



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

KELLY ROBERTA PINHEIRO DE SOUSA

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE MURURÉ (*Brosimum acutifolium*) POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO via $scCO_2$: ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL, PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

BELÉM/PA
2022

KELLY ROBERTA PINHEIRO DE SOUSA

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE MURURÉ (*Brosimum acutifolium*) POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO via scCO₂: ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL, PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ, do Instituto de Tecnologia –ITEC, da Universidade Federal do Pará – UFPA, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Linha de pesquisa: Engenharia de Processos Orgânicos

Orientador: Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior

BELÉM/PA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Biblioteca da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S725o Sousa, Kelly Roberta Pinheiro de.
 Obtenção de extratos de mururé (*Brosimum acutifolium*) por
 extração sequencial em leito fixo via scCO₂: Isotermas de
 rendimento global, Perfil químico e Atividade antioxidante / Kelly
 Roberta Pinheiro de Sousa. — 2022.
 61 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, Belém, 2022.

1. Mururé. 2. Extração sequenciada. 3. Composição
química. I. Título.

CDD 660

KELLY ROBERTA PINHEIRO DE SOUSA

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE MURURÉ (*Brosimum acutifolium*) POR
EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO via $scCO_2$: ISOTERMAS DE
RENDIMENTO GLOBAL, PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.

Defesa de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da
Universidade Federal do Pará como
parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

APROVADA EM: 30/06/2022

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
(PPGEQ/TTEC/UFPA – Orientador)

Prof. Dr. Antônio Maia de Jesus Chaves Neto
(PPGEQ/TTEC/UFPA – Membro Interno)

Dra Flavia Cristina Seabra Pires
(LABTECS/UFPA – Membro Externo)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
POS-GRADUACAO EM ENGENHARIA QUIMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 129/2022 - PPEQ (11.41.20)

Nº do Protocolo: 23073.037133/2022-05

Belém-PA, 05 de julho de 2022.

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, NA ÁREA DE **DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS**, NA LINHA DE PESQUISA DE **ENGENHARIA DE PROCESSOS ORGÂNICOS**, REALIZADA EM 30 DE JUNHO DE 2022, TENDO INÍCIO ÀS 16:30 HORAS, APRESENTADA PELA CANDIDATA **KELLY ROBERTA PINHEIRO DE SOUSA** DIANTE DA BANCA EXAMINADORA CONSTITUÍDA PELO PRESIDENTE: **Prof. Dr. RAUL NUNES DE CARVALHO JUNIOR** ORIENTADOR; E PELOS MEMBROS: **Prof. Dr. ANTÔNIO MAIA DE JESUS CHAVES NETO** MEMBRO INTERNO E **Dra. FLÁVIA CRISTINA SEABRA PIRES** - MEMBRA EXTERNA. A DISSERTAÇÃO INTITULADA **"OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE MURURÉ (*Brosimum acutifolium*) POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO VIA $scCO_2$: ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL, PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE"** FOI EXPOSTA EM SESSÃO PÚBLICA NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA - PPGEQ/UFPA, POR VIDEOCONFERÊNCIA, PELA CANDIDATA DURANTE 45 MINUTOS. EM SEGUIDA FOI ARGÜIDA ORALMENTE PELOS MEMBROS DA BANCA, DEMONSTRANDO POSSUIR SUFICIÊNCIA DE CONHECIMENTO NO TEMA ABORDADO. A BANCA EXAMINADORA OPINOU DE FORMA FAVORÁVEL À APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO, SEM RESTRIÇÕES. NA FORMA REGULAMENTAR FOI LAVRADA A PRESENTE ATA, ASSINADA PELOS MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA E PELA
C A N D I D A T A.

Belém, 30 de junho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

PRESIDENTE: Raul Nunes de Carvalho Júnior (PPGEQ/ITEC/UFPA - Orientador)

MEMBROS :

Prof. Dr. Antônio Maia de Jesus Chaves Neto (PPGEQ/ITEC/UFPA)

Dra. Flávia Cristina Seabra Pires (LABTECS/UFPA)

CANDIDATA: Kelly Roberta Pinheiro de Sousa

**(Assinado digitalmente em
05/07/2022 16:34)**

ANTONIO MAIA DE JESUS CHAVES
NETO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

ICEN (11.34)

Matrícula: ###529#2

**(Assinado digitalmente em
05/07/2022 16:14)**

RAUL NUNES DE CARVALHO JUNIOR

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

ITEC (11.41)

Matrícula: ###496#7

**(Assinado digitalmente em
05/07/2022 15:16)**

FLÁVIA CRISTINA SEABRA PIRES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.

**(Assinado digitalmente em
05/07/2022 22:35)**

KELLY ROBERTA PINHEIRO DE SOUSA

DISCENTE

Matrícula: 2019#####4

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpa.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: **129**, ano: **2022**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão:
05/07/2022 e o código de verificação: **a3df937c1d**

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho aos meus pais Roberto e Rejane, minhas avós, Raimunda e Djanira e meu saudoso avô Manoel

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente o meu bom Deus, que me abençoou, guardou e guiou de maneira tão grandiosa e me conduziu ao lugar que deveria estar, me deu forças, me amou e sempre foi meu pai e fiel amigo. Agradeço aos meus pais, minha mãe que nunca mediu esforços para me incentivar e cooperar em tudo que estivesse ao seu alcance, me acompanhou na vida escolar desde o meu primeiro dia de aula, na infância, e continua a me acompanhar agora mais de longe na vida adulta, todavia, sempre bem perto em oração e amor. Ao meu pai, que sempre me aconselhou, guerreou, vibrou e deu o seu melhor, até quando não tinha muito a oferecer, oferecia o que era seu, para suprir minha necessidade, como eu os amo!

Agradeço também não menos importante, longe disto, meu amor, minha vida, meu marido William, são tantos anos juntos, que só tenho a me alegrar por encontrar um companheiro, parceiro e amigo para todas as horas, que busca a lua e o sol se for preciso, que se esforça num nível que constrange, obrigada por estar comigo nos dias difíceis de trabalho e sempre me animar a nunca desistir, me incentivar, me aconselhar e fazer da minha luta, a sua também.

A minha sogra Santana, minhas avós Raimunda e Djanira, meu avô Manoel (*in memorian*) por serem excepcionais, eu os amo e agradeço por me ajudarem e se alegrarem com as vitórias em nossas vidas.

Meus irmãos, Carlos e Flávia, meus irmãos que são amigos, parceiros, auxiliares, brincalhões e visionários, o tempo só nos fez sermos mais unidos que nunca e mais próximos do que jamais fomos, vocês são meu porto seguro, meus sorrisos e meu descanso, vocês me deram alívio, risos, e trazem alegria aos meus dias, muito obrigada, não chegaria aqui sem vocês!

Aos meus amigos do Labex, da UEPA e da vida, vocês são maravilhosos, amigos de verdade, auxiliam, são parceiros, solícitos e me ajudaram demais na vida acadêmica, são excepcionais, pessoas que tenho prazer em ter por perto.

Ao meu orientador, Prof. Raul, que me recebeu em seu grupo de pesquisa, foi sempre disposto em ajudar, dar oportunidade, é amigo de seus alunos, olha pra gente como ser humano e busca sempre a melhor maneira de ajudar, o meu obrigada!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Tua palavra é lâmpada para meus pés e luz para o meu caminho”
(Livro de Salmos, 119:105)

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE MURURÉ (*Brosimum acutifolium*) POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO via scCO₂: ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL, PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

KELLY ROBERTA PINHEIRO DE SOUSA

Orientador: Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior

Area de concentração: Desenvolvimento de Processos

Linha de Pesquisa: Engenharia de Processos Orgânicos

RESUMO

A espécie *Brosimum acutifolium* Huber, conhecida popularmente como mururé da terra firme, exibe características terapêuticas responsáveis pela sua utilização na medicina popular como anti-inflamatório, bactericida, antissifilítica, antirreumática e dentre outros, devido à presença significativa compostos fenólicos. Este trabalho então, tem como objetivo realizar uma extração via fluido supercrítico (EFS) de maneira sequenciada com: CO₂; CO₂+ EtOAc; CO₂+ EtOH, avaliando os parâmetros do processo de extração, realizar uma avaliação da composição química e a atividade antioxidante dos extratos. Para tanto, realizou-se uma caracterização centesimal da matéria prima (umidade, cinzas, lipídios e proteínas), e a determinação do diâmetro médio da partícula. Para os ensaios da EFS, o tempo de extração dinâmica (Td) com CO₂ foi de 60 minutos e vazão de CO₂ de 3 L/min, Td de 60 minutos para CO₂+ EtOAc e vazão 1,18 ml/min e Td de 60 minutos para CO₂+ EtOH e vazão de CO₂ de 1,34 ml/min, e massa de matéria-prima de 10 g. A seleção das variáveis temperatura e pressão foi realizada com base na diferença da densidade do CO₂ + cossolvente, as isotermas de 40° C e 60° C combinadas com os valores de pressão de 250, 300 e 350 bar. Os resultados da caracterização centesimal, foram concordantes com a literatura, valores nominais de umidade (%) (13,63), lipídios 0 %, cinzas (%) (2,12±0,05) e proteínas (g/100 ml) (4,41±0,10), com diâmetro médio da partícula em 0,456 mm. Em relação aos parâmetros do processo, os valores de rendimento global da SFE em base seca, foram melhores nas condições de extração com CO₂+ EtOAc em 40° C e 60° C a 350 bar e na extração com CO₂+ EtOH em 40° C e 60° C a 250 bar. A avaliação da composição química por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) permite inferir que o extrato obtido no sistema CO₂+ EtOH na condição (40° C a 250 bar) apresentou melhor perfil químico em relação aos compostos fenólicos, flavonoides e ácidos graxos, salienta-se, no entanto, que os extratos obtidos no sistema CO₂+ EtOAc, nas condições de 40° C e 60° C a 350 bar, exibiram um perfil de cumarinas mais evidente em relação aos demais extratos avaliados. Em relação a atividade antioxidante, todos os extratos exibiram boa atividade. Assim, os resultados permitiram caracterizar centesimalmente a matriz nos quesitos já mencionados, revelando informações que não estão disponíveis na literatura pesquisada, além de inferirem as melhores condições operacionais em termos de rendimento, para a extração EFS desta matéria prima com base nos parâmetros operacionais analisados.

Palavras-chave: Mururé. Extração sequenciada. Composição química.

OBTAINING OF MURURE (*Brosimum acutifolium*) EXTRACTS BY SEQUENTIAL EXTRACTION IN A FIXED BED via scCO₂: GLOBAL YIELD ISOTHERMS, CHEMICAL PROFILE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

KELLY ROBERTA PINHEIRO DE SOUSA

Orientador: Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
Area de concentração: Desenvolvimento de Processos
Linha de Pesquisa: Engenharia de Processos Orgânicos

ABSTRACT

The species *Brosimum acutifolium* Huber, popularly known as mururé da terra firme, exhibits therapeutic characteristics responsible for its use in folk medicine as anti-inflammatory, bactericidal, ant syphilitic, antirheumatic and among others, due to the significant presence of phenolic compounds. This work, then, aims to perform an extraction via supercritical fluid (SFE) in a sequenced way with: CO₂; CO₂+ EtOAc; CO₂+ EtOH, evaluating the parameters of the extraction process, to carry out an evaluation of the chemical composition and the antioxidant activity of the extracts. Therefore, a proximate characterization of the raw material (moisture, ash, lipids and proteins) was carried out, and the average particle diameter was determined. For the EFS tests, the dynamic extraction time (Td) with CO₂ was 60 minutes and CO₂ flow rate of 3 L/min, Td of 60 minutes for CO₂+ EtOAc and flow rate of 1.18 ml/min and Td of 60 minutes for CO₂+ EtOH and CO₂ flow rate of 1.34 ml/min, and raw material mass of 10 g. The selection of the temperature and pressure variables was based on the difference in the density of CO₂ + co-solvent, the isotherms of 40°C and 60°C combined with the pressure values of 250, 300 and 350 bar. The results of the proximate characterization were in agreement with the literature, nominal values of moisture (%) (13.63), 0% lipids, ash (%) (2.12±0.05) and proteins (g/100 mL) (4.41±0.10), with mean particle diameter of 0.456 mm. Regarding the process parameters, the SFE global yield values on a dry basis were better in the extraction conditions with CO₂+ EtOAc at 40° C and 60° C at 350 bar and in the extraction with CO₂+ EtOH at 40° C and 60 °C at 250 bar. The evaluation of the chemical composition by high performance thin layer chromatography (CCDAE) allows us to infer that the extract obtained in the CO₂+ EtOH system in the condition (40° C at 250 bar) showed a better chemical profile in relation to phenolic compounds, flavonoids and fatty acids. , it is noteworthy, however, that the extracts obtained in the CO₂+ EtOAc system, under conditions of 40° C and 60° C at 350 bar, exhibited a more evident profile of coumarins in relation to the other extracts evaluated. Regarding antioxidant activity, all extracts showed good activity. Thus, the results made it possible to characterize the matrix in the aforementioned aspects, revealing information that is not available in the researched literature, in addition to inferring the best operational conditions in terms of yield, for the EFS extraction of this raw material based on the operational parameters analyzed.

