convecção e difusão, sendo observada certa resistência ao mecanismo de transferência. Por fim, na terceira etapa a transferência ocorre de forma mais lenta, LER (*Low Extraction Rate*), sendo predominante o mecanismo de difusão.

Na curva global de extração de cravo-da-índia obtida por Rodrigues *et al.* (2002) essas três etapas podem ser observadas como demonstrado na Figura 9.

Figura 9: Curva global de extração para o sistema cravo-da-índia + CO₂ a 100 bar e vazão de CO₂ igual a 1,64 g/min: (▲) 25 °C e (■) 35 °C .

Fonte: Adaptado de Meireles (2009).

3.5. Planejamento de experimentos

A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, assim como do mapeamento dos efeitos das variáveis utilizadas na resposta desejada, tem feito com que técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos, como o planejamento fatorial associado à análise de superfície de resposta, se destaquem frente ao empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX; HUNTER & HUNTER, 2005). Com isso, é possível minimizar custos e tempos, maximizar rendimentos, produtividade e a qualidade do produto.

Através da investigação dos efeitos das variáveis de processo, assim como de possíveis sinergismos e antagonismos, é possível minimizar custos e tempos, maximizar rendimentos, produtividade e a qualidade do produto (RODRIGUES & IEMMA, 2014).

Nesse contexto, o planejamento experimental fatorial possibilita, primeiramente, entender e mensurar os efeitos das variáveis de processo de forma simultânea, assim como de possíveis sinergismos e antagonismos. Além do cálculo e avaliação do erro experimental, é possível também especificar o nível de confiança estatística mesmo para processos que apresentam apenas duas variáveis independentes. Dessa forma, uma das vantagens é a redução do número de experimentos ou repetições quando o processo envolve muitos fatores e, além disso, a melhora na qualidade da informação obtida através da análise dos resultados (RODRIGUES & IEMMA, 2014).

De forma geral, um delineamento fatorial completo, que tem como principal diretriz a análise dos efeitos das variáveis independentes ou fatores sobre as respostas desejadas, é representado da forma N^K , sendo o resultado da potência o total de ensaios a ser realizado. No caso, o N representa os níveis a serem estudados e K a quantidade de fatores ou variáveis a serem analisadas. O mais usual são planejamentos experimentais fatoriais 2^K , no qual são investigados dois níveis: baixo (-) e alto (+). Nesse tipo de delineamento, são adicionados pontos centrais que possibilitam o cálculo do erro puro através da estimativa de resíduos, além de trazer uma análise sobre a reprodutibilidade dos ensaios. Existem outros tipos de planejamento experimental, como o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), no qual são adicionados pontos axiais que possibilitam o ajuste de um modelo de segunda ordem às respostas experimentais. Outro tipo de planejamento são os delineamentos fatoriais fracionados e Plackett & Burman, que são utilizados para uma avaliação prévia das variáveis e seleção daquelas que devem ser consideradas até se chegar no delineamento completo rotacional (DCCR) (RODRIGUES & IEMMA, 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma com as etapas de trabalho

As etapas do presente trabalho encontram-se representadas no fluxograma da Figura 10.

Figura 10: Fluxograma experimental das etapas realizadas no presente trabalho.

Fonte: Autora.

4.2 Material vegetal

Para este trabalho foram utilizadas as sementes e frutos da Sucupira (*Pterodon pubescens* Benth) cedidas pelo laboratório de pesquisa LAFTEX, da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da Unicamp, e coletados na cidade de Ponto Chique – MG (16° 37' 51'' S, 45° 3' 57'' W) em janeiro de 2014. As amostras foram identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do departamento de Botânica do Instituto de Biologia (IB-UNICAMP). As exsiccatas foram depositadas no Herbário do IB-UNICAMP sob o número 1398-1402. O cadastro de acesso no SisGen encontra-se sob o número A500AAF. As amostras foram limpas, ensacadas e armazenadas em temperatura ambiente conforme a Figura 11.

Figura 11: Frutos coletados da Sucupira (*Pterodon pubescens*).

Fonte: Autora.

4.2.1 Preparo e Caracterização da Matéria-Prima

As amostras foram processadas no laboratório LASPE do Departamento de Engenharia Química da USP. A primeira etapa foi a determinação da umidade dos frutos através do método de secagem em estufa na temperatura de 105 °C durante 24h (adaptado de INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Os frutos foram triturados em liquidificador de alta rotação classe 1 – IPX1 (Modelo SPL-022-ECO) e introduzidos em um jogo de peneiras da série padrão Tyler de 16 a 65 meshes. A distribuição granulométrica foi realizada utilizando agitador magnético durante 1 h. Esse intervalo de tempo maior foi utilizado devido às características de oleoresina da Sucupira, o que acarreta formação de grumos.

Para a determinação do diâmetro médio, foi utilizado o método ASAE S319.3, recomendado pela ASAE Standards (1998) conforme a Equação 1:

$$D_m = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right] \quad (1)$$

Em que:

$$\bar{d}_i = (d_{i-1} \cdot d_i)^{0,5}$$

$+d_i$ = abertura nominal da i-ésima peneira, pela qual a partícula ficou retida (mm);

$-d_{i-1}$ = é a abertura de uma peneira maior que a i-ésima peneira, pela qual a partícula passou (mm);

w_i = massa do material retido na i-ésima peneira.

A massa específica aparente do leite de extração (ρ_{ap}), em kg/m³ ou g/mL, pode ser calculada usando a massa de alimentação (F), em kg ou g, utilizada para empacotar o leite e o volume do leite (V_B), em m³ ou mL, como demonstrado na Equação 2.

$$\rho_{ap} = \frac{F}{V_B} \quad (2)$$

A massa específica real da partícula (ρ_r) foi determinada utilizando picnômetro, balança analítica (Shimadzu ATX224), termômetro e a amostra seca conforme método descrito por Sampaio e Silva (2007):

- Determinar a massa do picnômetro vazio, previamente limpo e seco, em estufa, a 100 °C e resfriado em dessecador.
- Adiciona-se a amostra seca e moída no picnômetro e, em seguida, completa-se o volume com água de forma que o capilar fique totalmente preenchido. Determinar a massa em uma balança de todo o conjunto e medir a temperatura. A massa da amostra é determinada pela diferença entre a massa do picnômetro + amostra e a massa do picnômetro vazio.
- Descartar a amostra do picnômetro e limpar. Preencher o picnômetro com água destilada até transbordar, secar a água residente na superfície externa do mesmo e, em seguida, pesar o picnômetro com água.

A massa específica da partícula é definida então pela Equação 3.

$$\rho_r = \frac{A_2 - A_1}{(A_4 + A_2) - (A_1 + A_3)} \times \frac{1}{d_{\text{água}}} \quad (3)$$

Em que:

A_1 é a massa do picnômetro vazio;

A_2 é massa do picnômetro + amostra;

A_3 é a massa do picnômetro + amostra + água;

A_4 é a massa do picnômetro + água.

A massa específica da água foi determinada através de tabela do *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (2016) com relação à temperatura ambiente medida.

A porosidade do leito de extração (ε) pode ser determinada através da massa específica aparente e da massa específica real das partículas conforme Equação 4.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{ap}}{\rho_r} \quad (4)$$

4.3 Extração com dióxido de carbono (CO₂) supercrítico

O aparelho de extração supercrítica (Thar Technologies, PA, USA) utilizado neste trabalho encontra-se esquematizado na Figura 12, sendo formado por cilindro sifonado de CO₂ (A), trocador de calor do CO₂ (Thar, (B)) acoplado à banho de refrigeração (Quimis, serial number 905443, Diadema, Brasil), bomba de alta pressão (Thar Technologies, serial number 66937-7, (C)), mixer (Thar Technologies, (D)), trocador de calor CO₂ (Thar Technologies, serial number 2780-2, (E)), vaso extrator (Thar Technologies, (G)), manômetros tipo Bourdon (F, K), sistema regulador de pressão ABPR (Thar Technologies, serial number 2583-5, (I)), válvula manual (J) e vaso separador (Thar Technologies, (L)). Além disso, o sistema conta com controlador de temperatura RB1 (Thar Technologies, (H)) do vaso de extração e do vaso separador.

Figura 12: Esquema do sistema de extração supercrítica.

Fonte: Autora.

O CO₂ passa primeiramente pelo trocador de calor para que ocorra sua liquefação, sendo necessário que o banho de refrigeração esteja à 3 °C, temperatura necessária para que no trocador de calor ocorra a liquefação do CO₂ gasoso. Em seguida, o CO₂ passa pela bomba de alta pressão para atingir seu ponto crítico (pressão mínima de 73,8 bar). No presente trabalho não foi utilizado cossolvente. O CO₂ passa novamente por um outro trocador para ajuste da temperatura de *set point* e entra no vaso extrator, no qual encontra-se o leito de extração formado pela matéria-prima. A vazão do CO₂ também é uma variável determinante no processo e, neste caso, foi utilizado 15 g/min. Por fim, o CO₂ + extrato passam pelo sistema ABPR (*Automated back pressure regulator*) onde a pressão será reduzida para que ocorra separação do CO₂.

Favareto (2016) em seu trabalho utilizou uma vazão de CO₂ de 3-6 mL/min o que, aproximadamente, corresponde a uma faixa de vazão mássica de 2,5-5 g/min. Quispe-Condori (2005) verificou que o aumento da vazão de solvente diminuiu o rendimento em anetol e funchona no extrato de *F. vulgare* (Funcho). Porém, como o extrato de *P. pubescens* possui característica de oleoresina, optou-se por utilizar um patamar maior de vazão de CO₂ para garantir maior extração dos compostos.

4.3.1 Procedimento experimental da extração supercrítica

Primeiramente, em uma balança determinou-se a massa de 30 g da matéria-prima previamente triturada. A amostra foi inserida então no vaso extrator, de altura igual a 16,3 cm e diâmetro de 2,82 cm, dentro de um saco de nylon com as mesmas dimensões. O saco de nylon facilita a acomodação da droga vegetal no vaso extrator, evitando também possíveis entupimentos das tubulações e na bomba do aparelho de extração. Quando o banho de refrigeração atingiu 3 °C, temperatura necessária para que no trocador de calor ocorra a liquefação do CO₂ gasoso, ligou-se o aparelho e inseriram-se as variáveis de processo no *software* (*Thar Technologies Process Suite*). Assim que os parâmetros temperatura e pressão estavam programados conforme delineamento experimental, ligaram-se o sistema ABPR e os termopares para aquecimento do sistema até a temperatura de *set point*. Quando a temperatura do sistema atingiu 30 °C abriu-se a válvula do cilindro de CO₂ e sua bomba, sendo a vazão utilizada de 15 g/min. Posteriormente, quando o sistema atingiu o *set point*, iniciou-se o tempo de extração. Após o término da extração, desligou-se a bomba de CO₂ via *software* (*Thar Technologies Process Suite*) e fechou-se a válvula do cilindro de CO₂. Imediatamente, o sistema ABPR foi desligado e a válvula aberta via *software* (*Thar Technologies Process Suite*) para despressurização do sistema. O equipamento de extração supercrítica utilizado pode ser observado na Figura 13.

Figura 13: Equipamento de extração supercrítica do laboratório LASPE-USP.

Fonte: Autora.

Para análise de rendimento da extração supercrítica dos frutos, o processo utilizando solvente orgânico em sistema Soxhlet foi tido como referência de comparação (*recovery*), conforme demonstrado na Equação 5, considerando que o solvente orgânico irá extrair todas as substâncias graxas. Para o cálculo do rendimento das extrações supercríticas foi considerada a massa de extrato que saiu na abertura do vaso separador mais a massa proveniente da limpeza do equipamento, devido às suas dimensões serem maiores que o volume coletado, é observado aderência do óleo em suas paredes.

$$recovery = \frac{\text{Rendimento da extração em Soxhlet}}{\text{Rendimento da extração Supercrítica}} \quad (5)$$

O rendimento das extrações supercríticas foi obtido através de ensaios realizados para se avaliar a influência das variáveis temperatura, pressão e razão S/F (massa de CO₂/massa de matéria-prima) no processo de extração, conforme demonstrado na Tabela 6. A variável S/F fornece, indiretamente, uma análise do tempo de extração.