Keywords: Mururé. Sequenced extraction. Chemical composition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular da Brosimina B.....	23
Figura 2- Diagrama de fases de uma substância pura	24
Figura 3- Matéria prima na etapa de secagem	30
Figura 4- Matéria prima cominuída.....	31
Figura 5- Applied Separations, modelo 7071, USA	34
Figura 6- Célula de extração utilizada (esquerda) e célula ilustrada (direita)	35
Figura 7- Célula de extração no forno	35
Figura 8- Esquema da extração supercrítica.	36
Figura 9- Procedimento da extração sequenciada realizado.....	36
Figura 10- Imagem ilustrativa da placa de sílica Gel	39
Figura 11- Disposição dos extratos na placa para análise de flavonoides.....	40
Figura 12- Disposição dos extratos na placa para análise de cumarinas, terpenos, ácidos graxos, compostos fenólicos	40
Figura 13- Frasco coletor CO ₂	43
Figura 14- Extratos de maiores rendimentos CO ₂ + EtOAc	44
Figura 15- Gráfico das isotermas de rendimento (CO ₂ + EtOAc) em função da densidade e isoterma de rendimento em função da pressão, respectivamente	44
Figura 16- Extratos de maiores rendimentos (CO ₂ +EtOH)	46
Figura 17- Gráfico das isotermas de rendimento (CO ₂ + EtOH) em função da densidade e isoterma de rendimento em função da pressão, respectivamente.....	47
Figura 18- Placa cromatográfica para avaliação de flavonoides	49
Figura 19- Placa cromatográfica para avaliação de perfil fito químico.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Propriedades físicas para diferentes estados de agregação.....	25
Tabela 2 -Propriedades críticas de alguns componentes puros.....	25
Tabela 3 -Sistema para extração sequenciada CO ₂ + Cossolvente (80:20)	32
Tabela 4 -Os extratos obtidos via (CO ₂ + EtOAc) e (CO ₂ +EtOH) de maiores rendimentos	38
Tabela 5 -Características da amostra em base seca	41
Tabela 6 -Dados granulométricos	42
Tabela 7 - Rendimentos CO ₂ + EtOAc (80:20) (v/v)	43
Tabela 8 -Rendimentos da extração (CO ₂ +EtOH) (80:20) v/v.....	46
Tabela 9 -Atividade antioxidante.....	51

LISTA DE SIGLAS

CCDAE	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Ponto crítico
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Ds	Diâmetro de Sauter
EFS	Extração com fluido supercrítico
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	Hexano:
MeOH	Metanol
P	Pressão
P _c	Pressão crítica
T	Temperatura
ρ	Densidade
T _c	Temperatura crítica
T _d	Tempo dinâmico
TP	Ponto triplo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 FAMÍLIA MORACEAE GAUDICHAE	19
3.2 SUBGÊNERO <i>BROSIMUM</i>	20
3.3 ESPÉCIE <i>BROSIMUM ACUTIFOLIUM</i> HUBER	20
3.3.1 Classificação taxonômica	20
3.3.2 Breve descrição botânica.....	20
3.3.3 Habitat e Distribuição geográfica.....	20
3.3.4 Sazonalidade e Fenologia.....	21
4 PERFIL FITOQUÍMICO	21
5 POTENCIALIDADES BIOATIVAS	21
6 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DA ESPÉCIE.....	21
7 EXTRAÇÃO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO	23
7.1 DIAGRAMA DE FASES: PONTO TRIPLO, PONTO CRÍTICO E FLUIDO SUPERCRÍTICO	23
7.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO.....	26
7.2.1 Etapas	26
7.3 PARÂMETROS DO PROCESSO	27
7.3.1 Pressão.....	27
7.3.2 Temperatura	27
7.3.3 Densidade (ρ)	27
7.3.4 Solubilidade.....	28
7.3.5 Cossolvente	28
7.4 EXTRAÇÃO FRACIONADA POR FLUIDO SUPERCRÍTICO	29
8 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
8.1 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DA MATÉRIA PRIMA	29
8.2 TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	30
8.2.1 Secagem e moagem.....	30
8.2.2 Avaliação granulométrica	30

8.2.3 Determinação do Diâmetro Médio da Partícula (Ds).....	31
8.2.4 Avaliação centesimal.....	32
8.2.5 Cálculo de Densidade.....	32
8.3 DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL	32
8.4 EXTRAÇÃO SEQUENCIADA EM LEITO FIXO (SFCO ₂ ; CO ₂ + EtOAc E CO ₂ +EtOH).....	33
8.4.1. Procedimento.....	34
9 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	38
9.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)	38
9.1.1 Preparo dos extratos e padrões	39
9.1.2 Preparo das placas de sílica gel 60 Å	39
9.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	40
10 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
10.1 AVALIAÇÃO DA CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA PRIMA.....	41
10.2 DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS DA MATRIZ.....	42
10.3 DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL	42
10.3.1 Isoterma de rendimento global CO ₂	43
10.3.2 Isoterma de rendimento global CO ₂ +EtOAc.....	43
10.3.3 Isoterma de rendimento global CO ₂ +EtOH	45
11 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	48
11.1 FLAVONOIDES.....	48
11.2 COMPOSTOS FENÓLICOS, CUMARINAS E ÁCIDOS GRAXOS	49
11.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	50
13 CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES	53
14 REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Brosimum acutifolium* compõe a família *Moraceae*, pertence a ordem *Rosales* e ao gênero *Brosimum*, conhecida popularmente como mururé ou mururé da terra firme. Este nome está relacionado a localização, a qual a árvore é encontrada, podendo estar em florestas de terra firme ou regiões com clima tropical e subtropical, sendo ainda chamada de mercúrio vegetal devido suas propriedades antibactericidas, antissifilítica e anti-inflamatórias (VIEIRA et al., 2019).

Pesquisas revelaram que os extratos de mururé exibem atividade antioxidante, significativa quantidade de flavonoides e cumarinas, além serem utilizadas em estudos envolvendo tratamentos de patologias como reumatismo, acidente vascular cerebral e câncer, sabe-se ainda que este apresenta capacidade bactericida contra *Staphylococcus aureus* (GAGLIOT, 2018; TORRES et al., 2000; VIEIRA et al., 2019; CORREIA et al., 2008).

Dentre as substâncias encontradas na composição química da espécie, a molécula de *Brosimina B* figura entre as quais, pesquisas são feitas avaliando seu potencial antioxidante, neuroprotetor e anti-inflamatório. Os extratos de *Brosimum acutifolium* encontrados na literatura pesquisada para este trabalho, são obtidos pelo processo de maceração com solvente Etanol ou com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, diclorometano, entre outros), utilizados em extrações sucessivas por ordem crescente de polaridade (DA FONSECA, 2014; TORRES et al., 2000; MAUÉS, 2013).

Não foram reportados trabalhos com a espécie obtendo extratos via extração por fluido supercrítico (EFS), todavia sabe-se que a EFS é uma técnica utilizada a bastante tempo com o intuito obter compostos bioativos a partir de fontes naturais. Sendo diferente dos processos de extração convencional, no que tange a contaminação dos extratos por solventes orgânicos tóxicos e a necessidade de trabalhar com muitos solventes (SALAZAR, 2017; MUKMOPADHYAYM, 2000).

A EFS tem como base o uso de solventes, comumente o dióxido de carbono (CO_2) com temperaturas e pressões acima dos seus pontos críticos, exibindo alto poder de solvatação, resultando em extratos com alto valor agregado (GROSS 2005; MUKMOPADHYAYM, 2000).

A utilização do CO_2 está ligada a suas características de atoxidade, não inflamabilidade, pureza e condições críticas ($T_c = 31^\circ\text{C}$ e $P_c = 72,9\text{ bar}$) que permitem a coleta de extratos com o mínimo de degradação de compostos termo sensíveis. A EFS envolve basicamente, as etapas de extração dos compostos e a separação do solvente do extrato (GROSS 2005; MUKMOPADHYAYM, 2000; SALAZAR, 2017).

Assim, esta pesquisa tem como finalidade obter extratos de mururé via SFE CO₂ com determinação das variáveis do processo extrativo, avaliando seu perfil químico e a atividade antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de extratos de mururé via extração supercrítica sequenciada (CO_2 ; $\text{CO}_2 + \text{EtOAc}$; $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$) avaliando os parâmetros do processo de extração, a composição química e a atividade antioxidante.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização centesimal da matéria prima (umidade, cinzas, proteínas e lipídios) e diâmetro médio das partículas;
- Determinar as isotermas de rendimento global da extração com CO_2 ;
- Determinar as isotermas de rendimento global da extração com $\text{CO}_2 + \text{Acetato de Etila (EtOAc)}$;
- Determinar as isotermas de rendimento global da extração com $\text{CO}_2 + \text{Etanol (EtOH)}$;
- Avaliação qualitativa por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) da composição química dos extratos (Flavonóides, cumarinas, ácidos graxos e compostos fenólicos);
- Avaliação quantitativa da atividade antioxidante;

3 REVISÃO DA LITERATURA

Neste tópico, será abordado de maneira sucinta aspectos relativos à matriz vegetal estudada, descrevendo suas características botânicas, perfil químico e potencialidades farmacológicas.

3.1 FAMÍLIA MORACEAE GAUDICHAE

Estão inseridos na família *Moraceae Gaudichae* aproximadamente cinquenta gêneros e mil e quinhentas espécies, que podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais dispersas pelo mundo todo. Quanto a suas características botânicas, sabe-se que a família apresenta como peculiaridade cicatrizes estipulares amplexicaules, ramos espinhosos ou não, latescentes com estípulas presentes visivelmente no ápice, folhagem simples, alternas, de bordos inteiros ou recortados. No território brasileiro, são conhecidos dezoito gêneros e aproximadamente duzentas espécies, concentrada majoritariamente na imensa Amazônia (DOS SANTOS MACHADO et al., 2015).

Destas espécies, sessenta e oito são endêmicas do Brasil, com sistema reprodutor monoico ou dioico, como árvores ou arbustos, as inflorescências são axilares, bissexuadas ou unissexuadas, racemosas ou cimosas, florística aclamídeas ou monoclamídea. Suas espécies têm preferência por vegetações rupestres e florestas de terra firme, em locais os quais as matas são baixas e úmidas (ROMANIUC-NETO, PEDERNEIRAS, GAGLIOTI, 2018).

Os constituintes da família *Moraceae* desempenham um importante papel ligado a: alimentação dos animais pertencentes a fauna brasileira; fonte econômica e utilização na medicina popular (DE SOUZA, 2009). Suas espécies são usadas na indústria madeireira, têxtil e na produção de látex. Exibem grande relevância na medicina popular e na fitoterapia, como expectorantes, broncodilatadores e no tratamento de mazelas como a doença de Chagas e vitiligo. As espécies manifestam estas atividades biológicas devido a rica presença de flavonoides (LUZ et al., 2015).

Dentre os muitos gêneros que compõe a família *Moraceae*, o gênero *Brosimum* em especial, é formado por quinze espécies e suas subespécies, estão distribuídas em variadas regiões. Este gênero, pode ainda ser subdividido em dois subgêneros, a saber:

Brosimum e *Ferolia* (Aublet) C.C. Berg, que se diferenciam pelas características reprodutivas e vegetativas de suas espécies (QUEVEDO, 2011).

3.2 SUBGÊNERO *BROSIMUM*

O subgênero *Brosimum* abrange oito espécies: *Brosimum gaudichaudii* Trécul, *Brosimum alicastrum* Swartz, *Brosimum guianense* (Aublet) Huber ex Ducke, *Brosimum costaricanum* Liebmann, *Brosimum glaziovii* Taubert, *Brosimum glaucum* Taubert, *Brosimum lactescens* (S. Moore) C.C. Berg e *Brosimum acutifolium* Huber (GARDNER et al., 2020; CORRÊA, 2017). Suas espécies majoritariamente são abundantes em proteínas, vitaminas e minerais, podendo funcionar como fonte alternativa de consumo, devido seu alto valor calórico (DAVID et al., 2019).

3.3 ESPÉCIE *BROSIMUM ACUTIFOLIUM* HUBER

3.3.1 Classificação taxonômica

Reino *Plantae*, filo *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Rosales*, família *Moraceae*, Gênero *Brosimum*, Subgênero *Brosimum*. Subespécies: *Brosimum acutifolium* subsp. *interjectum*; *Brosimum acutifolium* subsp. *acutifolium*; *Brosimum acutifolium* subs. *obovatum* (Ducke). Nome popular: Mururé de terra firme (GARDNER et al., 2020; GRANDTNER, CHEVRETTE, 2013).

3.3.2 Breve descrição botânica

Exibe altura variando entre quinze a vinte e cinco metros, considerada uma árvore de grande porte, com ramos rugosos de coloração acinzentada, folhagem com estípulas que lembram lanças, ápice longo e acuminado, com base arredondada e margem ondulada. Possui um receptáculo floral com característica globosa recoberto por numerosas brácteas basais com flores femininas. Seus frutos têm aspecto globoso, de cor avermelhada na fase madura (RIOS, PASTORE JR, 2011).

3.3.3 Habitat e Distribuição geográfica

Quanto a sua distribuição geográfica, está presente nas Guianas Francesas, Caribe, Suriname, Colômbia, Brasil, Bolívia e Peru. Seu habitat, compreende campos abertos, próximos ou não de corpos de água com baixa ou alta incidência de raios solares. Nascendo em solos argilosos ou areno argilosos (RIOS, PASTORE JR, 2011; MORETTI, et al., 2006).