Tabela 6: Representação do delineamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, com as variáveis temperatura (32-52 °C), pressão (200-300 bar) e razão S/F (30-90) nos níveis a serem analisados (alto (+1), baixo (-1) e ponto central (0)).

Ensaio	T (°C)	P (bar)	S/F
1	32 (-1)	200 (-1)	30 (-1)
2	52 (+1)	200 (-1)	30 (-1)
3	32 (-1)	300 (+1)	30 (-1)
4	52 (+1)	300 (+1)	30 (-1)
5	32 (-1)	200 (-1)	90 (+1)
6	52 (+1)	200 (-1)	90 (+1)
7	32 (-1)	300 (+1)	90 (+1)
8	52 (+1)	300 (+1)	90 (+1)
9	42 (0)	250 (0)	60 (0)
10	42 (0)	250 (0)	60 (0)
11	42 (0)	250 (0)	60 (0)

Fonte: Autora.

4.4 Planejamento Experimental 2^3 para análise dos efeitos

No planejamento experimental fatorial, os efeitos principais correspondem à mudança da resposta média quando o nível de um fator é alterado de (-1) para (+1), sendo que os outros fatores permanecem constantes. Dessa forma, algebricamente, o efeito principal de cada fator ou variável independente será calculado conforme demonstrado na Equação 6.

$$\text{Efeito principal do fator } A = \bar{y}_{A+} - \bar{y}_{A-} \quad (6)$$

Em que $\bar{y}_{A+}$ é a média da resposta analisada para o nível alto do fator A e $\bar{y}_{A-}$ é a média da resposta analisada para o nível baixo do fator A.

Já a estimativa do efeito de interação entre os fatores estudados é obtida da Equação 7.

$$\text{Efeito de interação } AB = \frac{y_{A+B+} + y_{A-B-}}{n} - \frac{y_{A+B-} + y_{A-B+}}{n} \quad (7)$$

Em que:

y_{A+B+} é a resposta quando os fatores A e B estão no nível alto;

y_{A-B-} é a resposta quando os fatores A e B estão no nível baixo;

y_{A+B-} é a resposta quando o fator A está no nível alto e B no nível baixo;

y_{A-B+} é a resposta quando o fator A está no nível baixo e B no nível alto;

n é o número de ensaios referentes à cada média.

O desvio padrão será calculado através dos pontos centrais, conforme Equação 8:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (y_i - \bar{y})^2}{l-1}} \quad (8)$$

Em que:

y_i é um determinado valor do conjunto de dados;

$\bar{y}$ é a média do conjunto de dados;

l é o número de dados da amostra.

4.5 Extração com solvente orgânico (Soxhlet) e hidrodestilação (Clevenger)

Para a extração com solvente orgânico foi utilizado sistema Soxhlet formada por corneta com uma junta macho e outra junta fêmea (Vidrolabor, São Paulo, Brasil), condensador do tipo bola com junta macho esmerilhada (Vidrolabor, São Paulo, Brasil) e balão de fundo redondo de três bocas de gargalo curto e junta fêmea esmerilhada (500 mL, Laborglas, São Paulo, Brasil), além de manta de aquecimento (Quimis, modelo 6321A-14), termômetro, suporte universal com garra e mufla giratória. A aparelhagem Soxhlet encontra-se demonstrada no Apêndice C. Foram utilizados 200 mL de hexano n.p.a (CAAL reagentes analíticos, São Paulo, Brasil) como solvente orgânico e, aproximadamente, 10 g de matéria-prima, que foram colocadas em papel filtro de média filtração (Química Moderna, ø 12,5 cm) durante 8 h. Após o período de extração, utilizou-se destilação à vácuo para evaporação do solvente e determinação da massa de extrato. A extração foi realizada em triplicata.

A aparelhagem de destilação à vácuo é composta por bomba (Quimis Aparelhos Científicos LTDA, serial number 10040451), Kitassato graduado (Vicil, 1000 mL, São Paulo, Brasil), manta de aquecimento (Quimis, modelo 6321A-14), termômetro, condensador reto com tubo conectante e junta, suporte universal, garra e mufla giratória. A pressão utilizada foi de aproximadamente 500 mmHg e a temperatura de 30-40 °C. A aparelhagem de destilação à vácuo encontra-se demonstrada no Apêndice C.

Já a hidrodestilação foi realizada utilizando aparelhagem de Clevenger (Vidrolabor) com o intuito de se obter o óleo essencial da Sucupira (*Pterodon pubescens*). Ela é composta por trap com torneira, condensador de bolas, balão de fundo redondo de 500 mL e manta de aquecimento (Fisatom, mod. 52E, São Paulo - Brasil). Colocou-se aproximadamente 44 g de matéria-prima triturada no balão e completou-se o volume com água destilada. Assim que a água atingiu sua temperatura de ebulição (100 °C), iniciou-se o período de extração com duração de 2 h.

4.6 Caracterização fitoquímica e métodos analíticos

Para a caracterização fitoquímica foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência HPLC/UV-vis (do inglês *High Liquid Pressure Chromatography*).

4.6.1 Análise em cromatografia de camada delgada (CCD)

Para uma primeira análise qualitativa dos extratos obtidos, foi realizada uma série de cromatografias em camada delgada utilizando padrões de diterpenos vouacapanos já isolados, estabilizados e armazenados pelo laboratório LAFTEX da UNICAMP provenientes do extrato alcoólico da Sucupira (*Pterodon pubescens*). Dentre esses diterpenos, estão os isômeros éster metílico 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapan-17 β -oato e o éster metílico 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β -oato, que já foram reportados em literatura com razão massa/carga m/z 404. Neste trabalho esses isômeros foram chamados de 404. O outro padrão analisado foi o éster 6 α -7 β -dihidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila, reportado na literatura com razão massa/carga m/z 362 (FREITAS, 2019; SPINDOLA *et al.*, 2010). Por esse motivo, este diterpeno foi chamado de 362 no presente trabalho. Além dessas substâncias, também foi analisado o álcool diterpênico geranilgeraniol. Esta análise preliminar foi realizada com o intuito de se investigar o perfil fitoquímico do extrato supercrítico em comparação com o extrato obtido com solvente orgânico e a hidrodestilação, sendo uma técnica simples, satisfatória e de baixo custo. A cromatografia é o processo de análise imediata por migração diferencial dos componentes de uma mistura, sendo formada por fase estacionária, fase móvel e a mistura a ser analisada (MATOS, 2009). A escolha das fases dependerá de características como a polaridade das substâncias a serem separadas.

O eluente, ou fase móvel, utilizado foi uma mistura de tolueno (Sigma-Aldrich®, 99,8%, USA) e acetato de etila (Sigma Aldrich®, 99,5%) nas proporções 91:9 (v:v) e 65:35 (v:v), respectivamente. A fase estacionária utilizada foi sílica gel em cromatoplaça de alumínio 60 F245 (Merck®, 2011, São Paulo, Brasil) e o revelador utilizado foi solução de anisaldeído sulfúrico. A solução de anisaldeído sulfúrico foi preparada com 0,5 mL de anisaldeído (Sigma-Aldrich®, 98%), 10 mL de ácido acético glacial (Synth, 99,7%; Diadema-Brasil), 85 mL de metanol (Sigma- Aldrich®, 99,8%) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (Sigma-Aldrich, 95-98%). Determinou-se a massa de 0,03 g de cada amostra e diluiu-se em 1 mL de acetato de etila (Synth, 99,5%). De cada solução foi retirado 30 µL com auxílio de microseringa (Hamilton, USA) e injetados na placa de sílica gel. Esse procedimento foi repetido para todas as amostras e, assim que a cromatoplaça estava com todas as amostras inseridas, foi colocada em cuba saturada com a fase móvel para completa eluição. Após isso, secou-se a cromatoplaça e revelou-se com a solução de anisaldeído sulfúrico.

Para uma análise semi-quantitativa foi realizada análise de densitometria (POPOVIC NEVENA, 2014) utilizando o *software* ImageJ-win64 (*Image Processing and Analysis in Java*, 2019). O software mede a área correspondente a cada mancha da placa cromatográfica pela quantidade de pixels presente na imagem selecionada. Para isso, construiu-se uma curva com diferentes volumes do padrão 404 (5 µL-35 µL), que foi o que apresentou maior mancha nos testes preliminares com o extrato supercrítico, a partir de uma solução preparada com 0,0034 g deste padrão (LAFTEX- Unicamp) diluída em 1 mL de acetato de etila (Synth, 99,5%).

Na mesma cromatoplaça injetou-se 30 µL de cada amostra diluída anteriormente. A demonstração da cromatoplaça de análise encontra-se na Figura 14.

Figura 14: Esquema da placa de CCD para análise de densitometria para o diterpeno 404.

Fonte: Autora.

4.7 Análise em HPLC/UV-vis (High Liquid Pressure Chromatography)

Após análise inicial em CCD, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em equipamento Shimadzu-Prominence LC-2030C com detector espectrofotômetro UV-visível sem arranjo de diodos (PDA, “*Photodiode Array*”). O equipamento utilizado encontra-se no laboratório de ensino da faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP sendo ilustrado na Figura 15. O método descrito a seguir foi validado pelo laboratório LAFTex da UNICAMP.

Figura 15: Equipamento de HPLC/UV-vis Shimadzu utilizado para análise quantitativa das amostras.

Fonte: Autora.

A fase móvel utilizada foi uma solução de acetonitrila (Bio-grade, 99,95%, Goiás, Brasil) e solução ácida (ácido acético (SYNTH, 99,7%) 0,1%) na proporção de 35:65 filtrada à vácuo utilizando-se membrana filtrante de 0,45 μm (HV-Duraprove, Millipore Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil). A coluna utilizada no equipamento de HPLC foi a Luna 5 μ CN 100A da Allcrom. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 220 nm, sendo 20 μL o volume de injeção de cada amostra, vazão de fluxo de 1 mL/min e 20 min o tempo de corrida com repetição no final.

Foram utilizadas massas das amostras na faixa de 10-40 mg e diluídas em balão volumétrico de 10 mL com acetonitrila (Bio-grade, 99,95%), utilizando-se ultrassom (UltraCleaner 800, Lucadema, São Paulo, Brasil) por 9 min para melhor homogeneização. Para a determinação das curvas partiu-se das soluções padrões de 404 (m/z) e 362 (m/z), preparadas conforme descrito anteriormente, formando uma solução 1:1. Diluiu-se de forma seriada as soluções-mãe em 7 soluções (P1-P7) partindo-se sempre de 5 mL da solução anterior e homogeneizando-se com acetonitrila (Bio-grade, 99,95%) em balão volumétrico de 10 mL. Com os valores de tempo de leitura fornecidas no cromatograma foi possível identificar a presença desses padrões nas amostras. Com a área de cada ponto dos padrões foi possível determinar a curva de calibração, relacionando a área versus a concentração para quantificação nas amostras. Também foi realizada análise qualitativa da presença de β -cariofileno (Sigma-Aldrich®) nas amostras.

4.8 Análise de atividade antioxidante (DPPH)

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Esse método se baseia na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), produzindo um decréscimo de absorbância a 515-525 nm em espectrofotômetro UV (PIRES *et al.*, 2017). O radical DPPH recebe um átomo de hidrogênio da substância antioxidante através de uma reação de oxirredução formando a hidrazina, ocorrendo de forma simultânea a mudança de coloração da solução de púrpura para amarelo claro (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011) .

O procedimento experimental foi baseado no descrito por Pires *et al.* (2017), Alves *et al.* (2010) e Costa *et al.* (2014), sendo mostrado a seguir:

- I. Preparou-se uma solução DPPH (Sigma Aldrich®, lote D9132-1G) 60 μ M (MM= 394,32 g.mol⁻¹): em balão volumétrico dissolveu-se 2,37 mg de DPPH em volume final de 100 mL de álcool etílico absoluto. Homogeneizou-se a solução em ultrassom por 25 min ou vórtex por 40-50 min. Verificou-se a absorbância da solução de DPPH à 525 nm. Ajustou-se a absorbância na faixa de 0,650-0,660. Armazenar na solução em vidro âmbar em geladeira por, no máximo, 10 dias.
- II. Preparou-se solução de Trolox® (Sigma Aldrich®, lote #bcbw5446) pesando-se 4 mg de Trolox® em um tubo falcon de 10 mL, dissolvendo-se em etanol

absoluto. Partindo-se dessa solução de trolox, determinou-se a reta de calibração através do preparo de soluções padrão (P1-P7) de concentrações de 5-200 mg/L, respectivamente.