3.3.4 Sazonalidade e Fenologia

Tem preferência por climas tropicais e subtropicais, com chuvas anuais e temperaturas que variam de 22°C a 30°C. Floração de julho até setembro, amadurecendo em setembro e frutificando nestes meses até outubro (RIOS, PASTORE JR, 2011).

4 PERFIL FITOQUÍMICO

São conhecidos muitos constituintes químicos desta espécie, dentre os quais citase: 4'-hidroxi-7,8- (2'', 2''-dimetilpirano) flavana e 4'-hidroxi-7,8- (3''-hidroxi-2'', 2''dimetilpirano) flavana (TORRES et al., 1997); Brosimina A e Brosimina B, 3',7dihidroxi-4'metoxifavana, isobavachina, liquiritigenina, 4-hidroxi-7,8-dihidroxi-4'-metoxifavana, isoliquiritigenina, enzima coniferaldeído, seringaldeído, sitosterol e estigmasterol (TORRES et al., 2000), (Acutifolinas A-F) e 7,4'-dihidroxi-8-prenilflavona (TAKASHIMA, OHSAKI, 2001); Brosimacutinas A-I, luteolina, naringenina (TAKASHIMA, OHSAKI, 2002); 4',7-Dihidroxi-8-prenilflavona (TEIXEIRA, ALCÂNTARA, PILÓ-VELOSO, 2000). Brosimacutinas J-M (TAKASHIMA et al., 2005); Mururina A-C (TAKASHIMA, ASANO, OHSAKI, 2002); 5-hidroxi-triptamina (Bufotenina) (MORETTI et al., 2006).

5 POTENCIALIDADES BIOATIVAS

A espécie tem sido usada popularmente como antiasmática, no tratamento de problemas pulmonares e bronquiais, além de ser afrodisíaca (RIOS, PASTORE JR, 2011), anti-inflamatória, antiartrítica e antirreumática (TORRES et al., 2000), estimuladora do apetite, antissifilítica, estimuladora de nervos e músculos, sendo ainda analgésica (VIEIRA et al., 2019). Segundo Rios, Pastore Jr. (2001), a seiva exibe propriedades anti-helmínticas e deve ser administrada em quantidades adequadas, caso contrário, poderá resultar em distúrbios gastrointestinais. Manifesta ainda, atividade anticancerígena (MAUÉS et al., 2019), antibactericida contra *Staphylococcus aureus* (CORREIA et al., 2008), atividade antioxidante, neuro protetora (DA FONSECA, 2014), e baixa atividade fotoprotetora (PAULETTO et al., 2017).

6 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DA ESPÉCIE

A espécie tem sido utilizada para o desenvolvimento de possíveis de tratamentos terapêuticos de diversas patologias, devido, como já fora mencionado no tópico 5 suas potencialidades bioativas. Em geral, os trabalhos elaborados (TORRES et al., 1999; TORRES

et al., 2000) envolvem o processo de maceração da casca da espécie, com o uso de solventes como $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ (hexano), EtOAc (acetato de etila), CH_2Cl_2 (diclorometano) MeOH (metanol), em extrações sucessivas obedecendo a ordem crescente de polaridade. Em outras pesquisas (TAKASHIMA, OHSAKI, 2001; TAKASHIMA, ASANO, OHSAKI, 2002) as extrações ocorrem com o uso de um único solvente MeOH ou etanol (EtOH) (TEIXEIRA, ALCANTARA, PILO-VELOSO, 2000)

Os extratos de mururé apresentam como característica serem ricos em flavonoides, que compõem uma das classes de substâncias mais importantes para a indústria devido sua diversidade, estão distribuídos conforme a fila; ordem; família do vegetal e variabilidade das espécies. Soma-se a isto, o fato de que existe a possibilidade de estarem presente em variadas partes como folhas, flores, galhos, raízes e entre outros, exibindo diferenciação entre si e em sua concentração. São conhecidas as funções relacionadas a proteção contra microrganismos, ação enzimática, cancerígena, antioxidante e entre outras (MACHADO et al., 2008).

Os flavonoides apresentam estrutura química que envolve o núcleo flavilium (possui três anéis fenólicos), sendo o benzeno localizado no primeiro anel condensado com o sexto carbono localizado no terceiro anel, que possui um grupo fenila na posição 2. o terceiro anel tende a ser um pirano heterocíclico que é responsável pelas estruturas das leucoantocianinas e das antocianidinas, chamado de núcleo flavana. Devido a esta característica do terceiro anel, tem-se a formação de flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas (AHERNE, O'BRIEN, 2002).

Dentre os compostos de flavonoides presentes nos extratos do mururé, um especial chama a atenção devido entre outras propriedades, sua ação anti-inflamatória, anticancerígena (MAUÉS, 2013) e antirreumática, conhecido como Brosimina B (7,4dihidroxi-8, (3,3-dimetilalil) -flavana) (TORRES et al., 2000) (figura 1). A molécula, apresenta atividade antioxidante e neuro protetora (FONSECA, 2014), sugerindo que está possa ser usada para tratamento em casos de acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi). Além demonstrar capacidade romper biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (DOS REIS et al., 2020).

Figura 1- Estrutura molecular da Brosimina B



Legenda: Fórmula estrutural modelo 2D (a esquerda) e fórmula estrutural 3D modelo bolas e bastões (direita) obtidas por meio do software open source MolView.

Fonte: MolView, 2021

7 EXTRAÇÃO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO

A EFS caracteriza-se por ser rápida e livre de contaminantes para as indústrias farmacêuticas e alimentícias. A EFS, vem sendo utilizada desde 1970 para o refino de óleos de cozinha e descafeinação dos grãos do café. A técnica apresenta muitas vantagens como: flexibilidade do processo ocasionado pela mudança de seletividade do solvente; manutenção das características do extrato; obtenção de extrato livre de solvente e não exposição da matéria prima a luminosidade (MAIA, ALICIEO, 2017). Para compreensão de como ocorre o processo EFS, bem como o que seria um fluido supercrítico, esta seção será dividida em três subtópicos (7.1; 7.2 e 7.3):

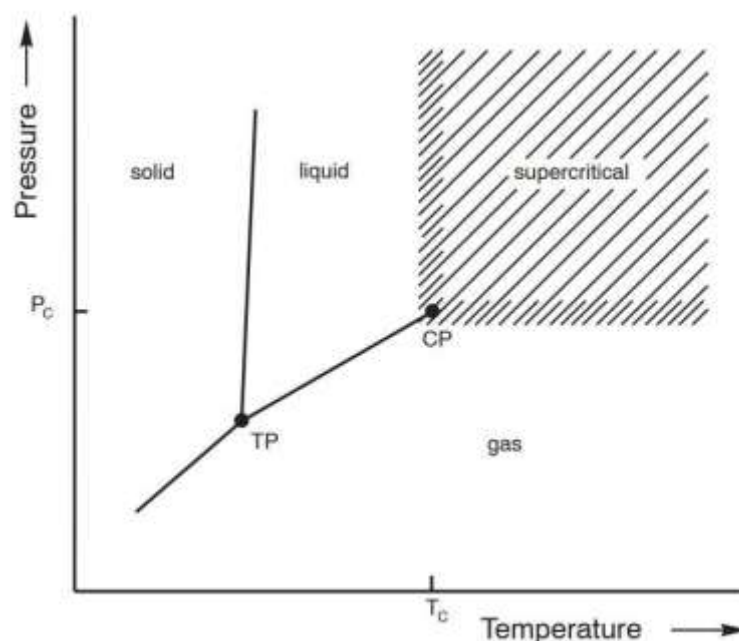
7.1 DIAGRAMA DE FASES: PONTO TRIPLO, PONTO CRÍTICO E FLUIDO SUPERCRÍTICO

O estado físico em que determinada fase poderá ser encontrada, será influenciado pelas variáveis intensivas pressão (P) e temperatura (T) a qual esteja submetida, bem como das forças intermoleculares. Neste sentido o aumento da temperatura, promoverá o aumento da energia cinética e do grau de liberdade, facilitando a formação da fase gasosa. Do contrário, a redução da temperatura ocasiona a diminuição da energia cinética e o aumento da força intermolecular, favorecendo a fase líquida. O aumento da pressão proporciona uma menor distância intermolecular, permitindo que uma fase seja formada, como a fase sólida ou líquida e a diminuição da pressão produz efeito contrário, gerando aumento na distância intermolecular, favorecendo a formação da fase gasosa (ATKINS, 2008).

O diagrama de fases (figura 2) mostra as regiões (sólido, líquido ou gasoso), na qual determinada fase tem maior estabilidade em relação a outras, a delimitação entre as regiões é chamada de curvas de equilíbrio. Entre a região sólido/líquido tem-se a curva de fusão; na

região líquido/gasoso a presença da curva de vaporização e entre a região sólido/gasoso, tem-se a curva de sublimação. Estas curvas não apenas delimitam as regiões, mas também representam pontos de P e T em que as fases (sólido/líquido; líquido/gasoso; sólido/gasoso) coexistem em equilíbrio e se igualam em termos de potencial químico (CASTELLAN, 1999; SANTOS, 2020).

Figura 2-Diagrama de fases de uma substância pura



Fonte: Mukhopadhyay (2000)

As curvas de equilíbrio se encontram em um ponto chamado de ponto triplo (TP), no qual as três fases estão em equilíbrio e coexistem entre si, este ponto é único e invariável para cada substância (MUKHOPADHYAY, 2000).

O ponto crítico (CP) refere-se à condição máxima de temperatura e pressão (temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c)) que um vapor pode condensar, seja por compressão ou aquecimento. Tem-se ainda que, neste ponto a compressibilidade isotérmica tende ao infinito, provocando alterações significativas nas propriedades intensivas de volume molar ou de densidade. Dentro do plano supercrítico, o aumento da pressão diminui a distância intermolecular aumentando a energia potencial intermolecular, como consequência da repulsão entre núcleos e eletrosferas, demonstrando que estas propriedades têm alta sensibilidade a alterações em parâmetros como a pressão. A redução na distância intermolecular provoca ainda, mudança no caminho médio molecular fazendo com que a difusividade e a viscosidade exibam valores intermediários (entre as fases líquida e gasosa) (Mc HUGG, KRUKONIS, 1994; CARVALHO Jr., 2004).

Logo, um componente puro pode ser considerado um fluido supercrítico quando este encontra-se com T e P acima dos pontos críticos (T_c e P_c, respectivamente). A fase formada (fluido supercrítico) nestas condições (acima de T_c e P_c) apresenta propriedades intermediárias entre um gás e um líquido. Acima da T_c as moléculas da substância exibem alta energia cinética, o que dificulta a interação intermolecular (interações de atração) que formaria a fase líquida, ao passo que acima de P_c, a distância intermolecular é diminuída desfavorecendo a formação da fase gasosa, logo tem-se a formação do fluido supercrítico (CASTELLAN, 1999; BALL, 2005; LEVINE, 2009; SANTOS, 2020).

Na tabela 1, estão presentes os valores de densidade, viscosidade e difusidade para os gases, líquidos e fluidos supercríticos:

Tabela 1-Propriedades físicas para diferentes estados de agregação

Propriedades físicas	Gás (1 atm, 15-30°C)	Fluido supercrítico T _c ,P _c	Líquido (1 atm, 15-30°C)
Difusividade (cm ² /s)	0,1-0,4	0,7 x 10 ⁻³	(0,2-2,0) x 10 ⁻⁵
Viscosidade (g/ cm.s)	(0,6-2,0) x 10 ⁻⁴	(1,0-3,0) x 10 ⁻⁴	(0,2-3,0) x 10 ⁻²
Densidade (g/l)	(0,6-2,0) x 10 ⁻³	0,2-0,5	0,6-1,6

Fonte: Brunner (2005).

Este fluido exibe densidade semelhante à do líquido, com viscosidade e difusidade similar a dos gases, a facilidade de penetração do fluido na matriz sólida ocorre devido à baixa viscosidade somada a ausência de tensão superficial e a alta densidade (maior solubilização), esta característica possibilita uma melhor eficiência na extração e na seletividade dos compostos de interesse. O fluido supercrítico pode ainda ter seu poder de solvatação alterado pela manipulação das variáveis P e T, dispensando o uso de inúmeros solventes. Os valores nominais destas variáveis estarão relacionados a solubilidade do soluto de interesse (TURNER, KING, MATHIASSEN, 2001). Diante destas características, existe uma variedade de solventes aplicados com a finalidade de extrair os compostos de interesse em diferentes matrizes. Na tabela 2, constam alguns componentes puros que podem ser usados no processo de extração supercrítica:

Tabela 2-Propriedades críticas de alguns componentes puros

Fluidos	T _c (°C)	P _c (Bar)	D _c g/ (cm ³)
CO ₂	31	72	0,47
N ₂ O	36,5	70,6	0,45
Etano	32,3	47,6	0,20
Propano	96,7	42,4	0,22
Amônia	132,5	109,8	0,23

Água	374,2	214,8	0,32
------	-------	-------	------

Legenda: Tc: Temperatura crítica; Pc: Pressão crítica; Dc: Densidade crítica **Fonte:** Turner, King e Mathiasson (2001), adaptado.