- III. Determinou-se, através de balança, a massa de 1 mg de cada amostra e diluiu-se em 1 mL de etanol absoluto. Após isso, preparou-se diluições sucessivas (500-31,25 µg/mL).
- IV. Em microplaca, colocou-se 20 µL de cada amostra e 180 µL de DPPH. Repetiu-se para a solução padrão e branco (solução de DPPH).
- V. Realizou-se a leitura imediatamente e após 45 min em espectrofotômetro UV-vis em comprimento de onda de 525 nm.

As medidas de absorção foram feitas em triplicata e a concentração efetiva de extrato necessária para a redução de 50% da concentração de DPPH (EC₅₀) foi determinada graficamente por regressão linear. Para isso, construiu-se uma curva com as amostras em diferentes concentrações versus o seu potencial de inibição (%PI), ou seja, o seu potencial antioxidante, determinado pela Equação 9:

$$PI (\%) = \left[\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{amostra}}{Abs_{DPPH}} \right] \times 100 \quad (9)$$

Em que:

Abs_{DPPH} é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH;

$Abs_{amostra}$ é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra).

Já o equivalente padrão por massa de extrato pode ser calculado com base em um padrão conhecido, por exemplo, o Trolox®, com o qual determinou-se a curva de calibração. Para isso, construiu-se a curva de calibração com as amostras de diferentes concentrações de Trolox® e, através da equação de ajuste da curva, substituiu-se o valor de Y na equação da reta da curva padrão pela absorbância da amostra e calculou-se o valor de X correspondente à equivalência da absorbância da amostra em µg de Trolox®.

4.9 Análise da Atividade Antiproliferativa

Os estudos farmacológicos *in vitro* foram realizados no laboratório LAFTEX da Faculdade de Farmácia da Unicamp sob supervisão da pesquisadora doutora Ana Lúcia Tasca

Gois Ruiz. O teste de atividade antiproliferativa *in vitro* é uma ferramenta que possibilita investigar possível atividade antitumoral de um composto em estudo, possibilitando a triagem de substâncias para testes posteriores *in vivo* e dos mecanismos de ação envolvidos.

A atividade antiproliferativa das amostras foi realizada seguindo o protocolo descrito por Monk *et al.* (1991) e reproduzidas por Fiorito (2016), como demonstrado a seguir.

Empregaram-se 6 linhagens de células tumorais humanas (Tabela 7), gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer/EUA, e uma linhagem não tumoral humana HaCat (queratinócitos). As células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Vitrocell) e uma mistura (Vitrocell) de penicilina: estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 1%) (meio completo).

Tabela 7: Linhagens de células utilizadas, órgão e origem embrionária.

Linhagens	Órgão/Doença	Origem embrionária
U251	SNC; glioblastoma	Ectoderme
MCF7	Mama, adenocarcinoma	Ectoderme
NCI-ADR/RES	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme
786-0	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme
HaCaT	Pele (queratinócito)/ Não tumoral	Ectoderme

Fonte: Adaptado de Fiorito (2016).

As células foram dispostas em placas de 96 compartimentos (100 µL/mL de suspensão celular) e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24 horas de incubação, foram expostas à quatro concentrações (0,15; 1,5; 15 e 150 µg/mL) das amostras em teste, diluídas em DMSO/RPMI (100 µL/compartimento) e incubadas por 48 h a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Para preparação das amostras, uma alíquota de 5-10 mg foi dissolvida em 50-100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO Synth®). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950 µL de meio completo e diluída sucessivamente, com meio, para a preparação das concentrações finais de 0,15; 1,5; 15 e 150 µg/mL. Com base em resultados anteriores da literatura, sabe-se que a concentração final de DMSO não interfere na viabilidade celular (LONGATO, 2014). O esquema da placa utilizada no experimento está na Figura 16.

Figura 16: Representação da placa utilizada nos testes de atividade antiproliferativa *in vitro*.

Fonte: Adaptado de Longato (2014).

Após 48 horas de incubação, a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de TCA (ácido tricloroacético, Sigma®) a 50% e incubadas por 1 hora em geladeira, a 4 °C. O quimioterápico doxorrubicina (Cloridrato de doxorrubicina® - Europharma) foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 0,015 a 15 µg/mL. Logo após essa etapa, as placas foram lavadas em água corrente quatro vezes consecutivas para remoção de resíduos de TCA, meio, soro fetal bovino e metabólitos secundários. O TCA atua como um fixador precipitando proteínas, permitindo que células viáveis se mantenham fixas na placa, enquanto os resíduos se desprendem com a lavagem em água corrente. Uma placa controle, denominada T0, contendo todas as linhagens tumorais avaliadas no experimento, foi fixada com TCA nas condições descritas acima, logo após a adição das amostras nas placas tratadas, a fim de determinar qual a quantidade de células presente no início do experimento.

Após serem secas à temperatura ambiente, todas as placas foram coradas com 50 µL/compartimento de sulforrodamina B (SRB Sigma®) 0,4% (p/v) dissolvida em ácido acético 1% e mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente. A sulforrodamina B é um corante

proteico que se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas de células viáveis no momento da fixação.

Para remoção do excesso de corante, as placas foram lavadas com solução de ácido acético a 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma®). A análise dos resultados foi realizada por leitura espectrofotométrica da absorbância a 540 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax). As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e, através das Equações 10, 11 e 12, foi determinado o crescimento (%) de cada linhagem testada frente às diferentes amostras:

Se $TA > T1$, a amostra estimulou o crescimento. (10)

Se $T1 \geq TA > T0$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(TA - T0) / (T1 - T0)]$ (11)

Se $TA < T0$, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(TA - T0) / (T0)]$ (12)

Sendo que:

TA: a média da absorbância da célula tratada.

T1: o controle de célula.

T0: o controle das células no dia da adição das amostras.

Os dados de absorbância foram analisados e compilados para a construção de gráficos relacionados à porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. Através do software Origin® Pro 8.0, foi feita a regressão não linear do tipo sigmoidal dessas curvas da concentração da amostra e, a partir dela, foram calculadas as concentrações efetivas TGI (*Total Growth Inhibition*, concentração necessária para inibição total de crescimento celular).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima

Os dados referentes ao peneiramento são apresentados na Tabela 8 e os resultados do conteúdo de umidade, massa específica real, massa específica aparente e porosidade do leito encontram-se descritos na Tabela 9. Os valores estão reportados através da média $\pm$ desvio padrão, sendo que para a estimativa da porosidade realizou-se combinação das incertezas por regra de produto/quociente. O diâmetro das partículas não foi uma variável de estudo no processo de extração pois, devido às características de óleo resina dos frutos da *Pterodon pubescens*, ocorre a formação de grumos e, assim, descaracterização rápida do diâmetro resultante da moagem, dificultando sua reprodutibilidade para caracterização do leito de extração.

Tabela 8: Especificações das faixas de diâmetro médio da partícula dos frutos de *P. pubescens* e distribuição granulométrica do seu peneiramento.

Faixa	Tyler (mesh)	Abertura da peneira ¹		$\bar{d}_i$ (mm) ²	x_i (%) ³
		$-d_{i-1}$	$+d_i$		
f_1	-16 +24	-1,00	+0,71	0,843	34,92
f_2	-24 +35	-0,71	+0,42	0,546	34,73
f_3	-35 +48	-0,42	+0,30	0,355	20,59
f_4	-48 +65	-0,30	+0,21	0,251	6,11

Fonte: Autora.

Notas:

¹ $+d_i$ é a abertura nominal da i-ésima peneira, pela qual a partícula ficou retida; e

$-d_{i-1}$ é a abertura de uma peneira maior que a i-ésima peneira, pela qual a partícula passou

²Diâmetro médio das partículas retidas na i-ésima peneira, calculado conforme a equação

Equação 5.

³Fração mássica do material retido na i-ésima peneira.

Tabela 9: Conteúdo de umidade, massa específica real, massa específica aparente, diâmetro médio e porosidade do leito.

Conteúdo de umidade (%b.u.)	ρ_r (g/mL)	ρ_{ap} (g/mL)	D_m (mm)	ϵ
6,40 ± 0,004	1,236 ± 0,007	0,293 ± 0,001	0,56 ± 0,02	0,763 ± 0,007

Fonte: Autora.

Como observado na Tabela 9, o conteúdo de umidade em base úmida mostrou-se em torno de 6%, valor este abaixo do limite no qual a água concorreria com o fluido supercrítico, de forma que a secagem dos frutos não foi necessária.

Na literatura é possível encontrar que Cavalcanti (2013) trabalhou com um diâmetro médio de 0,497 mm e porosidade de 0,76 para a extração supercrítica da casca da *Myrciaria cauliflora*. Já Quispe-Condori *et al.* (2007) obteve um diâmetro médio de 0,492 mm e uma porosidade de 0,68 para a espécie as folhas da *Artemisia annua*, que são valores que se encontram na faixa utilizada pelo presente trabalho. Outra referência para os valores de caracterização da matéria-prima é a classificação Tyler (*International Standard Organization*), na qual são considerados sólidos finos diâmetros entre 4-48 mesh, faixa na qual se encontra o diâmetro médio das partículas dos frutos da Sucupira, proporcionando elevada superfície de contato com o solvente de extração.

5.2 Análise em cromatografia de camada delgada (CCD)

Através da análise de cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível analisar, qualitativamente, o perfil fitoquímico dos extratos produzidos por extração supercrítica (2, 3 e 7), por solvente orgânico (1H) e através de sistema Soxhlet (1S). Ademais, também foram analisados por CCD o padrão de extrato etanólico (PD) cedido pelo laboratório LAFTEX e o padrão de óleo essencial obtido por aparelho Clevenger. Com a utilização dos padrões dos diterpenos vouacapanos 404 e 362, além do álcool linear diterpênico geranilgeraniol, representado pela nomenclatura GGP (geranilgeraniol puro) e GGB (geranilgeraniol bruto), foi possível verificar a presença ou não dessas substâncias conforme demonstrado na Figura 17.

Na primeira placa cromatográfica a fase móvel foi uma mistura de tolueno e acetato de etila (65:35, v:v), apresentando proporção mais polar se comparada com a segunda placa, de

forma que compostos mais polares ou de média polaridade apresentarão melhor eluição (separação). Já na segunda parte, com maior proporção de tolueno (91:9, v:v), tem-se uma melhor separação dos compostos voláteis e apolares. Pela altura da mancha dos padrões 404 (identificado na placa como A (mistura de isômeros) e 404 (mistura de isômeros + diterpeno P5)) e 362, é possível identificá-los nas amostras, sendo que o tamanho da mancha do diterpeno 404 apresenta-se visualmente maior nos extratos supercríticos. Já na segunda placa, é possível observar que o geranilgeraniol apresenta um fragmento de impureza azulado em sua principal mancha, com maior área nas amostras de extração supercrítica. Através da análise, observou-se também que as bandas apresentadas pelo OE (óleo essencial) também estavam presentes nos extratos supercríticos, o que já não foi observado no extrato etanólico PD.

Figura 17: Placas cromatográficas com os padrões m/z 362 (362), m/z 404 (A (mistura de isômeros), 404 (mistura de isômeros + diterpeno P5)), geranylgeraniol (GGP-puro, GGB-bruto), OE (óleo essencial), PD (extrato alcoólico), com os ensaios (7,3,2) e 1H (Soxhlet).

Fonte: Autora.

5.2.1 Análise semiquantitativa via CCD por densitometria

Pela análise qualitativa das amostras, observou-se que o diterpeno vouacapano 404 estava presente em maior quantidade nas amostras de extração supercrítica. Com isso, foi obtida uma curva do padrão 404 correlacionando a área da mancha, medida em pixels e convertida em

cm² através de escala pelo programa ImageJ®, com a massa (µg) conforme esquematizado nas Figura 18 e 19. Foram feitas duas placas cromatográficas para medição em duplicata da área das manchas.

Figura 18: Curva padrão do diterpeno 404 em placa cromatográfica por técnica de densitometria (Tolueno: Acetato de etila, 65:35).

Fonte: Autora.

Figura 19: Curva de calibração da área (cm²) versus a massa do padrão 404 para análise de densitometria em placa cromatográfica.