Comumente o dióxido de carbono (CO₂) tem sido utilizado nos processos de extração supercrítica como solvente, por manifestar atoxidade, não inflamabilidade, não corrosividade, elevada pureza, ser inodoro e ter baixo custo. Somasse isto, possuir condições de temperatura e pressão críticas adequadas a conservação de compostos termo sensíveis (Tc=31°C e Pc=72,9 bar). Para a obtenção de compostos apolares, indica-se a extração com CO₂ (pois não possui momento dipolar permanente) sendo apolar, além de possuir um momento quadrupolar que permite a solubilização de compostos polares (MUKHOPADHYAY, 2000).

A molécula de CO₂ é formada por duas ligações covalentes polares, assim os oxigênios apresentam uma maior densidade eletrônica (carga parcial negativa) e um déficit de elétrons no carbono, gerando campos locais, logo o carbono apresentará uma carga parcial positiva como forma de contrabalanceamento, lhe conferindo um momento quadrupolo. O par de dipolos alinhados caracteriza a não existência do momento dipolar na molécula, tem-se ainda que as regiões que estão carregadas negativamente irão interagir com a espécie que estejam carregadas positivamente, este momento quadrupolar possibilita que o CO₂ dissolva certas substâncias com baixa polaridade e outras polares em pressões maiores de 250 bar (NASCIMENTO, 2016; MUKHOPADHYAY, 2000).

O uso de solventes agregados, ou seja, cossolventes, os quais exibem maior polaridade como o etanol, metanol e acetato de etila por exemplo, permitem um aumento no poder de solvatação do solvente, favorecendo que outros compostos possam ser extraídos (MAUL, WASICKY, BACCHI, 2000).

7.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

7.2.1 Etapas

O processo de extração ocorre em duas etapas: a extração (BRUNNER, 1994) (a) e a separação (SOVOVÁ, 2005) (b):

(a) Na extração, o solvente é alimentado no extrator e escoar pelo leito fixo de partículas sólidas, a matriz vegetal têm suas estruturas celulares dilatadas permitindo que os componentes de interesse sejam solubilizados, o escoamento do solvente pela matriz permite transferência de massa do soluto (fase sólida) para a fase líquida, sendo os compostos extraídos e transportados para a superfície do sólido.

(b) A etapa de separação inicia-se com a mistura (solvente + componentes extraídos) seguindo para o separador, neste momento o solvente é separado, devido à redução da pressão levando a evaporação do solvente, o soluto é precipitado e colido para análises.

7.3 PARÂMETROS DO PROCESSO

7.3.1 Pressão

A pressão pode ser conceituada como força normal sobre uma unidade de área da superfície, ou seja, esta pressão depende das moléculas individuais que a constitui e pelas colisões que ocorrem contra a superfície/laterais do recipiente. A pressão é um parâmetro relevante no processo de EFS, o aumento de P promove um aumento no poder solvatação do solvente. Além disso, o aumento de P favorece o efeito de compressão na célula vegetal, melhorando a transferência de massa e na eficiência do processo extrativo (REVERCHON, DE MARCO, 2006; CENGEL e BOLES, 2006; SMITH, VAN NESS e ABBOTT, 2007).

7.3.2 Temperatura

Termodinamicamente pode ser descrita como uma função de estado ligada a movimentação aleatória da vibração de partículas que compõe certo sistema, em temperaturas elevadas, parte majoritária das partículas movimentam-se rapidamente, acelerando a velocidade das reações. Quando ocorre o aumento de T o poder de solvatação diminui devido a densidade diminuir, todavia se a pressão de vapor do soluto aumentar, a eficiência na extração também aumenta. Em condições isobáricas o efeito da temperatura poderá gerar (SALAZAR, 2017; MAZZUTTI et al., 2012):

- a) Aumento da solubilidade ocasionado pelo aumento da pressão de vapor do soluto (menor interação soluto-soluto);
- b) Menor solubilidade pela redução na densidade do solvente.

Quando estes efeitos competem entre si, tendem a resultar no cruzamento de isoterms em certa faixa de pressão, este fenômeno chama-se retrogradação.

7.3.3 Densidade (ρ)

Para o sistema, ela indica os caminhos livres médios dos átomos ou moléculas de dadas substâncias e está intrinsecamente relacionado ao poder de solvatação do fluido, sendo fortemente influenciada pela alteração dos valores nominais de temperatura e pressão, quando

próximas do ponto crítico. O manejo desta propriedade (densidade) torna possível a simulação de variados solventes orgânicos. Se a temperatura for constante e a pressão aumentar, a densidade aumenta, todavia, o contrário também é verdadeiro. Estas alterações quando controladas adequadamente possibilitam que se tenha uma alta seletividade de compostos extraídos da matriz trabalhada (GOODSHIP, OGUR, 2004).

Em geral a solubilidade de um determinado substrato no fluido supercrítico está relacionada a densidade e a pressão de vapor do soluto. Com o aumento da pressão a densidade do fluido aumenta e a pressão de vapor diminui, no entanto se a temperatura aumentar isobaricamente, a densidade do solvente diminui e a pressão de vapor do soluto aumenta. Estes efeitos geram uma inversão na curva de solubilidade (retrogradação) (McHUNG, KRUKONIS, 1986).

7.3.4 Solubilidade

A transferência de massa ocorre quando duas fases de composições diferentes entram em contato, atingindo o estado de equilíbrio após algum tempo, cuja concentração recebe o nome de solubilidade. Acima do ponto crítico os parâmetros T e P exercem elevada influência sobre a solubilidade a qual, aumenta com o aumento da P e diminui com o aumento da T. O efeito da T sobre a solubilidade promove comportamentos complexos; quando T aumenta a pressão de vapor do soluto também aumenta, gerando uma maior solubilidade, todavia, o aumento de T promove uma menor densidade do solvente ocasionando também uma diminuição de solubilidade. A solubilidade do soluto estará relacionada ao equilíbrio entre as fases do sistema, em leitos fixos, o equilíbrio ocorrerá entre a matriz sólida, o soluto e o solvente. (FERREIRA, 1996; KING, BOTT, 1993).

7.3.5 Cossolvente

O processo de extração supercrítica é excelente para captura de componentes apolares e de polaridade média, todavia, compostos muito polares são menos solubilizados somente em CO₂, ainda que este esteja com alta densidade, necessitando assim, de um cossolvente adequado. Os cossolventes além de melhorarem a solubilidade do soluto, também modificam a seletividade, isto ocorre devido as interações físico-químicas entre o soluto e o cossolvente (MARINHO, 2017). Um dos efeitos do uso de cossolventes polares na EFS, é o agrupamento molecular em torno das moléculas do soluto polar, os solutos são englobados por uma espécie de esfera de solubilização formada por elevada concentração de cossolvente (TAYLOR, 1996).

São propostos quatro mecanismos de ação a respeito da interação do cossolvente na polaridade do fluido supercrítico, sendo que i,ii e iii ocorrem simultaneamente em matriz vegetais (CAMEL, 1998; PINTO, F PINTO, JARDIM, 2006):

- i) Aumento da solubilidade do soluto pela mistura do fluido supercrítico/cossolvente;
- ii) Os solutos que estão presentes nos sítios ativos da superfície da matriz são trocados pelo cossolvente;
- iii) O cossolvente é fixado na superfície da matriz, possibilitando que as chances de ocorrer uma readsorção do soluto sejam diminuídas.
- iv) A matriz sofre um “inchaço” favorecendo a penetração do fluido supercrítico.

7.4 EXTRAÇÃO FRACIONADA POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

A extração fracionada por fluido supercrítico possibilita a redução das etapas de seleção para obtenção de compostos bioativos, promovendo o fracionamento do extrato durante o processo de extração, evitando etapas posteriores de purificação dos compostos. Comumente utiliza-se separadores, caudal do solvente, cossolventes, misturas de solventes pressurizados ou até mesmo mudança sequencial de solventes usados no sistema de extração. Logo, as variáveis do processo devem ser otimizadas pois características na composição da matriz, tamanho da partícula por exemplo, influenciarão no processo de transferência de massa. Devido à redução nos procedimentos posteriores de separação e purificação dos extratos, coleta-se frações com quantidade significativas de compostos de interesse como produto. Podendo ser feito com uso de ciclones/coletores ou com variação de solventes em relação ao tipo e a quantidade a ser usada. Seguem as etapas de extração com solvente mais apolar (CO₂) para obtenção de substâncias voláteis ou lipídios, por exemplo, seguindo do uso de um outro solvente (cossolvente) para extração de compostos mais polares, sem necessidade de mudança de leito (BRAGA, DIAS, DE SOUSA, 2015).

8 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DA MATÉRIA PRIMA

As cascas externas da árvore da espécie *Brosimum acutifolium*, foram coletadas em Barcarena, Pará. Acondicionadas na forma de embrulho por papel, ensacoladas e enviadas para o laboratório de extração (LABEX/FEA-UFPA).

8.2 TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

8.2.1 Secagem e moagem

Aproximadamente 2 kg de cascas, foram submetidas a secagem em batelada por um período de 72 horas a 20°C, utilizando-se para tanto um secador de bandeja com circulação de ar forçado (Figura 3). A assepsia foi realizada com auxílio de um pincel do tipo trincha para retirada de impurezas na superfície das amostras. Posteriormente, as amostras secas foram submetidas a um processo de cominuição em moinho de facas.

Figura 3-Matéria prima na etapa de secagem



Fonte: A própria autora (2020)

8.2.2 Avaliação granulométrica

As amostras foram submetidas a tamisação em um conjunto constituído de cinco (5) peneiras vibratórias da série Tyler (W.S. Tyler, USA): 9, 20, 28, 32 e 35. Tempo de peneiramento de 15 minutos para todos os ensaios, com frequência de vibração na posição de 10 potenciômetro da máquina vibratória (JORDAN et al., 2016). Em duplicata. Após a etapa de tratamento da matéria prima, as amostras foram armazenadas em embalagem a vácuo (Figura 4):

Figura 4-Matéria prima cominuída



Fonte: A própria autora (2020)

8.2.3 Determinação do Diâmetro Médio da Partícula (Ds)

Obtenção do diâmetro médio da amostra pelo método analítico (Diâmetro de Sauter), conforme Kunii e Levenspiel (1991), (Equação 1):

$$Ds: \sum_{i=1}^6 \frac{1}{\left(\frac{\Delta x_i}{D_p}\right)} \quad (\text{Equação 1})$$

A partir dos seguintes dados (JORDAN et al., 2016):

Massa pesada (m_i): Massa retida na peneira;

Massa total da amostra (m_t): Massa total utilizada;

Fração Mássica (Δx_i): calculada pela razão entre a massa retida na peneira e a massa total da amostra;

Diâmetro médio (D_{p_i}): resultado da média aritmética da abertura da referida peneira e a superior a ela;

Fração Peneirada (x_i): referente a quantidade de material que efetivamente passou pela referida peneira;

Fração Retida (y_i): referente a fração de material que efetivamente ficou retida na referida peneira;

Razão ($\Delta x_i/D_p$): razão entre a Fração Mássica e o Diâmetro Médio.

8.2.4 Avaliação centesimal

Foram realizadas análises segundo a normas do Instituto Adolfo Lutz (2008) de Resíduo mineral fixo (%RMF), Umidade (%), Proteínas (%) e lipídios (%). Todas em triplicata

8.2.5 Cálculo de Densidade

As densidades do CO₂, misturas com cossolventes (CO₂ + EtOAc) e (CO₂ + EtOH) foram calculadas pelo software **Phase Equilibrium 2000 (PE2000)** (PFOHL, STANIMIR, BRUNNER, 2000), empregando a equação de estado Peng-Robinson, com as respectivas regras de misturas com as regras combinadas com dois parâmetros de interação binária (quadrática). A tabela 3, contempla as variáveis estudadas no processo, selecionadas **conforme os resultados de maiores valores nominais de densidade** obtidos pelo programa:

Tabela 3-Sistema para extração sequenciada CO₂+ Cossolvente (80:20)			
	Componentes (%)	Temperatura (°C)	Pressão (Bar)
Sistema	CO ₂ CO ₂ +EtOAc CO ₂ + EtOH	40	250
			300
		60	350

Fonte: A própria autora (2021)

As variáveis de T e P, foram escolhidas com base na desejabilidade em extrair compostos que apresentam características termo sensíveis com o mínimo de degradação do material (REVERCHON, de MARCO, 2006) e por apresentarem melhor resultados de densidade de mistura e do solvente, inferindo um melhor poder de solvatação.

8.3 DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL

A extração fracionada com CO₂ e CO₂ + cossolventes, realizada na matriz tratada contou com os parâmetros estabelecidos na tabela 3, possibilitando a obtenção das isotermas de rendimento global, observadas pela variação dos parâmetros T e P.

O cálculo do rendimento global em base seca pode ser realizado através da relação entre a massa total de extrato obtido e a massa de alimentação de matéria-prima (em base seca), de acordo com a Equação 2:

$$X_{0b.s} = \frac{m_e}{m_a \frac{(100 - u_a)}{100}} * 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde $X_{0b.s}$: rendimento global percentual de extrato em base seca (%); m_e : massa de extrato em gramas (g); $m_{amostra}$: massa da amostra (alimentação) em gramas (g); U_a : umidade percentual da amostra (%). As isotermas de rendimento global foram plotadas em gráficos e calculados a média e o desvio padrão sendo realizada uma comparação do rendimento global obtido em cada condição.