Fonte: Autora.

Através da equação da reta determinada por ajuste linear aos pontos experimentais, calculou-se a massa de padrão 404 presente em cada amostra e que estão demonstradas na Tabela 10. Essa medição é uma estimativa da massa, já que o método é semi-analítico, podendo apresentar variações quando comparado aos métodos analíticos mais precisos como HPLC e CG-EM (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas). Como o ajuste do modelo foi muito satisfatório, considerou-se como principal fonte de erro as medições para a leitura das áreas de cada mancha.

Tabela 10: Estimativa das concentrações do diterpeno 404 por amostra via densitometria.

Ensaio	Média da área $\pm$ desvio (cm^2)	Conc. 404 ($\mu\text{g/ml}$)	mg de 404/mg de amostra
1	$1,05 \pm 0,05$	$117,39 \pm 9,26$	$0,12 \pm 0,01$
2	$0,88 \pm 0,02$	$89,49 \pm 3,72$	$0,09 \pm 0,00$
3	$0,98 \pm 0,03$	$106,10 \pm 5,43$	$0,11 \pm 0,01$
4	$0,96 \pm 0,06$	$101,56 \pm 10,17$	$0,10 \pm 0,01$
5	$0,95 \pm 0,03$	$99,90 \pm 5,45$	$0,10 \pm 0,01$
6	$0,91 \pm 0,04$	$93,92 \pm 6,26$	$0,09 \pm 0,01$
7	$0,95 \pm 0,01$	$100,43 \pm 1,61$	$0,10 \pm 0,00$
8	$0,96 \pm 0,03$	$102,40 \pm 5,26$	$0,10 \pm 0,01$
9 (PC)	$1,10 \pm 0,04$	$126,48 \pm 7,47$	$0,12 \pm 0,01$
10 (PC)	$1,01 \pm 0,03$	$110,26 \pm 5,54$	$0,11 \pm 0,01$
11 (PC)	$0,98 \pm 0,03$	$104,87 \pm 4,88$	$0,10 \pm 0,01$
Soxhlet	$0,78 \pm 0,03$	$72,31 \pm 5,78$	$0,07 \pm 0,01$

Fonte: Autora.

Analisando os dados é possível observar que, de forma geral, entre os ensaios do delineamento experimental, não foi observada variação significativa na concentração do diterpeno 404. Mas, quando comparada à extração em sistema Soxhlet, a extração supercrítica apresenta-se mais seletiva ao diterpeno 404. A análise em CCD também revelou o leque de substâncias presentes no extrato supercrítico da espécie estudada, mostrando rica composição.

5.3 Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/UV-vis)

Através dos cromatogramas das Figuras 20, 21 e 22 é possível observar os tempos de retenção para os padrões 404, 362 e β -cariofileno.

Figura 20: Identificação do padrão de diterpeno vouacapano 404 com tempo de retenção em torno de 12 min.

Fonte: Autora.

Figura 21: Identificação do padrão de diterpeno vouacapano 362 com tempo de retenção em torno de 8 min.

Fonte: Autora.

Figura 22: Identificação do padrão de β -cariofileno com tempo de retenção em torno de 13,5 min.

Fonte: Autora.

Como o padrão de 404 apresentou impureza relativamente alta, corrigiu-se a curva padrão pela porcentagem mássica apresentada na leitura, que foi de 52,74% para o diterpeno 404 e de 99,04% para o diterpeno 362.

Na Figura 23 é apresentado o cromatograma do ensaio 9 (PC) e na Figura 24 o cromatograma do ensaio 8. Os outros cromatogramas estão presentes no Apêndice A.

O composto diterpeno 404 foi o que apresentou maior concentração em todas as amostras, conforme a intensidade do pico observado nos cromatogramas apresentados. O diterpeno 362 mostrou-se relevante também em todas as amostras assim como o β -cariofileno, característico de óleos essenciais, evidenciando que o extrato obtido é uma mistura do óleo fixo e óleo essencial (LIMA *et al.*, 2005; ALCÂNTARA *et al.*, 2010).

Figura 23: Cromatograma do ensaio 9 (T= 42 °C, P=250 bar, S/F= 60) de extração supercrítica indicando a presença dos diterpenos 404 (12 min), 362 (8 min) e β -cariofileno (13,5 min).

Fonte: Autora.

Figura 24: Cromatograma do ensaio 8 (T=52 °C, P=300 bar, S/F= 90) de extração supercrítica (maior rendimento: 20,9 %) indicando a presença dos diterpenos 404 (12 min), 362 (8 min) e β -cariofileno (13,5 min).

Fonte: Autora.

Os valores mássicos dos padrões 404 e 362 quantificados nas amostras via HPLC estão apresentados na Tabela 11.

Quando comparados os valores do diterpeno vouacapano 362 entre os ensaios do delineamento experimental, não foi observado diferenciação dos valores de massa. Já em relação ao diterpeno vouacapano 404 têm-se uma diferenciação, não muito significativa entre os pontos do delineamento experimental, mas sim quando comparado ao extrato produzido por Soxhlet, corroborando a maior eficiência e seletividade da extração com fluido supercrítico. Da Silva Santos *et al.* (2016) obteve como resultado que as variáveis temperatura e pressão não apresentaram diferenças significativas quanto à atividade antiproliferativa do extrato de *Pterodon pubescens* contra *L. amazonenses* entre os ensaios do delineamento experimental estudado.

Tabela 11: Resultado das variáveis resposta do delineamento experimental realizado para as extrações supercríticas e da extração em Soxhlet, com as concentrações dos diterpenos 404 e 362 estimadas via HPLC/UV-vis.

Ensaio	T (°C)	P (bar)	t(h)	S/F	Rendimento (%)	mg 404/ mg droga vegetal	mg 362/ mg droga vegetal
1	32	200	1	30	7,60	0,13	0,02
2	52	200	1	30	14,00	0,12	0,02
3	32	300	1	30	10,30	0,14	0,02
4	52	300	1	30	19,60	0,13	0,02
5	32	200	3	90	12,40	0,12	0,02
6	52	200	3	90	17,70	0,13	0,02
7	32	300	3	90	12,40	0,14	0,02
8	52	300	3	90	20,90	0,14	0,02
PC	42	250	2	60	16,80	0,14	0,02
PC	42	250	2	60	17,70	0,14	0,02
PC	42	250	2	60	20,00	0,12	0,02
Soxhlet	70	1	8	-	13,05 ± 0,49	0,08	0,02

Fonte: Autora.

Servat *et al.* (2012) obtiveram um rendimento de 40% na extração Soxhlet das sementes da Sucupira (*P. pubescens*) utilizando como solvente diclorometano na proporção mássica 5:1 (solvente/droga vegetal) em temperatura ambiente. Spindola *et al.* (2010) relataram um rendimento de 32% utilizando também diclorometano como solvente em aparelho Soxhlet. Dessa forma, o diclorometano evidencia ter maior seletividade, quando comparado ao hexano, aos compostos de *P. pubescens*. O diclorometano (CH₂Cl₂), além de volátil (T_{eb}= 40 °C), apresenta dois átomos eletronegativos em sua molécula e geometria tetraédrica, conferindo-lhe maior polaridade que o hexano. Essas características podem resultar na diferente seletividade quando comparado os dois solventes. Outro fator de grande influência é a região de origem e a época em que as amostras de Sucupira foram coletadas. A mesma espécie de planta coletada em regiões ou épocas diferentes apresenta perfil fitoquímico distinto, afetando diretamente o rendimento final da extração. Dessa forma, considerando como referência os maiores valores de rendimento mássico em sistema Soxhlet com diclorometano obtidos da literatura, o ensaio 8 do delineamento experimental das extrações supercríticas (de maior rendimento mássico (T=52 °C, P=300 bar e S/F=90)) apresentou um *recovery* médio de 58%. Quando calculado em relação ao rendimento obtido em sistema Soxhlet utilizando hexano como solvente, o *recovery* do ensaio 8 é de 160%.

5.4 Análise dos efeitos das variáveis de processo

O delineamento experimental fatorial foi realizado com o intuito de avaliar o efeito das variáveis temperatura, pressão e razão S/F na extração supercrítica. Através da Tabela 11, observa-se que o maior efeito está na variável resposta rendimento, de forma que não são observadas variações significativas nas concentrações dos diterpenos 404 e 362. Entretanto, as variáveis de processo podem ter sido efetivas para outros marcadores não analisados, o que pode resultar em diferentes perfis do teste antiproliferativo. Com isso, a análise dos efeitos das variáveis de processo no rendimento da extração supercrítica foi evidenciada. Dessa forma, comparando os ensaios 1 e 2 apresentados na Tabela 11, observa-se que em uma pressão de 200 bar e uma razão S/F de 30, que nos fornece um tempo de extração de 1 h, o aumento da temperatura de um nível menor para o nível maior acarretou um efeito positivo e, assim, de aumento no rendimento de 6,4 pontos percentuais. Esse mesmo comportamento é observado na comparação dos ensaios 3 e 4, no qual o aumento de temperatura em um patamar maior de pressão (300 bar) resultou em um efeito positivo e, assim, um aumento de 9,3 pontos percentuais no rendimento, que pode ser facilmente visualizado na Figura 25. Comparando os ensaios 5 e 6, em um patamar maior da razão S/F (correspondente à 3 h de extração) e no nível baixo de pressão, observa-se também um efeito positivo da temperatura e aumento no rendimento de 5,3 pontos percentuais. Já na comparação dos ensaios 7 e 8, o aumento de temperatura do nível menor para o nível maior resultou em um aumento de 8,5 pontos percentuais, estando a pressão e razão S/F no nível alto.

Figura 25: Rendimento mássico em função das variáveis de processo da extração supercrítica, com desvio padrão de 1,65 pontos percentuais.

Fonte: Autora.

Da mesma forma, comparando os ensaios 1 e 3 da Tabela 11, o aumento da pressão do nível menor para um nível maior, sendo a temperatura fixa em 32 °C e a razão S/F fixa em 30, é observado um efeito positivo da pressão e aumento de 2,7 pontos percentuais no rendimento. Em contrapartida, quando comparados os ensaios 5 e 7, agora no nível mais alto de S/F, tem-se que o aumento da pressão não resultou em nenhum efeito no rendimento, como fica evidenciado na Figura 25. Já no patamar de 52 °C e S/F de 90, comparando os ensaios 6 e 8 o aumento da pressão de um nível menor para um nível maior, acarretou aumento de 3,2 pontos percentuais no rendimento.

Para a análise do efeito da razão S/F e, indiretamente do tempo de extração, compararam-se os ensaios 2 e 6, é possível observar um aumento de 3,7 pontos percentuais no rendimento. Através da comparação dos ensaios 3 e 7 também é possível observar um efeito positivo da razão S/F com aumento de 2,1 pontos percentuais no rendimento, assim como na comparação dos ensaios 4 e 8, em níveis maiores de temperatura e pressão, em que o aumento da razão S/F resultou em um aumento de 1,3 pontos percentuais no rendimento.

Com isso, o efeito significativo da temperatura fica evidenciado na Figura 25, sendo possível visualizar no patamar de 300 bar, comparando as barras de cor laranja (referentes à $T=32\text{ }^{\circ}\text{C}$), que a variação decorrente do aumento do tempo de extração (ou razão S/F) é menor que o desvio padrão. Esse resultado também é observado na comparação das barras de cor azul (referentes à $T=52\text{ }^{\circ}\text{C}$). Analisando a variação decorrente do aumento de temperatura, ou seja, da barra de cor laranja para a azul no patamar de 300 bar e S/F=90, observa-se que o efeito foi maior que o patamar do desvio padrão de 1,65 pontos percentuais sendo, desta forma, significativo.