A isotermas são determinadas para que o rendimento global possa ser visualizado através do comportamento do sistema, o qual varia pelas mudanças de temperatura e pressão, as quais designam os maiores rendimentos e composição química dos compostos de interesse. Uma mesma matriz pode apresentar isotermas diferentes, pois fatores como localidade, subespécies, sazonalidade, período de coleta influenciarão na composição química da matéria prima e conseqüentemente refletirão na isoterma obtida.

8.4 EXTRAÇÃO SEQUENCIADA EM LEITO FIXO (SFCO₂; CO₂ + EtOAc E CO₂+EtOH)

A extração sequencial teve como premissa a metodologia de extração utilizada por Torres et al., (2000), o qual extraiu por maceração a matéria vegetal (casca de mururé) com CH₃(CH₂)₄CH₃, diclorometano (CH₂Cl₂), EtOAc e MeOH, **sucessivamente**, por ordem **crescente de polaridade**, obtendo como resultado deste processo extrativo a presença das moléculas denominadas **Brosimina A e Brosimina B**. A **extração sequenciada** com fluido supercrítico, ocorreu em três etapas (procedimento descrito no subtópico 8.4.1). Para o presente trabalho, as etapas ocorreram com extração por CO₂; CO₂ + EtOAc; CO₂+ETOH em leito fixo, por **ordem crescente de polaridade**, com diferentes parâmetros de temperatura e pressão. Este processo de extração foi determinado para que se conseguisse obter um extrato no qual a molécula de **Brosimina B** estivesse presente.

As extrações foram realizadas no Laboratório de Extração (LABEX/FEA-UFPA), no Spe-edTM SFE (Applied Separations, modelo 7071, USA) (Figura 5). O Spe-edTM SFE está acoplado em um compressor que apresenta volume interno 19,7 L (Schulz, modelo CSA 7,8, Brasil), um recirculador (Polyscience, modelo F08400796, USA), um cilindro CO₂ (pureza 99,9 %, White Martins, Brasil), uma bomba de cossolvente (serie 1500) e um medidor de vazão na saída do sistema (Dwyer, RMA, USA).

Figura 5-Applied Separations, modelo 7071, USA



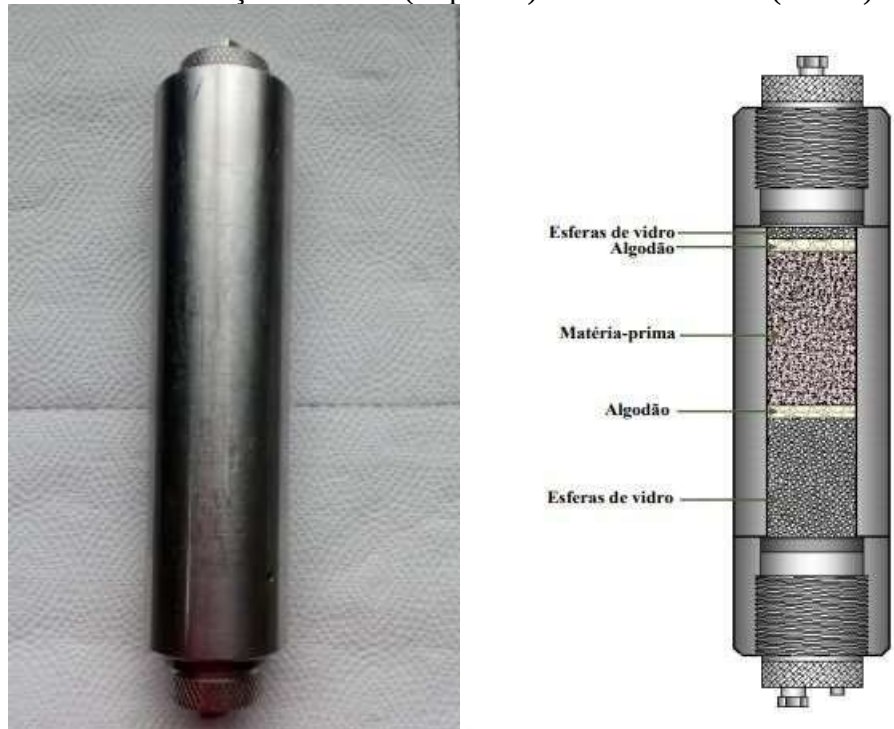
Fonte: A própria autora (2021)

8.4.1. Procedimento

8.4.1.1. Preparo da célula de extração

O empacotamento da célula de extração de 100 mL, com dimensões de 15,2 cm de comprimento; 3,17 cm de diâmetro interno e 12,62 cm de comprimento interno, foi realizado com aproximadamente 10 g de matéria-prima. A montagem da célula inicia-se acoplando o encaixe inferior, adicionando-se em sua extremidade interna esferas de vidro e algodão visando reduzir ou evitar a passagem de partículas da matriz para os dutos capilares. Posteriormente acrescenta-se a massa de matriz, finalizando com o acréscimo de uma porção de algodão e esferas de vidro, respectivamente, para então fechar a célula (Figura 6). Após isto, a célula de extração foi inserida dentro do forno de Spe-ed™ SFE para inicializar a extração (Figura 7). Procedimentos de preparo da célula já descritos por autores como Salazar (2017) e Urbina (2019).

Figura 6-Célula de extração utilizada (esquerda) e célula ilustrada (direita)



Fonte: A própria autora (2021) e Salazar (2017)

Figura 7-Célula de extração no forno

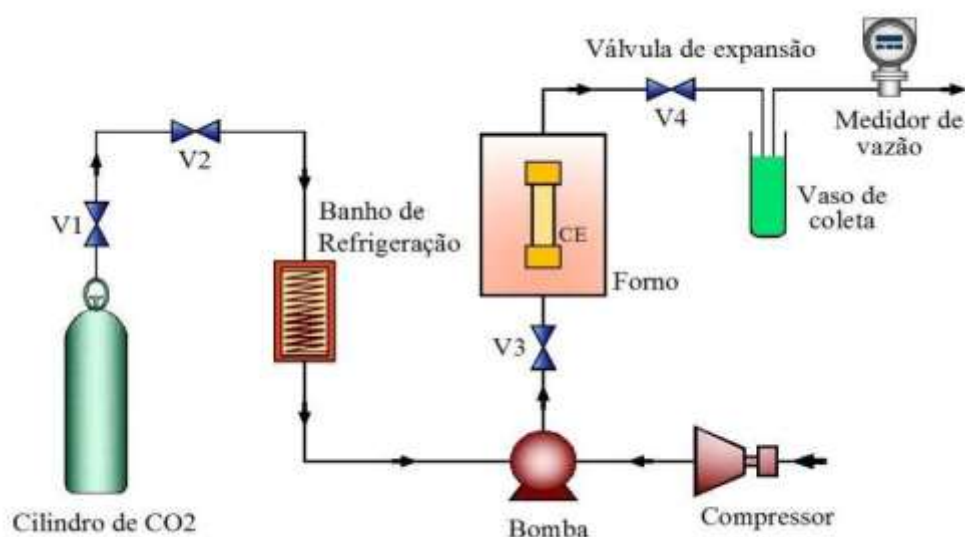


Fonte: A própria autora (2021)

8.4.1.2. Procedimento operacional

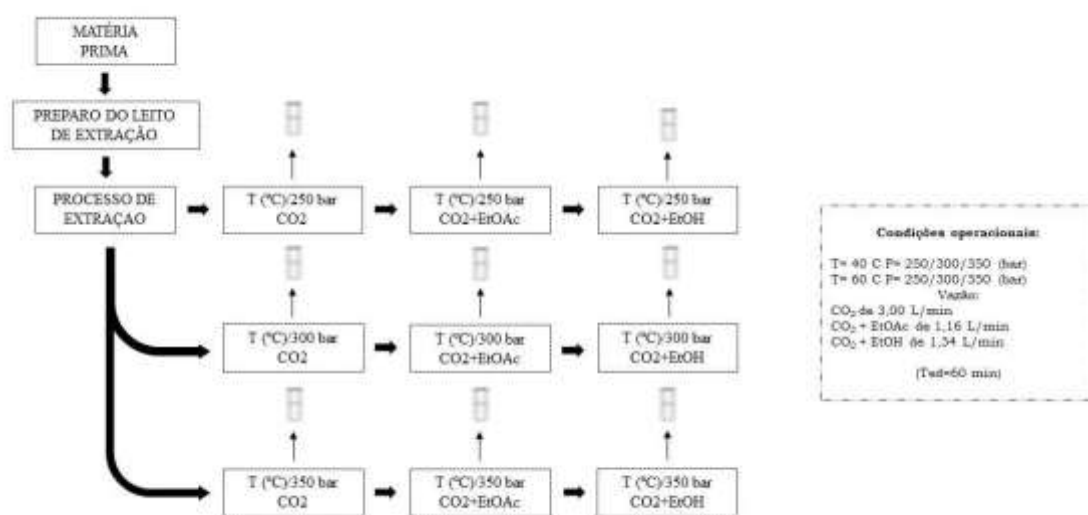
O procedimento operacional para o processo de extração pode ser acompanhado através da figura 8 e 9, foi realizado segundo o manual de operações da Applied Separations (2004). Os ensaios da EFS foram executados, utilizando o solvente CO_2 e as misturas $\text{CO}_2 + \text{EtOAc}$ e $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ (pureza 96,0 %, Dinâmica, Brasil). Os parâmetros operacionais mantidos constantes foram o tempo de extração dinâmica (T_d) de 60 min, a vazão de CO_2 de 3 L/min, $\text{CO}_2 + \text{EtOAc}$ de 1,16 ml/min com T_d de 60 min e vazão de $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ de 1,34 ml/min com T_d de 60 min e a massa de matéria-prima de 10 g.

Figura 8-Esquema da extração supercrítica.



Fonte: Cordeiro, 2015.

Figura 9-Procedimento da extração sequenciada realizado



Retificação: Onde está escrito $\text{CO}_2 + \text{EtOAc}$ de 1,16 L/min e $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ de 1,34 L/min leia-se, leia-se $\text{CO}_2 + \text{EtOAc}$ de 1,16 ml/min e $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ de 1,34 ml/min

Fonte: A autora (2022)

- a) Liga-se o banho de refrigeração, aguardando até atingir -10°C .
- b) Verifica-se se todas as válvulas estão fechadas (V1, V2, V3, V4 e V5)
- c) Acopla-se a célula de extração ao forno e liga-se o extrator.
- d) Liga-se o compressor, responsável pela pressurização de CO_2 .
- e) Abre-se as válvulas V1, V2 e V3 respectivamente, para pressurização do sistema por meio da pressão do cilindro de CO_2 . Verifica-se se existem vazamentos, podendo ser visíveis nos pontos de junção entre a célula e os dutos capilares.
- f) Confirmando-se que não existem vazamentos, acopla-se o frasco coletor no duto de saída (V5) e ao medidor de vazão.
- g) Liga-se a bomba de cossolvente. Deixando os cossolventes a serem utilizados preparados.
- h) Programa-se o equipamento para as condições operacionais estabelecidas e a válvula V5 para a temperatura adequada de modo a evitar o congelamento do duto de saída, ocasionado pelo efeito Joule-Thompson (expansão isentálpica).
- i) Inicia-se a extração fracionada pelo período dinâmico, abrindo a válvula V4 lentamente seguido da válvula V5 cuidadosamente com vazão de CO_2 de 3,00 L/min e tempo de 60 minutos.
- k) Terminado este tempo, sequencialmente e rapidamente muda-se o frasco coletor, acionando-se a bomba de cossolvente (EtOAc) com vazão de 1,16 mL/min, pelo tempo de 60 minutos.
- l) Novamente, esgotado o tempo, para-se a bomba de cossolvente e troca-se de frasco coletor e de cossolvente (EtOH) programando a vazão para 1,34 mL/min e acionando-a, durante 60 minutos.
- m) Finalizado a extração, procedesse parando a bomba de cossolvente e fechando as válvulas (V1 e V2) para cessar a alimentação de CO_2 .
- n) Desliga-se o painel digital responsável pela programação operacional, para a diminuição da temperatura do forno e da válvula V5.
- o) Para iniciar a despressurização do sistema rotaciona-se a válvula de pressão no sentido anti-horário até seu limite. Manuseia-se as válvulas V4 e V5 para uma vazão adequada. A completa despressurização pode ser verificada pela vazão 0,00 L/min obtida pelo medidor de vazão ou pela pressão 0 bar do sistema.

- p) Após a despressurização, pode-se desacoplar o frasco coletor do sistema, mantendo o extrato longe da incidência solar.
- o) Para iniciar uma nova extração, retira-se a célula de extração do forno, desmontando-a posteriormente. Após a assepsia da mesma, inicia-se a montagem da célula e refaz-se os procedimentos já descritos.
- q) A limpeza do equipamento deve ser realizada com álcool etílico P.A. 99,5%, a seringa que acompanha o equipamento para limpeza dos dutos capilares na linha de extração. A célula de extração pode ser limpa com detergente neutro, água e esponja.

8.4.1.3 Coleta e armazenamento dos extratos

O solvente dos extratos obtidos foi parcialmente evaporado e o produto (extrato + solvente) transferido para frascos de penicilina 10 ml. Após secagem completa, a massa do extrato foi pesada para cálculos de rendimento e armazenada sob refrigeração.

9 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Os extratos foram levados ao Laboratório Central de Extração do Instituto de Ciências Naturais e Exatas (ICEN/UFPA) para análise por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) para avaliação qualitativa da composição química dos extratos e ao Laboratório de Tecnologia supercrítica (LABTEC) para avaliação quantitativa da composição química.

9.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)

A determinação da composição química dos extratos de *Brosimum acutifolium* foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) de acordo com o método de Wagner e Bladt (2001), no Laboratório Central de Extração (ICEN/UFPA). Utilizando um CAMAG-TLC/HPTLC (CAMAG, Suíça), equipado com automatic TLC sampler (ATS 4), Automated Multiple Development (AMD 2) e TLC Visualizer. Os extratos a serem utilizados serão (tabela 4):

Tabela 4-Os extratos obtidos via (CO₂+ EtOAc) e (CO₂+EtOH) de maiores rendimentos

Extrato (CO ₂ +EtOAc)	Temperatura (K)	Pressão (bar)	Codificações	Densidades (kg/m ³)
	313,15	350	2T1P3	960,213

	333,15		2T2P3	912,866
Extrato (CO ₂ +EtOH)	Temperatura (K)	Pressão (bar)	Codificações	Densidades (kg/m ³)
	313,15	250	3T1P1	946,716
	333,15		3T2P1	883,267

Fonte: A própria autora (2022)

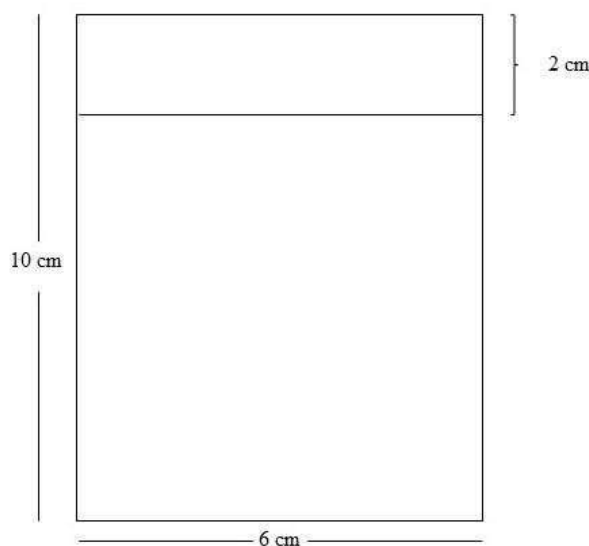
9.1.1 Preparo dos extratos e padrões

Os extratos foram solubilizados em MeOH (99,9%, Tedia®, Brasil) a uma concentração de 10.000 ppm e os padrões foram preparados a uma concentração de 200 ppm.

9.1.2 Preparo das placas de sílica gel 60 Å

As placas de sílica gel 60 Å (SiliCycle Inc, Canada) foram inicialmente limpas e ativadas. Para tanto, as placas foram cortadas em dimensões de 10x6 cm, medindo-se 2 cm de comprimento para arraste de impurezas e 8 cm para corrida (Figura 10). Posteriormente, preparou-se em uma cuba de vidro, 20 mL de solvente MeOH (99,9%, Tedia ®, Brasil), na qual a placa foi depositada para limpeza. Após a limpeza, a placa é ativada por aquecimento, sendo colocada na estufa a 110°C por 30 segundos.

Figura 10-Imagem ilustrativa da placa de sílica Gel

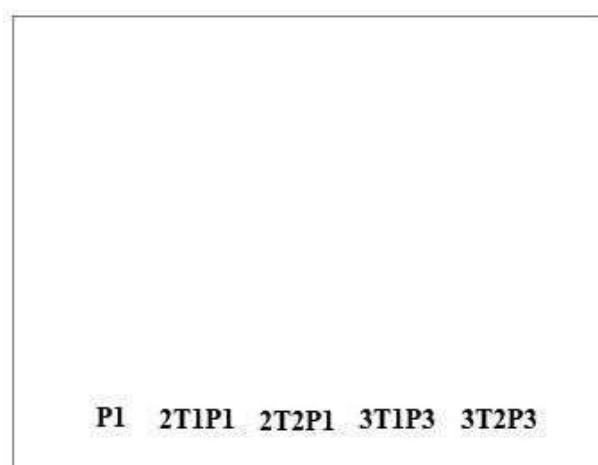


Fonte: A própria autora (2022)

Foram aplicados 10 µL dos extratos e dos padrões em forma de banda em placas de sílica gel 60 Å (SiliCycle Inc, Canada) através do módulo aplicador automático de amostras (CAMAG, ATS 4-Automatic TLC Sampler, Suíça). Tendo como fase móvel, hexano/ EtOAc

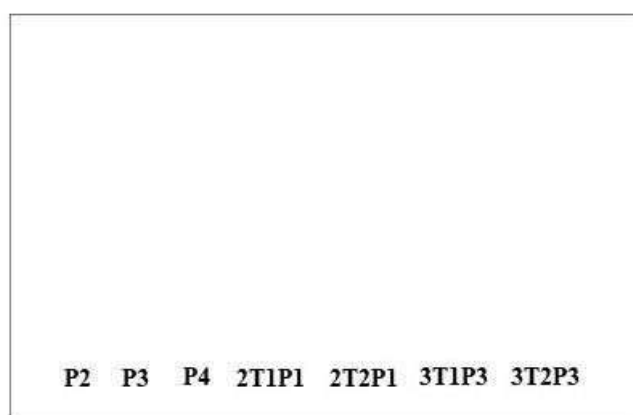
40 % para identificação de flavonóides, usando padrão Quercetina (revelador NP/PEG) identificada como P1e fase móvel DCM/MeOH 5%. para identificação dos seguintes compostos; cumarinas, ácidos graxos e compostos fenólicos, com uso dos seguintes padrões; β - Amirina, Metil Oleato e Timol (revelador VAS), identificados como P2, P3 e P4, respectivamente. As placas após serem derivatizadas pelos reveladores foram visualizadas sob luz visível (luz branca) e luz violeta 366 nm, respectivamente. As placas foram dispostas, com relação aos extratos e padrões da seguinte maneira (figura11 e12):

Figura 11-Disposição dos extratos na placa para análise de flavonoides



Fonte: A própria autora (2022)

Figura 12-Disposição dos extratos na placa para análise de cumarinas, terpenos, ácidos graxos, compostos fenólicos



Fonte: A própria autora (2022)

9.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Extração: Os compostos fenólicos foram extraídos com solução extratora (70% acetona, 29,5% água destilada, 0,5% ácido acético) a uma concentração de 46,08 mL/g.

Leitura: 515 nm, triplicata.

Curva analítica: Curva de Trolox de 7 pontos (0 - 25 µmol/L), Equação da reta: $y = 0,0222x + 0,0206$ / $R^2 = 0,991$.

Equipamento: Espectrofotômetro UV/VIS (modelo UV-M90, marca Bel Engineering).

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico, serão discutidos os resultados referentes análise centesimal da matriz; determinação do diâmetro médio da partícula; determinação das isotermas de rendimento global; avaliação da composição química do extrato e atividade antioxidante.

10.1 AVALIAÇÃO DA CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA PRIMA

Para caracterização da casca da espécie em base seca (tabela 5), não foi encontrado na literatura informações a respeito dos parâmetros centesimais específicos para a referida matriz, todavia, de acordo com Silva e Casali (2000), o teor de umidade de cascas vegetais devem estar entre 8% e 14%, valores acima desta faixa podem ocasionar a deterioração da matéria prima e gerar transformações químicas indesejadas nos metabólicos secundários, logo, observasse que a matriz apresenta umidade dentro do aceitável.

Em relação ao processo de extração, o excesso de umidade da matéria prima tende a prejudicar a extração de compostos que possuem afinidade com o CO₂ e em outras situações se existe a desejabilidade de extrair compostos mais polares, a presença de água seria indicada para melhorar a interação do solvente com o soluto (POORMORTAZAVI, HAJIMIRSADEGHI, 2007; PEREIRA, MEIRELES, 2010; BATISTA, 2016).

Tabela 5-Características da amostra em base seca

Umidade (%)	Lipídios (%)	Cinzas (%)	Proteínas g/100 mL
13,63	0	2,1220±0,05*	4,4106±0,10*

Legenda: *Desvio padrão

Fonte: A própria autora (2021)

Não foi evidenciado valor expressivo de lipídios, sugerindo que ela não apresenta óleos extraíveis, o que foi constatado na extração por fluido supercrítico quando da passagem apenas de CO₂, a qual não foi coletado nenhum extrato. Carelli et al., (2021) também notou o baixo valor lipídico, ao avaliar a composição centesimal da casca do fruto da espécie *Brosimum gaudichaudii* Trécul *in natura* (0,78±0,05).

Os valores de proteínas foram notáveis ($4,41 \pm 0,10$), haja vista que estão presentes em várias partes estruturais, casca, caule, folhas entre outras, e estão relacionadas a própria alimentação das árvores e seu metabolismo (DA SILVA et al., 2019). Valores proteicos significativos também foram constatados ($7,27 \pm 0,23$) por Land et al. (2017) e Carelli et al., (2021), ($3,76 \pm 0,62$) no estudo da espécie *Brosimum gaudichaudii* Trécul.

Para as cinzas ($2,12 \pm 0,05$), tem-se considerável quantidade de resíduos minerais isentos de carbono dentre os quais, podem estar presentes materiais estranhos que aderem na superfície da matriz.

10.2 DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS DA MATRIZ

Para a extração por fluidos supercríticos, o tamanho das partículas pode gerar efeitos no rendimento obtido, em geral o menor diâmetro da partícula permite um maior contato entre o fluido e matriz, devido ao aumento da superfície de contato. A partir dos dados disponíveis na tabela 6, o diâmetro médio obtido pela equação 1, foi de 0,456 mm. 9, 20, 28, 32 e 35

Tabela 6-Dados granulométricos

Dpi(mm)	m_i (g)	ΔX_i	Dpi(mm)	X_i	Y_i	$\Delta X_i \backslash D_{pi}$
2,000	59,0501	0,2931	2,0000	0,7069	0,2931	0,1465
850	43,0207	0,2135	1,4250	0,4934	0,5066	0,1498
590	13,9402	0,0692	0,7200	0,4243	0,5757	0,0961
500	7,3153	0,0363	0,5450	0,3880	0,6120	0,0666
425	7,4260	0,0369	0,4625	0,3511	0,6489	0,0797
Fundo	70,7478	0,3511	0,2125	0	1,0000	1,6523
Total						2,1910

Fonte: A própria autora (2019)

Os diâmetros médios comumente utilizados se encontram na faixa de 0,25mm-2mm, assim o resultado granulométrico obtido foi satisfatório, pois permite uma padronização das partículas o que como já mencionado, torna o processo de extração mais eficiente (REVERCHON, DE MARCO, 2006).

10.3 DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL

Este subtópico apresentará os resultados encontrados na forma de tabelas e gráficos nas três etapas de extração. O sistema de extração sequencial, foi realizado com SFCO₂;

CO₂+EtOAc e CO₂+EtOH em ordem crescente de polaridade. Os parâmetros de temperatura foram 40 °C e 60°C para pressões de 250, 300 e 350 bar.

10.3.1 Isoterma de rendimento global CO₂

Conforme já fora mostrado na tabela 6, a matriz não apresentou quantidade significativa de lipídios, então espera-se que a passagem do SFCO₂ não extraia substância lipídica, o que foi comprovado na extração, obtendo-se frasco coletor vazio (figura 13) durante os 60 minutos de extração.

Figura 13-Frasco coletor CO₂



Fonte: A própria autora (2021)

10.3.2 Isoterma de rendimento global CO₂+EtOAc

Na tabela 7, encontram-se disponíveis os resultados de rendimento obtidos do sistema (CO₂+ EtOAc) em diferentes condições operacionais de extração:

Tabela 7- Rendimentos CO₂+ EtOAc (80:20) (v/v)

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Massa do Extrato (g)	Massa Média de Extrato (g)	Rendimento (%)	Densidade (kg/m ³)
40	250	0,0307	0,0284 ± 0,0033*	0,3288	927,279
		0,0260			
	300	0,0375	0,0296 ± 0,0111*	0,3427	944,805
		0,0218			
	350	0,0392	0,0394 ± 0,0003*	0,4562	960,213
		0,0396			
60	250	0,0458	0,0449 ± 0,0013*	0,5198	870.942

	0,0440			
300	0,0453	0,0468 ± 0,0021*	0.5418	893.493
	0,0483			
350	0,0501	0,0688 ± 0,0264 *	0.7966	912.866
	0,0874			

Legenda: Desvio padrão *; extração em duplicata

Fonte: A própria autora (2021).

Ao se avaliar a isoterma a 40°C, observa-se que o maior rendimento (0,46 %) foi obtido a 350 bar com densidade do solvente de 960,213 kg/m³. Neste caso, identifica-se a influência da densidade do solvente e da pressão no rendimento obtido, a densidade do solvente é um parâmetro afetado por variações de pressão, que consequentemente refletirão em seu poder de solvatação (HERRERO et al., 2013; DE MELO et al., 2014; PEREIRA et al., 2016), verifica-se, portanto, que nesta isoterma, o aumento da pressão promoveu um aumento na densidade do solvente que por conseguinte gerou um maior rendimento pelos motivos já elucidados.