Na análise da regressão linear dos dados, realizada através do *software* Protimiza Experimental Design e apresentada na Tabela 12, corrobora-se o resultado de que a temperatura é a única variável significativa dentre as estudadas, com p-valor menor que 5%. Através do diagrama de Pareto, apresentado na Figura 26, são descritos os efeitos padronizados para cada variável analisada e suas possíveis interações. Porém, quando se analisa a ANOVA para averiguar a qualidade de ajuste, tem-se que o modelo proposto não é significativo e não pode ser considerado adequado para descrever o rendimento da extração supercrítica. Isso se deve ao fato de o coeficiente de determinação (R^2) ser menor que 0,9 e o F_{calc} da falta de ajuste em relação ao erro puro ser maior que o F_{tab} , com p-valor superior a 0,05, conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 12: Coeficientes da regressão linear, erro padrão, t_{calc} e p-valor para o planejamento experimental realizado em relação à resposta rendimento.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	$t_{\text{calculado}}$	p-valor
Média	15,4	0,92	16,76	0,0001
Temperatura	3,69	1,08	3,43	0,0266
Pressão	1,43	1,08	1,33	0,2547
S/F	1,48	1,08	1,37	0,2411
T x P	0,77	1,08	0,71	0,5149
T x S/F	-0,23	1,08	-0,21	0,8405
P x S/F	-0,64	1,08	-0,6	0,5823

Fonte: Autora.

Uma das possíveis justificativas para o modelo proposto não ter sido significativo seja o fato da razão S/F, que indiretamente representa o tempo de extração supercrítica, ter sido considerada como variável de entrada no planejamento experimental. A análise do tempo de extração como variável independente na análise de um planejamento experimental requer

atenção pois, dependendo do tipo de processo, o efeito do tempo pode acarretar o mascaramento das outras variáveis. Isso ocorre principalmente no caso de processos em batelada, no qual o tempo acaba apresentando forte influência no regime transiente.

Figura 26: Gráfico de Pareto para as variáveis de processo e suas possíveis interações em um nível de significância de 5%.

Fonte: Autora.

Tabela 13: Resultado da ANOVA para o modelo obtido através da regressão linear.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	151,6	6	25,3	2,7	0,1759
Resíduos	37,1	4	9,3		
Falta de Ajuste	31,7	2	15,8	5,8	0,1467
Erro Puro	5,4	2	2,7		
Total	188,7	10			

$$R^2 = 80,32\%$$

Fonte: Autora.

No trabalho de Bispo *et al.* (2005) sobre o processo de alcalinização do cacau e a avaliação de sua qualidade, foram analisadas as variáveis temperatura (60 - 120 °C), tempo (30-150 min) e concentração de K_2CO_3 (1,22 - 4,78%). No caso, o tempo não foi estatisticamente significativo dentro das condições estudadas, não comprometendo a análise do efeito das outras variáveis. Já no trabalho de Scanavini (2006) sobre destilação em batelada do aroma natural de caju, o tempo foi considerado como variável independente em um planejamento experimental

preliminar. Após análise dos resultados, a autora decidiu retirar o tempo pois, como o processo era em batelada, o risco dessa variável mascarar o efeito das demais era considerável, de forma que o tempo acabasse sendo a única variável significativa. De forma geral, em processos de secagem, fermentação e processos em batelada não é recomendado o uso do tempo como variável independente, sendo que para outros estudos dependerá da análise de cada caso (SCANAVINI, 2006).

Outra possível razão para o modelo não ser significativo seja a escolha do planejamento realizado, já que o modelo estudado possa não ser linear, e sim quadrático. Nesse caso, um delineamento completo rotacional (DCCR), com a inserção de pontos axiais, apresentaria um melhor ajuste aos dados experimentais.

Neste trabalho o processo é semi-contínuo e, conforme pode ser observado no diagrama de Pareto, o tempo, indiretamente contido na razão S/F, não se mostrou significativo em um nível de significância de 5%, fortalecendo a hipótese da escolha do modelo de planejamento não ter sido adequada. Outras justificativas para o modelo não ser adequado possa ser uma variabilidade intrínseca do processo considerável, acarretando valores altos de desvio padrão das respostas analisadas.

No estudo de Mateus *et al.* (2018), no qual investigou-se a extração supercrítica dos frutos de *Pterodon spp.* com as variáveis pressão (100-220 bar) e temperatura (40-60 °C), obteve-se efeito negativo para a temperatura e positivo para a pressão, com maior rendimento de 21,2% para T= 40 °C e P= 220 bar. Esse comportamento indica uma possível presença do ponto de inflexão da densidade do fluido supercrítico no intervalo escolhido e, com isso, variação do poder de solvatação. Diferentemente, no presente estudo ocorreu maior efeito da temperatura evidenciando uma possível saturação do efeito de solvatação do fluido supercrítico pelo aumento da pressão a partir do patamar de 250 bar. Quando a extração é realizada à pressão constante, o aumento da temperatura pode acarretar a diminuição da densidade do CO₂, levando à diminuição do poder de solvatação do fluido como demonstrado na Figura 8 do Capítulo 3 (BRUNNER, 2005; VASCONCELLOS, 2007). Por outro lado, o aumento da temperatura acarreta também ao aumento da solubilidade dos compostos devido ao efeito positivo na pressão de vapor das substâncias presentes na matriz vegetal, principalmente as mais voláteis, resultando em um maior rendimento de extração.

Zuknik *et al.* (2016) observaram, no estudo sobre o óleo de coco, aumento da solubilidade com o aumento da temperatura no intervalo de pressão de 310-345 bar, enquanto

para pressões entre 207-241 bar ocorreu diminuição da solubilidade com o aumento da temperatura. Esse comportamento caracteriza que, na região estudada, ocorreu o cruzamento da solubilidade, como demonstrado na Figura 6. Observou-se, por fim, que a solubilidade era independente da temperatura em uma pressão de 295 bar.

Como observado na Tabela 11, o maior rendimento foi obtido no nível superior do delineamento, com pressão de 300 bar, temperatura de 52 °C e razão S/F de 90, sendo de 20,9% (mássico).

5.5 Análise do teste antiproliferativo com células de câncer *in vitro*

Nas Figuras 27 e 28 são apresentados os gráficos gerados que relacionam o crescimento celular em função da concentração para os ensaios 2 e 8, respectivamente. O crescimento celular em função da concentração para as outras amostras encontram-se no Apêndice B. O Quadro 3 traz um resumo para os principais pontos observados no teste antiproliferativo para cada amostra em relação a cada linhagem de célula estudada.

Figura 27: Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *P. pubescens* (ensaio 2) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 28: Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *P. pubescens* (ensaio 8) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Quadro 3: Principais efeitos observados no teste antiproliferativo para as amostras de extração supercrítica e em sistema Soxhlet nas linhagens de células humanas tumorais e não tumoral *in vitro*.

	Linhagens de células humanas							
Ensaio/Amostra	U251 (Glioma)	MCF7 (Mama)	NCI-ADR/RES (Ovário)	786-0 (Rim)	NCI-H460 (Pulmão)	PC-3 (Próstata)	HaCat (Não tumoral)	
1	*Efeito citocida	*Efeito citocida	**Citostático (15 µg/mL, 1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)	**Citostático (15 µg/mL e 1,5 µg/mL)	*Efeito citocida	*Efeito citocida	***Baixo efeito citocida	
2		**Citostático (15 µg/mL e 1,5 µg/mL)	**Citostático (15 µg/mL)	**Citostático (15 µg/mL e 1,5 µg/mL)		**Citostático (15 µg/mL)	***Baixo efeito citocida	
3		*Efeito citocida	**Citostático (15 µg/mL)	**Citostático (25 µg/mL)		**Citostático (15 µg/mL)	***Baixo efeito citocida	
4		Sem efeito citocida	*Efeito citocida	***Alto efeito citocida	Sem efeito citocida	*Efeito citocida	*Efeito citocida	
5		*Efeito citocida		*Efeito citocida	*Efeito citocida			*Efeito citocida
6								
7			**Citostático (15 µg/mL, 1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)	**Citostático (15 µg/mL, 1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)				
8			**Citostático (15 µg/mL, 1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)	***Baixo efeito citocida				
9(PC)			*Efeito citocida	**Citostático (15 µg/mL)	**Citostático (15 µg/mL)	*Efeito citocida		
Doxorrubicina	**Citostático (1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)	**Citostático (15 µg/mL, 1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)	**Citostático (1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)	**Citostático (0,15 µg/mL)	**Citostático (15 µg/mL, 1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)	**Citostático (1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)	**Citostático (1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL)	
Soxhlet	*Efeito citocida	*Efeito citocida	*Efeito citocida	**Citostático (15 µg/mL)	*Efeito citocida	*Efeito citocida	*Efeito citocida	

*Efeito citocida na concentração de 150 µg/mL; **Além do efeito citostático também apresentaram efeito citocida; *** Baixo efeito citocida quando comparada às outras linhagens estudadas. Fonte: Autora.

A avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* neste trabalho foi realizada com o intuito de investigar possíveis diferenças na atividade biológica do extrato supercrítico de *P. pubescens* quando comparado aos métodos convencionais de extração. Para isso, empregou-se o corante Sulforrodamina B (SRB), que é um corante com elevada afinidade à componentes proteicos que se liga, especificamente, aos resíduos básicos de aminoácidos das proteínas do interior das células. Com isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra em análise. O ácido tricloroacético (TCA) foi utilizado para fixação das células viáveis, uma vez que atua como fixador precipitando proteínas. Dessa forma, as células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis são eliminadas na lavagem, caracterizando ser uma técnica rápida, eficiente e de alta reprodutibilidade (SKEHAN *et al.*, 1990; HOUGHTON, 2007). Os gráficos gerados após a leitura das absorbâncias relacionam a porcentagem de crescimento celular à concentração das amostras testadas, sendo que valores entre 50% e 0 representam inibição do crescimento celular (amostra citostática); valores abaixo de zero (negativos) representam morte celular (amostra citocida), pois a quantidade de células (inferida pela absorbância no final do experimento através das proteínas coradas, T1) é menor do que aquela que iniciou o experimento (T0). Destes gráficos resultam três medidas: O valor de GI₅₀ (50% *growth inhibition*), que representa a concentração necessária para inibir 50% do crescimento das células, o valor que corta o eixo do zero, refere-se ao TGI (*Total growth inhibition*), que representa a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento das células e, por fim, tem-se o LC₅₀ (50% *lethal concentration*) que representa a concentração necessária para matar 50% das células.

Através do Quadro 3, é possível observar que todas as amostras apresentaram atividade antiproliferativa caracterizada por efeito citocida na concentração de 150 µg/mL. O ensaio 1 apresentou, além do efeito citocida para todas as linhagens, efeito citostático para as linhagens 786-0 (Rim) e NCI/ADR (Ovário) para as concentrações de 15 µg/mL, 1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL. Como demonstrado na Figura 27, o ensaio 2 apresentou perfil antiproliferativo semelhante para a linhagem NCI-H460 (Pulmão), além de efeito citostático para as linhagens 786-0 e MCF-7 nas concentrações de 15 µg/mL e 1,5 µg/mL. O ensaio 2, assim como o ensaio 3, apresentou menor efeito citocida para a linhagem HaCat (células saudáveis), juntamente com os ensaios 1 e 8, quando comparado às outras linhagens analisadas. Esse resultado é muito importante, haja vista que a linhagem HaCat é não tumoral, indicando maior efeito farmacológico dos extratos no combate às linhagens tumorais com baixo dano às células

saudáveis. Já o ensaio 4 apresentou acentuado efeito citocida para a linhagem 786-0 (Rim), sem efeito citocida para as linhagens NCI-H460 (Pulmão) e MCF7 (Mama). Os ensaios 5 e 6 apresentaram apenas efeito citocida na concentração de 150 µg/mL e baixa citotoxicidade para a linhagem HaCat. O ensaio 7 apresentou efeito citocida e citostático para as linhagens 786-0 (Rim) e NCI/ADR (Ovário) nas concentrações de 1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL. O ensaio 8, conforme demonstrado na Figura 28, apresentou forte efeito citocida e citostático para a linhagem 786-0 (rim) nas concentrações de 15 µg/mL, 1,5 µg/mL e 0,15 µg/mL. Já o ensaio 9 (Ponto Central) e a amostra produzida em sistema Soxhlet mostraram efeito citostático na concentração de 15 µg/mL para as linhagens PC-3 (Próstata) e 786-0 (Rim).