Para a isoterma a 60°C, o maior rendimento obtido (0.79) ocorreu a 350 bar (densidade do solvente de 912.866 kg/m³). Novamente, observa-se que a variável pressão influenciou na densidade de solvente, gerando um aumento no rendimento do processo. Na figura 14, tem-se os extratos de maiores rendimentos, onde as codificações 2A e 2B representam CO₂ + EtOAc, com a temperatura em grau celsius e pressão em bar:

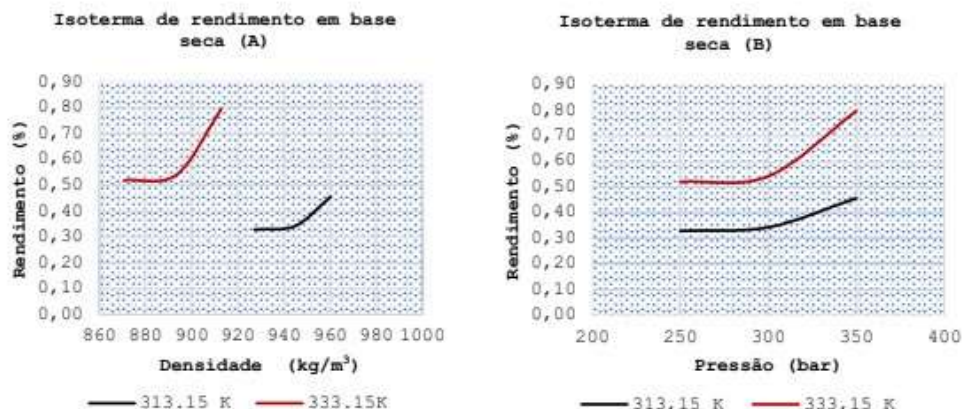
Figura 14-Extratos de maiores rendimentos CO₂ + EtOAc



Fonte: A própria autora (2021).

Na figura 15, encontram-se os gráficos das isotermas globais em base seca, para temperaturas de 40°C (313,15 K) e 60°C (333,15 K) e pressões de 250, 300, 350.

Figura 15-Gráfico das isotermas de rendimento (CO₂ + EtOAc) em função da densidade e isoterma de rendimento em função da pressão, respectivamente



Fonte: A própria autora (2021)

O comportamento das isotermas pode ser embasado por vários trabalhos na literatura cita-se para esta pesquisa, o de Pies (2017) no estudo da casca da jabuticaba, que obteve um comportamento do sistema semelhante, observando que, fatores como densidade, condutividade térmica e viscosidade do CO₂ são parâmetros afetados pela variação de pressão, possibilitando que o soluto seja liberado no interior da partícula. Justifica-se ainda conforme Carvalho Jr (2005) o qual argumenta que a elevação da temperatura promove o encurtamento da distância entre as moléculas, aumentando o poder de solvatação podendo ter como um dos seus efeitos um maior rendimento mássico. Ao se avaliar o sistema isobaricamente, para qualquer valor nominal de pressão, (sugere-se 40°C e 60°C para pressão de 350 bar) observa-se que o aumento da temperatura ocasionou uma redução na densidade do solvente (rendimento *versus* densidade), todavia promoveu um maior rendimento devido ao aumento na pressão de vapor do soluto (GOODSHIP, OGUR, 2004).

10.3.3 Isoterma de rendimento global CO₂+EtOH

Nota-se que para a primeira isoterma do sistema (CO₂+EtOH) (Tabela 8), o maior rendimento (0,3126 %) ocorre a 250 bar (densidade do solvente 946,716 kg/m³). Nesta situação, tem-se que o aumento da pressão apesar de gerar um aumento na densidade do solvente, provocou um menor rendimento na extração, sugerindo-se que a pressão de vapor do soluto é dominante neste sistema.

Tabela 8-Rendimentos da extração (CO₂+EtOH) (80:20) v/v

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Massa do Extrato (g)	Massa Média de Extrato (g)	Rendimento (%)	Densidade (kg/m ³)
40	250	0,0270	0,0272 ± 0,0003*	0,3126	946,716
		0,0274			
	300	0,0168	0,0161 ± 0,0010*	0,1864	961,983
		0,0154			
	350	0,0160	0,0148 ± 0,0017*	0,1714	975,609
		0,0136			
60	250	0,0209	0,0198 ± 0,0003*	0,2292	883,267
		0,0187			
	300	0,0177	0,0168 ± 0,0010*	0,1945	903,785
		0,0159			
	350	0,0159	0,0157 ± 0,0003*	0,1819	921,620
		0,0156			

Legenda: * Desvio Padrão

Fonte: A própria autora (2021).

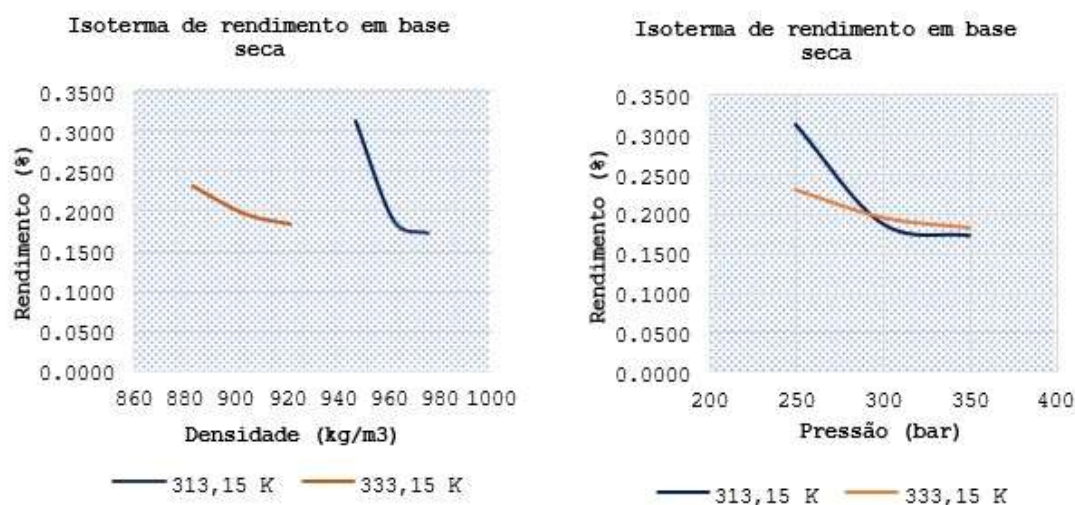
A isoterma a 60 °C, exibe um comportamento semelhante, no qual o maior rendimento (0,2292 %) foi encontrado em 250 bar (densidade do solvente igual a 883,267 (kg/m³). Conforme a pressão do sistema aumenta, tem-se o aumento da densidade do solvente, porém obtém-se um menor rendimento no processo, como já mencionado sugere-se que a pressão de vapor do soluto é dominante neste sistema (SALAZAR, 2017; MAZZUTTI et al., 2012). Na figura 16, tem-se os extratos de maiores rendimentos, onde as codificações 3A representam CO₂ + EtOH, com a temperatura em grau celsius e pressão em bar:

Figura 16-Extratos de maiores rendimentos (CO₂+EtOH)

Fonte: A autora, 2021

De maneira sucinta, tem-se nestes casos um efeito coligativo, que provoca uma mudança em certas propriedades do solvente, quando um soluto não volátil (ponto de ebulição do soluto é superior ao do solvente) e o solvente entram em contato (SPENCER LIMA, 2014). Logo, o soluto dificulta a evaporação do solvente, mas a condensação do solvente não é afetada, fazendo com que a pressão de vapor do solvente seja diminuída (a que é exercida pelas moléculas contra a interface para passar para o estado vapor) e a pressão do soluto seja dominante. O rendimento obtido, se assemelha ao encontrado por Pies (2017) e Rodrigues (2017) ao estudar a SFE via CO₂ de cascas de jabuticaba e *Cróton palanostigma*, respectivamente com rendimentos entre 0,2 a 0,4 %; 0,2 a 1,5 % com uso de cossolvente EtOH. Na figura 17, os gráficos das isotermas globais em base seca, para temperaturas de 40°C (313,15 K) e 60 °C (333,15 K) e pressões de 250, 300, 350 podem ser observados:

Figura 17-Gráfico das isotermas de rendimento (CO₂ + EtOH) em função da densidade e isoterma de rendimento em função da pressão, respectivamente



Fonte: A própria autora (2021)

Ao se analisar a isoterma de rendimento *versus* pressão, tem-se o chamado ponto de inflexão ou cruzamento. Este achado, é coerente com o que (TURNER, KING e MATHIASSEN, 2001) elucidam, no qual em um sistema isobárico, o aumento da temperatura torna a força do fluido dependente da pressão. Se esta pressão estiver abaixo do ponto de cruzamento, ocorrerá uma redução no poder de solvatação do fluido. No entanto, acima do ponto de cruzamento, a elevação da temperatura promoverá uma melhora na eficiência do processo, ainda que a densidade do fluido seja diminuída, o que é justificável pela dominância da pressão de vapor. A observância de dois pontos do gráfico, fornece algumas informações relevantes para entender o cruzamento das isotermas.

Nota-se que para pressão de 250 bar, o aumento da temperatura (60°C) ocasionou um baixo rendimento, gerado pela redução da densidade. Outro ponto interessante, ocorre na faixa de 300 bar, onde as isotermas se invertem, e tem-se que acima deste ponto de inflexão, na temperatura de 60 °C obtém-se melhor rendimento, ainda que ocorra a diminuição da densidade. O ponto de inflexão dependerá das interações entre o soluto e o fluido.

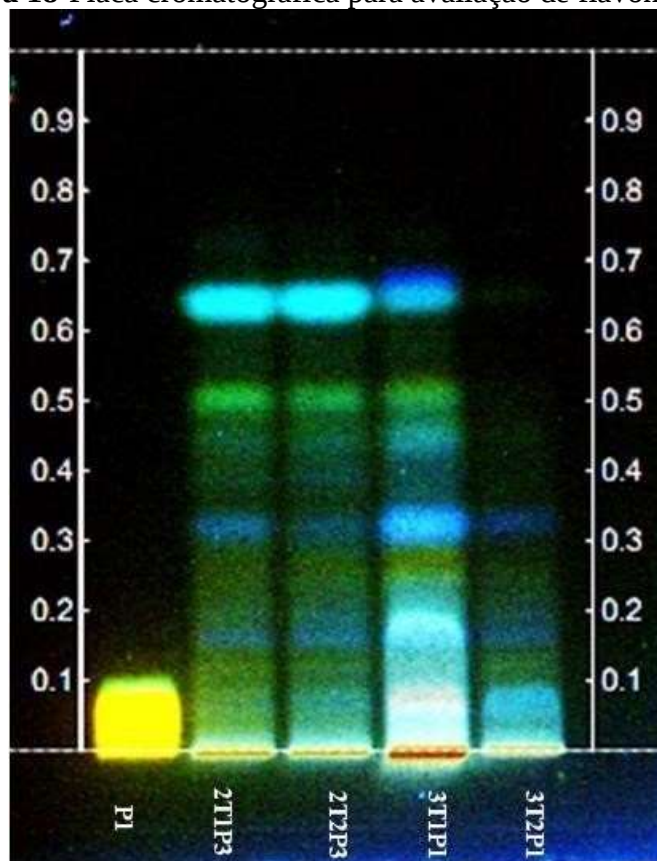
11 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Para a análise qualitativa da composição química, foram utilizadas duas placas (dispostas conforme figura 8 e 9, já mencionado). Em cada placa foi aplicado um padrão específico (200 ppm cada) e quatro inóculos (10.000 ppm cada extrato), a qual foram derivatizadas com reveladores específicos havendo formação de bandas e colorações próprias da classe de composto analisado.

11.1 FLAVONOIDES

A placa cromatográfica (figura 18) foi revelada com NP/PEG sendo visualizada em luz ultravioleta (UV), cujo comprimento de onda é 366 nm. De acordo com Wagner e Bladt (2001), ao serem excitados os compostos presentes na amostra avaliada, tendem a se tornar fluorescentes quando excitados pela luz UV. Os flavonoides então podem exibir uma coloração, amarela intensa; amarela esverdeada e azul.

Figura 18-Placa cromatográfica para avaliação de flavonoides



Legenda: P1= Quercetina; Fator de retenção (Fr) nas margens direita e esquerda)

Fonte: A própria autora (2022)

Na placa em questão, foi utilizado o padrão para flavonoides Quercetina, o qual exibiu coloração amarelo-esverdeado, o extrato não apresentou bandas com fator de retenção (Fr) semelhante ao do padrão utilizado, todavia a análise evidencia possível presença de flavonoides de coloração azul em $Fr=0,35$ e $Fr=0,7$ e flavonoides de coloração amarelo-esverdeado em $Fr=0,5$, exceto para o extrato 3T2P1. Por fim, nota-se que o extrato etanoico 3T1P1 (condições 40°C e 250 bar) exibiu melhor perfil químico comparado aos demais extratos avaliados.