Dessa forma, tem-se que os extratos supercríticos foram mais seletivos para a linhagem 786-0 (Rim), sendo que algumas amostras também apresentaram efeitos citocida e citostático para as linhagens PC-3 (Próstata), MCF-7(Mama) e NCI/ADR (Ovário). O ensaio 2 apresentou, através da classificação utilizada por Fouche *et al.* (2008), atividade antiproliferativa moderada (6,25 µg/mL <TGI <15 µg/mL) para a linhagem 786-0 (Rim), como demonstrado na Tabela 14. Founche *et al.* (2008) utiliza os valores de TGI (*Total Growth Inhibition*, concentração necessária para inibição total de crescimento celular) para criar faixas de classificação de atividade antiproliferativa, de forma que: TGI > 50 µg/mL= Inativa (I), 15 µg/mL <TGI <50 µg/mL= fraca (F), 6,25 µg/mL <TGI <15 µg/mL= moderada (M) e TGI <6,25 µg/mL= potente (P) (FOUCHE *et al.*, 2008). O ensaio 8, que apresentou maior rendimento, também parece promissor para a linhagem 786-0 pois seu valor ficou no limiar da faixa de fraco para moderado, assim como o ensaio 2 para a linhagem de câncer de mama (MCF7).

Tabela 14: Concentração efetiva TGI (*Total growth inhibition*) das amostras de extração supercrítica, em sistema Soxhlet e Doxorubicina para as linhagens de células tumorais e não tumoral estudadas.

Amostra/Ensaio	u	m	a	7	4	p	medTGI	q
Doxo	0,13	2,2	1,5	0,1	0,22	0,61	0,79	0,16
1	36,8F	31,9F	15**F	23,0F	50,0F	32,0F	31,4**	68,9I
2	32,4F	16,6F	28,4F	14,0M	127,8I	28,2F	41,2	69,7I
3	37,8F	22,9F	25,4F	15**F	128,6I	29,1F	43,1**	36,9F
4	65,1 I	*	54,0I	26,0F	*	81,3I	>87,7	92,3I
5	38,0F	29,9F	28,0F	27,2F	45,1F	23,7F	32	42,9F
6	24,1F	29,1F	30,3F	15**F	33,4F	24,2F	26,0**	40,8F
7	44,1F	43,3F	32,4F	25,8F	26,4F	25,2F	32,9	26,1F
8	32,8F	34,6F	27,9F	15,4F	39,6F	28,2F	29,7	48,9F
9(PC)	35,2F	26,1F	32,9F	25,8F	53,7I	23,6F	32,9	46,2F
Soxhlet	34,2F	28,1F	30,1F	24,7F	26,3F	29,3F	28,8	39,4F

Linhagens tumorais humanas: u: U251 (glioblastoma); m: MCF7 (mama); a: NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7: 786-0 (rim); 4: NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p: PC-3 (próstata). Linhagem não-tumoral humana: q: HaCaT (queratinócitos imortalizados). * TGI > 150 µg/ml; ** valor aproximado.

Classificação da atividade antiproliferativa para os extratos: inativa (I; TGI > 50 g/mL), fraca (F; 15 µg/mL <TGI <50 µg/mL), moderada (M; 6,25 µg/mL <TGI <15 µg/mL) e potente (P; TGI <6,25 µg/mL) (Fouche et al., 2008). Fonte: Autora.

Outro gráfico interessante para a análise do teste antiproliferativo é o diferencial relativo às linhagens celulares analisadas demonstrado na Figura 29, tendo como base a média de TGI. É calculado o log do TGI médio de todas as linhagens tumorais para cada amostra analisada. Esse valor médio é subtraído do valor de concentração total apresentado por cada linhagem de célula individual e plotado, de forma que as linhagens celulares mais sensíveis são visualizadas como barras que se desviam para a direita, enquanto as mais resistentes apresentam-se à esquerda.

Figura 29: Diferencial citotóxico para as linhagens celulares em relação à média (TGI).

Fonte: Autora.

Como pode ser observado na Figura 29, as linhagens 786-0 (Rim), PC-3 (Próstata), MCF-7 (Mama) e NCI-ADR/RES (Ovário) apresentaram maior sensibilidade aos extratos

supercríticos. De maneira geral, a linhagem NCI-H460 (Pulmão) foi a menos sensível. Spindola *et al.* (2009) estudaram a atividade antiproliferativa de substâncias isoladas do extrato diclorometânico da *P. pubescens* e encontrou alta seletividade dos compostos éster 6 α ,7 β -dihidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila (m/z 362), 6 α -7 β -dihidroxi-vouacapan-17 β -metilenol, além do composto inédito 6 α -acetóxi-7 β -hidróxi-vouacapano, para a linhagem PC-3 (Próstata). No estudo do efeito antinociceptivo do geranilgeraniol e éster 6 α -7 β -dihidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila (m/z 362) isolados de *P. pubescens*, Spindola *et al.* (2010) obtiveram resultados que sugeriram efeito interativo sinérgico entre os compostos. No caso, o extrato bruto (300 mg/Kg) contendo concentrações mais baixas de geranilgeraniol (11,5% - 34,6 mg/Kg) e do éster m/z 362 (1,5% - 4,7 mg/Kg) apresentou estatisticamente o mesmo efeito que os compostos puros separadamente em modelo experimental de rota oral (SPINDOLA *et al.*, 2010). Lloret *et al.* (2016) também estudaram a atividade antiproliferativa dos compostos éster 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β - oato de metila (m/z 404), éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi vouacapan-17 β -oato de metila (isômero m/z 404) e do éster 6 α -7 β -dihidroxi-vouacapan-17 β -oato de metila (m/z 362) isolados do extrato obtido com diclorometano obtendo TGI = 11,43 μ g/mL para a linhagem PC-3 (Próstata).

Com isso, analisando as diferentes seletividades apresentas pelas amostras no teste antiproliferativo, há indícios de que as alterações na composição química evidenciadas pelas análises por CCD e HPLC/UV-vis, decorrentes das variáveis de processo estudadas, resultaram em modulação da atividade antiproliferativa tanto entre as condições testadas quanto em relação aos estudos referidos na literatura. Ademais, os resultados da atividade antiproliferativa *in vitro* parecem reforçar a importância da interação entre os vouacapanos e o geranilgeraniol nas respostas farmacológicas.

Dessa forma, o presente trabalho mostra um resultado interessante para os extratos supercríticos de *P. pubescens*, já que demonstraram atividade antiproliferativa moderada para células tumorais de rim (786-0), além da linhagem de câncer de próstata (PC-3).

5.6 Análise do teste inicial de potencial antioxidante (Método DPPH)

O teste de atividade potencial antioxidante através do método DPPH baseia-se na reação de oxirredução, onde o radical DPPH, de coloração violeta, é reduzido para DPPH-H (DPPH reduzido e estável), alterando a coloração da mistura para amarelo. Dessa forma, um dos

primeiros resultados a se observar no teste é a mudança de coloração que, juntamente com a leitura da absorbância a 525 nm, indicarão se há potencial antioxidante na amostra. Na Figura 30 é possível observar que não ocorreu mudança de coloração considerável do roxo para o amarelo na placa de leitura, evidenciando baixo poder antioxidante.

Figura 30: Placa com as amostras e o radical DPPH para análise de poder antioxidante.

Fonte: Autora.

Na Tabela 15 é possível observar os potenciais de inibição e equivalente em Trolox® calculados para os ensaios 6, 8, ponto crítico (PC) e Soxhlet. O equivalente em Trolox® é calculado com base em um padrão conhecido, no caso o Trolox®. Para tal, a curva padrão (Figura 31) foi construída para se calcular, através do valor de absorbância, qual seria o equivalente para a amostra analisada. Para o cálculo do equivalente em Trolox® foi utilizada a absorbância da maior concentração testada. Os valores corroboram o resultado obtido previamente através da coloração para o baixo potencial antioxidante do extrato supercrítico de *P. pubescens*.

Tabela 15: Resultados do método DPPH para os ensaios 6, 8, 9 (PC) e produzido em sistema Soxhlet.

Amostra/ Ensaio	S/F	T (°C)	P (bar)	DPPH		
				PI (%)	EC ₅₀ (µg/cm ³)	E. Trolox® (µg Trolox®/µg amostra, b.u.)
6	90	52	200	2,96 ± 0,77	> 500	0,80 ± 0,09
8	90	52	300	3,83 ± 0,73	> 500	0,91 ± 0,09
9 (PC)	60	42	250	4,74 ± 2,57	> 500	1,02 ± 0,30
Soxhlet	-	68	1	2,57 ± 0,74	> 500	0,76 ± 0,09

Fonte: Autora.

O EC₅₀, devido ao baixo valor do potencial antioxidante, foi expresso como maior que a maior concentração analisada no ensaio, no caso 500 µg/mL.

Figura 31: Curva de calibração Trolox® (% de inibição versus conc. de Trolox®) utilizada na estimativa do equivalente em Trolox® das amostras analisadas.

Fonte: Autora.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que a extração supercrítica dos frutos de *P. pubescens*, utilizando CO₂ como solvente, mostrou-se mais eficiente em relação ao rendimento obtido e à concentração dos diterpeno vouacapano 404, quando comparada à extração em sistema Soxhlet utilizando hexano como solvente. Através do delineamento experimental fatorial realizado, foi possível verificar que a temperatura foi a variável de processo com maior efeito sobre o rendimento da extração supercrítica. No nível superior do planejamento experimental, igual a 52 °C, pressão de 300 bar e S/F igual a 90, foi obtido o maior rendimento mássico, de 20,9%.

Com a análise de cromatografia em camada delgada (CCD), foi possível observar a variabilidade de substâncias presentes no extrato da *Pterodon pubescens*, assim como, avaliar qualitativamente a presença dos diterpenos 404, 362 e do álcool geranilgeraniol. Além disso, os extratos supercríticos foram comparados com o extrato alcoólico e com o extrato obtido em sistema Soxhlet utilizando hexano, além do óleo essencial obtido via Clevenger. Foi possível observar uniformidade no tamanho das manchas dos diterpenos entre as amostras supercríticas, mostrando-se maior quando comparado ao extrato hexânico.

A análise através de HPLC/UV-vis mostrou não haver diferenciação significativa das concentrações dos diterpenos 404 e 362 entre os ensaios do delineamento experimental das extrações supercríticas, mas, quando comparado ao extrato obtido através de sistema Soxhlet com hexano, mostrou-se mais significativa. A concentração do diterpeno 404 para a amostra de maior rendimento foi de 0,14 mg / mg de droga vegetal e de 0,02 mg do diterpeno 362 / mg de droga vegetal. A presença de β -cariofileno também foi confirmada através da utilização de padrão, corroborando que o extrato supercrítico obtido é uma mistura entre óleo fixo e óleo essencial, também evidenciada pela CCD.

Ademais, o teste antiproliferativo realizado com linhagens tumorais *in vitro*, além de confirmar os efeitos citocida e citostático já comprovados em literatura para os extratos alcoólico e com diclorometano, apresentou maior seletividade dos extratos supercríticos para a linhagem 786-0 (Rim), com classificação de atividade moderada ((M; 6,25 g/mL <TGI <15 g/mL; Founche *et al.* (2008)). Essas diferentes seletividades entre as amostras evidenciaram que as variáveis de processo foram efetivas para outro marcador não analisado em HPLC, como o geranilgeraniol, que pode apresentar sinergismo com os diterpenos 404 e 362. Por fim, a

determinação do potencial antioxidante do extrato supercrítico através do método DPPH mostrou baixo poder antioxidante das amostras, com EC_{50} maior que 500 $\mu\text{g/mL}$.

7. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

A investigação da variabilidade química do extrato, como a presença de geranilgeraniol, para análise de efeitos sinérgicos no teste antiproliferativo, assim como o estudo do mecanismo de ação, seriam de importante contribuição para a evolução deste trabalho. O estudo da extração supercrítica utilizando cossolvente, juntamente com o CO_2 supercrítico, possibilitaria a análise de diferentes perfis do extrato assim como de possíveis incrementos no rendimento da extração. Uma outra abordagem do planejamento experimental, com a realização de um DCCR e análise da cinética de extração, poderia fornecer uma análise de modelo estatístico e otimização do processo. Por fim, a análise de viabilidade econômica da extração supercrítica da Sucupira possibilitaria a construção de cenários mercadológicos e de aumento de escala.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTI, T.B.; MARCON, R.; BICCA, M.A.; RAPOSO, N.R.B; CALIXTO, J.B.; DUTRA, R.C. Essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating Th1/Treg cell balance. **J. Ethnopharmacol**, vol. 155, p. 485–494, 2014.
- ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; SILVA, J. R. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 3, p. 567–572, 2010.
- ALMEIDA, D.F.L.S. **Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2017.
- ALVES, R. C.; COSTA, A. S. G.; JEREZ, M.; CASAL, S.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J.; OLIVEIRA, B. Antiradical Activity, Phenolics Profile, and Hydroxymethylfurfural in Espresso Coffee: Influence of Technological Factors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12221-12229, 2010.
- ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; PAULA, J. A. M.; VIEIRA, R. F.; FERRI, P. H.; COUTO, R. O.; PAULA, J. R. P.; BARA, M. T. F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 2, p. 224–229, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000016>>.
- AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v.34, p.1-20, 2011.
- ARRAIS-SILVA, W. W.; NUNES, P.S.G.; CARVALHO, J.D.; BRUNE, M.W.; ARRAIS-LIMA, C.; BATALINI, C. Preliminary phytochemical and antileishmanial studies of the ethanolic extracts of *Pterodon pudescens*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 561–565, 2014.
- ARRIAGA, A. M. C.; CASTRO, M.A.B.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R. Further Diterpenoids Isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 2, p. 187–190, 2000.
- BARTON, P.; HUGHES, R.E.; HUSSEIN, M. M. Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 5, p. 157–162, 1992.
- BISPO, E. S.; FERREIRA, V.L.P.; SANTANA, L.R.R.S.; YOTSUYANAGI, K. Perfil sensorial de pó de cacau (*Theobroma cacao* L.) alcalinizado. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, Campinas, nº 25(2): 375-381, 2005.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, Vol. 32, no. 3, 588-594, 2009.
- BHAVNANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Curr Opin Microbiol.**, v. 3, p. 528–534, 2000.

- BRAGA, M. E. M. Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo. **Dea-Fea**, Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas, 2005.
- BRANDON, K. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. n. March 2014, 2005.
- BROGLE, H. Carbon dioxide as a solvent: its properties and application. **Chemistry and Industry**, vol. 12, p. 385-390, 1982.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Editora Acribia, 1991.
- BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. New York: Darmstadt: Steinkopff; Springer., 1994.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.
- BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 87, 218-228, 2014.
- BUSTAMANTE, K. G. L.; LIMA, A. D. F.; SOARES, M. L.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; BARA, M. T. F.; PIMENTA, F. C. ; PAULA, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) - Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 341–345, 2010.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141–2153, 2004.
- CABRAL, E. C.; SEVART, L.; SPINDOLA, H. M.; COELHO, M. B.; SOUSA, I. M. O.; QUEIROZ, N. C. A.; FOGLIO, M. A.; EBERLIN, M. N.; RIVEROS, J. M. *Pterodon pubescens* Oil: Characterisation, certification of origin and quality control via mass spectrometry fingerprinting analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 2, p. 184–192, 2013.
- CAMPIOL DOS SANTOS, J. Extração com fluido supercrítico e suas aplicações na obtenção de produtos naturais. p. 40, 2011.
- CAMPOS, A.M.; CRAVEIRO, A.A.; TEIXEIRA, T. C. Óleo essencial *Polygalaeflorus benth*. **Reunião da sociedade brasileira de química PN-004**, 1990.
- CARVALHO, J. C. T.; SERTIÉ, J. A. A.; BARBOSA, M. V. J.; PATRÍCIO, K. C. M.; CAPUTO, L. R. G.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. P.; BASTOS, J. K.. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 127–133, 1999.
- CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. 1ª ed. [s.l.] EDITORA TECMEDD, 2004.
- CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: Determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutricao**, v. 24, n. 1, p. 173–187, 2011.
- CAVALCANTI, R. N. **Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química,**

avaliação econômica e modelagem matemática. 2013. Unicamp, Campinas, 2013.

CLARKE, C. J.; TU, W.C.; LEVERS, O.; BRÖHL, A.; HALLETT, J. P. Green and Sustainable solvents in chemical processes. **Chem. Rev.** 2018, 118, 747-800.

CLIFFORD, T. **Fundamentals of supercritical fluids.** 1^a ed. NEW YORK: OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1999.

COELHO, L. P.; REIS, P. A.; CASTRO, F. L.; GAYER, C. R. M.; LOPES, C. S.; SILVA, M. C. C.; SABINO, K. C. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 109-116, 2005.

COLE, L.; HEARD, C. Skin permeation enhancement potential of *Aloe Vera* and a proposed mechanism of action based upon size exclusion and pull effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, n. 1-2, p. 10-16, 2007.

CONDORI, S. Q. **Avaliação de metodologias experimentais para a determinação do coeficiente de difusão efetivo na extração de óleos essenciais com fluido supercrítico .** Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2002.

CONSTANTINOU, L.; GANI, R.; O'CONNELL, J. P. Estimation of the acentric factor and the liquid molar volume at 298K using a new group contribution method. **Fluid Phase Equilibria**, v. 103, n. 1, p. 11-22, 1995.

CORREA, H. A. M. **Compostos bioativos de extratos naturais: Combinação de processos de extração com dióxido de carbono supercrítico, etanol e água.** Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2010.

COSTA, A.S.G.; ALVES, R.C.; VINHA, A.F.; BARREIRA, S.V.P.; NUNES, M.A.; CUNHA L.M. AND OLIVEIRA, M. B. P. P. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. **Industrial Crops and Products**, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.

DA SILVA SANTOS, E.; GARCIA, F. P.; OUTUKI, P. M.; HOSCHIED, J.; NUNES DE GOES, P. R.; CARDOSO-FILHO, L.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, M. L. C. Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* Benth. fruit extracts. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 252-260, 2016.

DE MORAES, W. F.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; VANDERLINDE F. A.; BARA, M. T. F.; COSTA, E. A.; DE PAULA, J. R. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 1, p. 202-207, 2012.

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; CLAUDINO, F. S.; ALMEIDA, R. N.; LEITE, J. R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 170-175, 2007.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441-2469, 2006.

DIMITROVA, V.; KANEVA, M.; GALLUCCI, T. Customer knowledge management in the natural cosmetics industry. **Industrial Management & Data Systems**, v. 109, n. 9, p. 1155–1165, 2009.

DONATI, M.; CHEN, Z.; MONDIN, A.; MIRANDA, F. M. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: Estragole, trans -anethole, β -caryophyllene and myrcene. **Natural Product Research**, v. 29, n. 10, p. 939–946, 2015.

DUTRA, R. C.; ALVES, C. C. S. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 243–250, 2009.

EVANGELISTA, G. L.; COELHO-de-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A. B.; SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 515–522, 2007.

FATIMA, A.; ALOK, S.; AGARWAL, P.; SINGH, P.P.; VERMA, A. Benefits of herbal extracts in cosmetics: A review. **IJPSR**, v. 4, n. 10, p. 3746–3760, 2013.

FAVARETO, R. **Extração de compostos bioativos utilizando CO₂ supercrítico de espécies do Cerrado**. 2016. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, 2016.

FAVARETO, R.; TEIXEIRA, M. B.; SOARES, F. A. L.; BELISÁRIO, C. M.; CORAZZA, M. L.; CARDOZO-FILHO, L. Study of the supercritical extraction of *Pterodon* fruits (Fabaceae). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, n. December 2016, p. 159–165, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.028>>.

FERREIRA, S. B.; DANTAS, I. C.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 225–230, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722014000200009>>.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, n. 3, p. 235–245, 1999.

FIORITO, G. F. Atividade antiproliferativa e ação estrogênica/antiestrogênica de extratos e frações de algumas espécies de *Mentha* (Lamiaceae). p. 138, 2016. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/304965/1/Fiorito_GiovannaFrancisco_D.pdf>.

FOLLEGATTI-ROMERO, L. A. “ Extração de óleo de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) com dióxido de carbono supercrítico ”. 2007.

FOUCHE, G.; CRAGG, G. M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V. J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 455–461, 2008.

ROQUE, F.P.; ANÍBAL, P.C.; BUSATO, S.N.; BONI, G.C.; HOFLING, J.F.; QUEIROZ, N.C.A.; FOGLIO, M.A. *In vitro* anti-fungal activity of a new compound isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 3, n. May, p. 55–61, 2015.

FREITAS, P. A. B. **Desenvolvimento de lipossomas com a superfície modificada por ácido**

hialurônico para aplicação tópica do extrato de *Pterodon pubescens Benth.* Tese de Mestrado em Engenharia Química, Unicamp, 2019.

FUKUZATO, R. Current Status of Supercritical Fluid Technology in the East Asia. In: França. **Anais...** França: 6th International Symposium on supercritical fluids, 2003.

GONZÁLES-BURGOS, E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene compounds in nature: A review of their potential antioxidant activity. **Current Medicinal Chemistry**, 19, 5319:5341, 2012.

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. **Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide.** **Journal of Chemical Engineering of Japan**, 1993.

GWEHENBERGER, G.; NARODOSLAWSKY, M. Sustainable processes - The challenge of the 21st century for chemical engineering. **Process Safety and Environment Protection** 86, 321-327, 2008.

GRANDO, R. ***Pterodon pubescens Benth.*: Avaliação do efeito sinérgico dos vouacapanos e geranilgeraniol sobre atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antiulcerogênica *in vivo*.** Tese de Doutorado em Ciências Médicas, Universidade estadual de Campinas, Unicamp, 2017.

GRANDO, R.; SOUZA, V. H.; MONTEIRO, K. M.; SOUSA, I. M. O.; QUEIROZ, N. C. A.; CARVALHO, J. E.; SPINDOLA, H. M.; FOGGIO, M. A. Comparison of standardized dichloromethane with aqueous *Pterodon Pubescens* Benth fruit extracts on antinociceptive and anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 455–464, 2017.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of “Sucupira” (*Pterodon spp.*). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 607–616, 2010.

HARTWELL, J. L. **Plants used against cancer.** Lawrence, Massachusetts: Quarterman, p.380-425, 1984.

HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 5, p. 480–484, 2007.

HOSCHEID, J.; REINAS, A.; CORTEZ, D. A. G.; COSTA, W. F.; CARDOSO, M. L. C. Determination by GC-MS-SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens Benth.*: Development and validation. **Talanta**, v. 100, p. 372–376, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** IV; 1ª ed, 2008.

IZUMI, E.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; JÚNIOR, V.F.V.; NAKAMURA, C. V. Natural products and Chagas’ disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Journal Natural Product Reports**, n. 4, p. 809–823, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, vol. 1, nº 1, 2005.

KOSEKI, P. M.; VILLAVIVENCIO, A. L. C. H.; BRITO, M. S.; NAHME, L. C.; SEBASTIÃO, K. I.; RELA, P. R.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; MANCINI-FILHO, J.; FREITAS, P. C. D. Effects of irradiation in medicinal and eatable herbs. **Radiation Physics**

and Chemistry, v. 63, n. 3–6, p. 681–684, 2002.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of chemistry and physics**. 78 ED. ed. [s.l.] CRC PRESS, 1997.

LIMA, H. C.; LIMA, I. B. **Pterodon: Lista de espécies da flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29842>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

LIMA; I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade Antigúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197–201, 2006.

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 363–366, 2005.

LLORET, F. C.; SANTOS, C. C. J.; MEDINA, L. S.; QUEIROZ, N. C. A.; SOUSA, I. M. O.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. 6 α -Acetoxy-7 α -Hydroxy-Vouacapan Isolated from *Pterodon pubescens* Benth. Fruit's with Selective Activity against Prostate Cancer Cell Line: Artifact or Natural Product? **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 05, n. 02, p. 2–7, 2016.

LONGATO, G. B. **Atividade anticâncer e mecanismo de ação de compostos isolados das folhas de Piper regnellii (MIQ.) c. DC. var. regnellii**. 2014. UNICAMP, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP.: Instituto Plantarum, 2002.

MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of the Chemical Society**, v. Perkin Tra, p. 520–525, 1973.

MARONI, B. C.; STASI, L.C.; MACHADO, S. R. **Plantas medicinais do Cerrado de Botucatu**. 1. ed. [s.l.] Unesp, 2006.

MARRERO, J.; GANI, R. Group-contribution based estimation of pure component properties. **Fluid Phase Equilibria**, v. 183–184, p. 183–208, 2001.

MARTINS, L. A. V. **Avaliação do potencial anticâncer de espécies vegetais de Mato Grosso do Sul**. Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Dissertação de mestrado, 82 f., 2014.

MARTINEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos**. Tese de Doutorado, Unicamp, 2005.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A.. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 5, p. 1057–1063, 2003.

MASCARO, U. C. P.; TEIXEIRA, D. F.; GILBERT, B. Avaliação da sustentabilidade da coleta de frutos de “sucupira branca” (*Pterodon emarginatus* Vog.) após queda espontânea. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 2005. .

MATEUS, L. S.; FAVARETO, R.; BELISÁRIO, C. M.; WENCESLAU, B. R.; FILHO, L. C. Extração supercrítica dos frutos de Sucupira (*FABACEAE*). v. 2018, p. 22–24, 2018.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza - CE: EDIÇÕES UFC, 2009.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: Process design data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, n. 4-5, p. 321-330, 2003.

MEIRELES, M. A. A. Extração Supercrítica : Aspectos Técnicos e Econômicos Supercritical Extraction : Technical and economical issues. **Revista Fitos**, v. 2, n. 1, p. 65-72, 2006.

MEIRELES, M. A. A. **Extracting bioactive compounds for food products: Theory and applications**. 1^a ed. BOCA: CRC PRESS, 2009.

MEJRI, J. et al. Asian Journal of Green Chemistry Review Article Emerging extraction processes of essential oils : A review. **Asian Journal of Green Chemistry**, v. 2, n. May, p. 246-267, 2018.

MIRANDA, M. L. D.; GARCEZ, F. R.; ABOT, A. R.; GARCEZ, W. S. Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Química Nova**, Vol. 37, n.3, p. 473-476, 2014.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D. & GRAYGOODRICH, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MUKHOPADHYAY. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. BOCA RATON: CRC PRESS, 2000.

NAIK, S.N.; LENTZ, H.; MAHESHAWARE, R. . Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium. **Fluid Phase Equilibria**, v. 49, p. 115-126, 1989.

NEO MUNDO - UM OLHAR CONSCIENTE. **Cerrado é o bioma brasileiro com maior taxa de desmatamento**. Disponível em: <<http://www.neomundo.org.br/2019/01/28/cerrado-e-o-bioma-brasileiro-com-maior-taxa-de-desmatamento-diz-estudo/>>. Acesso em: 30 jun. 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. 2020.

NUCCI-MARTINS, C.; MARTINS, D. F.; NASCIMENTO, L. F.; VENZKE, D.; OLIVEIRA, A. S.; FREDERICO, M. J. S.; SILVA, F. R. M. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S. Ameliorative potential of standardized fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth on neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanisms of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 273-286, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.005>>.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M. **Obtenção de produtos nanoestruturados bioativos a partir dos frutos de Sucupira-Branca (*Pterodon emarginatus* Vogel)**. Tese de Doutorado em Inovação Farmacêutica, Universidade Federal do Amapá, 2016.

OLIVEIRA, D. M.; PAIVA, E. A. Anatomy and ontogeny of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae: Faboideae) seed. **Brazilian journal of biology = Revista brasileira de biologia**,

v. 65, n. 3, p. 483–494, 2005.

OLIVEIRA, L. A. R. et al. Vouacapan diterpenoids isolated from *Pterodon* and their biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 5, p. 663–672, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.05.014>>.

PARDO-CASTAÑO, CAMILO; VELÁSQUEZ, M.; BOLA, G. Simple models for supercritical extraction of natural matter. **The journal of supercritical fluids**, v. 97, p. 165–173, 2015.

PASSOS, C. S. et al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 A, p. 140–149, 2009.

PATLOLLA, J. M. R.; RAO, C. V. Triterpenoids for cancer prevention and Treatment: Current status and future prospects. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 13, 147-155, 2012.

PAULA, F.B.A.; GOUVÊA, C.M.C.P.; ALFREDO, P.P.; SALGADO, I. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. **BCM Complement Altern Med.**, v. 5:17, 2005.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.

PERRUT, M. Supercritical fluid applications: Industrial developments and economic issues. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 12, p. 4531–4535, 2000.

PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 6, 2017. Disponível em: <http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=72&tmpl=component&format=raw&Itemid=98>.

POPOVIC NEVENA, S. J. Comparative study of the quantification of thin-layer chromatograms of a model dye using three types of commercial densitometers and image analysis with ImageJ. **Trends in Chromatography**, v. 9, 2014. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/eaeb/5e19882b21bdb8e07f02183980684ff1f864.pdf>>.

QUISPE-CONDORI, S. **Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de processos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare***. Tese de doutorado, Unicamp, Campinas, 2005.

RABI, T.; BISHAYEE, A. Terpenoids and breast cancer chemoprevention. **Breast Cancer Res Treat**, 115:223-239, 2009.

REIS, C. D. F. Efeitos vasculares do oleorresina de *Pterodon spp* . Vogel (*Fabaceae*) e do seu diterpeno isolado (6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila. 2015.

REVERCHON, E. et al. Supercritical fractional extraction of fennel seed oil and essential oil: Experiments and mathematical modeling. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 8, p. 3069–3075, 1999.

REZZOUG, S. A.; BOUTEKEDJIRET, C.; ALLAF, K. Optimization of operating conditions of *Rosemary* essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 1, p. 9–17, 2005.

RODRIGUES, M. T. A biodiversidade dos Cerrados: Conhecimento atual e perspectivas, com uma hipótese sobre o papel das matas de galeria na troca faunística durante o ciclo climático. In: **Cerrado: Ecologia, biodiversidade e conservação**, p. 237–246, Brasília, 2005.

RODRIGUES, V. M. et al. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: A pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, n. 1, p. 21–36, 2002.

SAMPAIO, J. A.; SILVA, F. A. N. G. da. Determinação das densidades de sólidos e de polpa. **Tratamento de minérios: práticas laboratoriais**, v. 1, p. 570, 2007. Disponível em: <<http://mineralis.cetem.gov.br:8080/handle/cetem/1019>>.

SANTOS, A. P. et al. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, *Fabaceae*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 891–896, 2010.

SCAVANINI, H.F.A. **Destilação em batelada de aroma natural de caju e óleo essencial de manjerição: investigação via simulação computacional**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2006.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4ª ed. Porto Alegre, Florianópolis: ed. UFSC, p. P.333-364, 2002.

SERVAT, L. et al. *Pterodon pubescens* Benth: Stability study of microencapsulated extract and isolated compounds monitored by antinociceptive assays. **J.Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 7, p. 1244–1253, 2012.

SHI, J. **Functional food ingredients and nutraceuticals: Processing technologies**. Boca Raton: CRC PRESS, 2007.

SHREVE, RANDOLPH NORRIS; BRINK-JR., J. A. **Indústrias de processos químicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SILVA, J. F. et al. Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 3, p. 536–548, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; BORDIGNOM, S. A. L. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais In: UFRGS (Ed.). **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5ª ed. [s.l: s.n.]p. 211–227, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 1999.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, 23: 136-141. 2012.

SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia - Coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2012.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**, Ed. UFOP, 2011.

SOUZA, V. H. D. S. Avaliação da toxicidade não clínica de extrato e vouacapanos oriundos dos frutos da espécie *Pterodon pubescens* Benth. Tese de Doutorado em Odontologia, UNICAMP, Piracicaba, 143 págs., 2017.

- SOVOVÁ, H. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 15, p. 2499–2505, 1994.
- SPINDOLA, H. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; RODRIGUES, R. A. F.; DENNY, C. SOUSA, I. M. O.; TAMASHIRO, J.; FOGLIO, M. A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective *in vitro* anticancer activity for prostate cell line. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 569–575, 2009.
- SPINDOLA, H. M.; SERVAT, L.; DENNY, C.; RODRIGUES, R. A. F.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, E.; SOUSA, I. M. O.; TAMASHIRO, J. Y.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **BMC Pharmacology**, v. 10, p. 1–10, 2010.
- SPINDOLA, H. M.; SERVAT, L.; RODRIGUES, R. A. F.; SOUSA, I. M. O.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth.: Further investigation on the antinociceptive mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 656, n. 1–3, p. 45–51, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.01.025>>.
- STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.
- STEFFANI, E. Modelagem Matemática do Processo de Extração Supercrítica de Óleo Essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora* Nees & Eberm var . *linaloolifera* Fujita) Utilizando CO₂. p. 92, 2003.
- TAYLOR, L. T. **Supercritical fluid extraction**. 1^a ed. New York: Wiley Interscience, 1996.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013.
- VASCONCELLOS, C. M. C. Extração Supercrítica dos Óleos Voláteis de *Achyrocline satureioides* (Macela) e *Vetiveria zizanioides* (Vetiver): Determinação da Cinética de Extração e Estimativa de Custos de Manufatura. p. 114, 2007.
- VELOZO, L. S. M.; MARTINO, T.; VIGLIANO, M. V.; PINTO, F. A.; SILVA, G. P.; JUSTO, M. G. A.; SABINO, K. C. C.; COELHO, M. G. P. *Pterodon polygalaeiflorus* Essential Oil Modulates Acute Inflammation and B and T Lymphocyte Activation. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 41, p. 545–563, 2013.
- VIEIRA, C. R.; MARQUES, M. F.; SOARES, P. R.; MATUDA, L.; DE OLIVEIRA, C. M. A. KATO, L.; DA SILVA, C. C.; GUILLO, L. A. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6–7, p. 528–532, 2008.
- WERNER, H.; OLIVEIRA, C.; VIVEIRO, A. A. Cerrado e plantas medicinais: Algumas reflexões sobre o uso e a conservação. **Ensino, Saúde e Ambiente**, v. 5, n. 3, p. 102–120, 2012.
- ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chin. Med.**, 13:20, 2018.
- ZHAO, J. Nutraceuticals, Nutritional Therapy, Phytonutrients, and Phytotherapy for Improvement of Human Health: A Perspective on Plant Biotechnology Application. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 75–97, 2008.

ZUKNIK, M. H.; NORULAINI, N. A. N.; DALILA, W. S. W. N.; ALI, N. R.; OMAR, A. K. M. Solubility of virgin coconut oil in supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 240–244, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.004>>.

APÊNDICE A – Cromatogramas das amostras na análise em HPLC/UV-vis

Figura 32: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 1.

Fonte: Autora.

Figura 33: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 2.

Fonte: Autora.

Figura 34: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 3.

Fonte: Autora.

Figura 35: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 4.

Fonte: Autora.

Figura 36: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 5.

Fonte: Autora.

Figura 37: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 6.

Fonte: Autora.

Figura 38: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 7.

Fonte: Autora.

Figura 39: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 8.

Fonte: Autora.

Figura 40: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 9 (Ponto Central).

Fonte: Autora.

Figura 41: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 10 (Ponto Central).

Fonte: Autora.

Figura 42: Cromatograma HPLC/UV-vis do ensaio 11 (Ponto Central).

Fonte: Autora.

Figura 43: Cromatograma HPLC/UV-vis da amostra produzida em sistema Soxhlet.

Fonte: Autora.

APÊNDICE B – Resultados do teste de atividade antiproliferativa *in vitro*.

Figura 44: Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *P. pubescens* (ensaio 1) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 45: Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *P. pubescens* (ensaio 2) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 46: Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *P. pubescens* (ensaio 3) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 47: Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *P. pubescens* (ensaio 4) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 48: Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *P. pubescens* (ensaio 5) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 49: Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *P. pubescens* (ensaio 6) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 50: Atividade antiproliferativa in vitro dos extratos de *P. pubescens* (ensaio 7) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 51: Atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos de *P. pubescens* (ensaio 8) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 52: Atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos de *P. pubescens* (ensaio 9 - Ponto central) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 53: Atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos de *P. pubescens* (amostra Soxhlet) em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento.

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

Figura 54: Atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato de *P. pubescens* em painel de linhagens tumorais e não-tumorais, após 48 horas de tratamento, para a amostra de Doxorrubicina (controle).

Linhagens: U251 (SNC, glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), NCI-H460 (pulmão, carcinoma tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), 786-0 (Rim, adenocarcinoma), HaCaT (queratinócito humano, não tumoral). Fonte: Autora.

APÊNDICE C – Aparelhagem utilizada no procedimento experimental

Figura 55: Aparelhagem Soxhlet utilizada para extração com solvente orgânico.

Fonte: Autora.

Figura 56: Aparelhagem da destilação à vácuo.

Fonte: Autora.