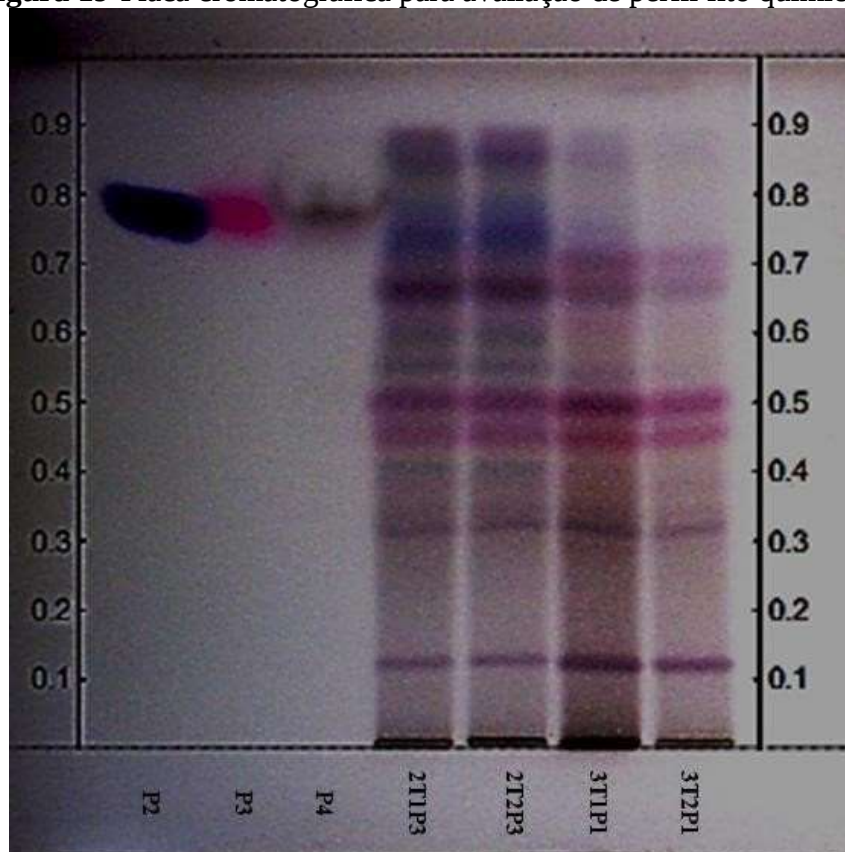
Este perfil fito químico em relação a flavonoides, para esta espécie é um assunto já bastante consolidado (TORRES et al., 1997; TORRES et al., 2000; TAKASHIMA, OHSAKI, 2001; TAKASHIMA, OHSAKI, 2002). A árvore exibe uma composição rica em flavonoides, o que se confirma pelas diversas pesquisas que atribuem a espécie um caráter anti-inflamatório, anticancerígeno, antissifilítico e entre outros (MAUÉS, 2013; FONSECA, 2014).

11.2 COMPOSTOS FENÓLICOS, CUMARINAS E ÁCIDOS GRAXOS

Na placa cromatográfica da figura 19, pode-se avaliar o perfil fito químico em relação a presença de Compostos fenólicos, Cumarinas e Ácido graxo, para tanto fez-se o uso do revelador VAS para derivatizar a placa. Observa-se que os extratos 2T1P3 e 2T2P3 exibem $Fr=0,8$ semelhante ao padrão utilizado (β -Amirina) e indicam a possível presença de cumarinas

(coloração azul escuro), o padrão Timol exhibe coloração roxo/lilás ou rosa, indica a presença de compostos fenólicos (JORK et al., 1990; WAGNER e BLADT, 2001), fato que pode ser constatado em todos os extratos (Observar o Fr=0,5; Fr=0,7), em especial no extrato 3T1P1. O padrão Metil Oleato indica a presença de ácidos graxos, com coloração marrom ou marrom-acinzentado (JORK et al., 1990; WAGNER e BLADT, 2001), o extrato 3T1P1 evidencia um melhor perfil (Fr=0,4) para estas substâncias, nos demais extratos observa-se a presença discreta destes ácidos.

Figura 19-Placa cromatográfica para avaliação de perfil fito químico



Legenda: P2: β -Amirina; P3: Timol; P4: Metil Oleato.

Fonte: A autora (2022)

O extrato 3T1P1 para todas as avaliações qualitativas via HPTLC, foi o que manifestou melhor perfil químico em relação aos extratos de maiores rendimentos analisados. Com perfil de compostos fenólicos, flavonoides e ácidos graxos bem definidos.

11.3 Atividade antioxidante

Substâncias com capacidade de inibir ou retardar a oxidação são chamados de antioxidantes. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos age no sentido de neutralizar os radicais livres, tornando-os estáveis. Os valores conforme observado (tabela

9) exibe maior atividade antioxidante para o extrato 2T2P3 ($75,67 \pm 1,22$) seguido do extrato 3T1P1 ($59,35 \pm 2,93$).

Tabela 9-Atividade antioxidante

Amostra	Médio ($\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$)
2T1P3	$34,57 \pm 0,59^*$
2T2P3	$75,67 \pm 1,22^*$
3T2P1	$34,57 \pm 2,35^*$
3T1P1	$59,35 \pm 2,93^*$
Desvio Padrão*	

Segundo Land et al (2017), a atividade antioxidante da espécie *Brosimum gaudichae* foi em média $28,85 \pm 2,66$, Dulcimar et al., 2008, ao avaliar a atividade antioxidante (DPPH) dos extratos de *Brosimum parinarioides* Ducke encontrou valores de $21,5 \mu\text{g/ml}$ no extrato metanolico, de $19,2 \mu\text{g/ml}$ no extrato de acetato de etila. Os resultados encontrados possivelmente estão relacionados ao teor de compostos fenólicos ou alguma substancias diferente destes.

12 CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados da caracterização centesimal da matriz apresentam-se em concordância aos dados disponíveis das espécies pertencentes ao mesmo gênero, quanto a teor lipídico, cinzas e valor proteico, haja vista que informações específicas a respeito da composição centesimal da espécie *Brosimum acutifolium* não foram reportadas na literatura pesquisada. Os valores de umidade encontram-se dentro da faixa adequada para matrizes vegetais e para extração com fluido supercrítico. A avaliação granulométrica teve como resultado um diâmetro médio das partículas consoante com a literatura.

Quanto as isotermas de rendimento global para extração sequenciada em leito fixo, não foi possível se obter uma isoterma da extração somente com CO_2 , pois conforme a análise centesimal, a matriz não apresenta valores significativos de lipídios, portanto não houve coletas de extrato de substâncias lipídicas, nesta etapa. Para a extração com $\text{CO}_2 + \text{EtOAc}$, o maior ($0,7799\%$) e menor rendimento ($0,3288\%$) foi obtido em $333,15 \text{ K}$ a 350 bar ($\rho = 912,866 \text{ kg/m}^3$) e $313,15 \text{ K}$ a 250 bar ($\rho = 927,279 \text{ kg/m}^3$), respectivamente.

Quanto a extração com $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$, obteve-se maior ($0,3126\%$) em $313,15 \text{ K}$ a 250 bar ($\rho = 946,716 \text{ kg/m}^3$) e menor rendimento ($0,1714\%$) em $313,15 \text{ K}$ a 350 bar ($\rho = 975,609 \text{ kg/m}^3$). Observou-se ainda neste sistema, a inversão das isotermas (faixa de 300 bar), fazendo com que acima desta faixa de pressão, a isoterma de $333,15 \text{ K}$ apresenta se maior rendimento.

Os extratos obtidos via extração supercrítica foram avaliados qualitativamente por CCDAE para analisar sua composição química, os resultados da cromatografia revelaram um perfil químico diferente nos extratos 2T1P3 e 2T2P3 em relação a presença de cumarinas, ao passo que o extrato 3T1P1 foi o que apresentou melhor perfil químico com relação aos compostos fenólicos, flavonoides, ácidos graxos e os extratos 2T2P3 e 3T1P1 exibiram melhor atividade antioxidante.

13 CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

As atividades foram desenvolvidas de maneira remota e presenciais quando devidamente autorizadas no período pandêmico (Portaria CAPES Nº. 55 (29/04/2020); a Portaria MEC Nº. 544 (16/06/2020) que revogou a Portaria MEC Nº. 343 (17/03/2020); a Medida Provisória Nº. 934 (01/04/2020); a Portaria MEC Nº. 617 (03/08/2020); o Parecer CNE/CP Nº. 05/2020) e Grupo de trabalho da UFPA sobre o novo coronavírus Boletim – 06/04/2020:

Atividades	2º/2019	2º/2020	1º/2021	1º/2022
Revisão da literatura	x			
Recebimento da matéria prima			x	
Preparo da matéria prima			x	
Elaboração da dissertação	x	x	x	
Extração			x	
Análise dos dados obtidos		x	x	
Elaboração do artigo	x	x	x	x
Elaboração da dissertação	x	x	x	x
Publicação do artigo		x	x	
Exame de qualificação				x
Realização das análises		x	x	x
Análise dos resultados		x	x	x
Elaboração da dissertação	x	x	x	x
Defesa				x

14 REFERÊNCIAS

- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition**. New York, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition**. New York, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- Applied Separations. **Operations manual**, 2004.
- ATKINS, P. A.; de PAULA, J.; **Físico-Química**, 8ª ed., v. 1, LTC: Rio de Janeiro, 2008.
- BALL, D. W.; **Físico-Química**, 1ª ed., v. 1, Thomson Learning: São Paulo, 2005.
- BATISTA, Camila de Cassia Rodrigues. **Obtenção de extratos da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) por extração supercrítica: Isotermas de Rendimento Global, Atividade Alelopática dos Extratos, Enriquecimento de Antocianinas e Compostos Fenólico**. Tese (Doutorado em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia), Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Belém, p. 117, 2016.
- BEZERRA, Fernanda Wariss Figueiredo. **Transesterificação do óleo residual das fibras prensadas de palma (*Elaeis guineenses* Jacq) via etanol supercrítico e cossolvente**. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos), Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Belém, p. 124, 2017.
- BOTELHO, José Rafael Santos. **Extratos de semente de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) obtidos via CO₂ supercrítico: Isotermas de rendimento Global, Dados cinéticos, e ajustes, ácidos graxos totais, fitosteróis e efeitos neuroprotetores**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Pará, 2013
- BRAGA, M. E. M.; DIAS, A. M. A.; SOUSA, Hermínio C. de. Extração de fitoquímicos com fluidos pressurizados/supercríticos e impregnação destes em biomateriais. **In**: BRAGA, M. E. M.; DIAS, A. M. A.; SOSNIK, A. Biomateriais aplicados ao sistema terapêutico avançado. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, p. 556-597, 2015.
- BRUNNER, G. **Gas extraction: A introduction to fundamental of supercritical fluids and the application to separation processes**. Darmstadt; New York: 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.
- CAMEL, V. "Supercritical Fluid Extraction as a Useful Method for Pesticides Determination". **Analisis Magazine**, v. 6, 1998
- CARELLE, J.S.; da SILVA, G.E.; RIBEIRO, R.V.; VICENTE NETO, J.; dos SANTOS, E.L. Composição nutricional de frutos do Cerrado mato grossense: cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile* A.St.-Hil.), curriola (*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.) e inharé (*Brosimum gaudichaudii* Trécul). **Rev Inst Adolfo Lutz**. 2021; 80:1-8, e37247. Doi: <https://doi.org/10.53393/rial.2021.v.80.37247>
- CARVALHO JR, R.N.; MOURA, L.S.; ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, vol.35, p. 197-204, 2005.
- CARVALHO JR., R. N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de**

equilíbrio e outras variáveis do processo. 2004. 166 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p. 166, 2004.

CASTELLAN, G. **Fundamentos de Físico-Química**, 1ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 1999.

CENGEL, Y.A.; BOLES, M.A. **Thermodynamics: An Engineering Approach.**, 5ª ed McGraw Hill, New York.

CIEŚLA, Ł.; KRYSZEŃ, J.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 126–135, 2012.

CORRÊA, Rafael de Oliveira. **Avaliação in vitro da atividade antifúngica dos extratos vegetais frente aos principais microrganismos causadores da candidíase.** 100 f. Dissertação (Mestrado em Saúde), Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina, Juiz de Fora, Minas Gerais, p. 100, 2017.

CORREIA, A.F.; SEGOVIA, J.F.O.; GONÇALVES, M.C.A.; DE OLIVEIRA, V.L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI, L.I.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 6, p. 369-380, 2008.

COSTA, João Fernando Alves. **Avaliação da influência da natureza da matriz sólida sobre a extração supercrítica de óleos vegetais.** 2013. 119 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, p.119, 2013.

COUTO, Nádia Miléo Garcês de. **Avaliação cromatográfica e da atividade antioxidante de extratos e flavanas da espécie *Brosimum acutifolium* subs. *acutifolium* (Moraceae).** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Pará, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Belém, 2013.

DA COSTA, Fabiola Medeiros. **Extração de compostos bioativos de folhas *Vernonia amygdalina* Delile utilizando dióxido de carbono em condições supercríticas.** Dissertação (Mestrado em engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, p. 93, 2016.

DA FONSECA, Susanne Suely Santos. **Efeito protetor da flavana extraída da espécie *Brosimum acutifolium* contra danos causados por hipóxia em células retinianas: Um estudo in vitro.** Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia celular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará, p. 66, 2014.

DA SILVA, R.P.F.F.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; DUARTE, A.C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40-51, 2016.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>.

DA SILVA, R.P.F.F.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; DUARTE, A.C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40-51, 2016.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>.

DAVID, E.S.; RABELO, E.M.; MARTINS, R.L.; de ALMEIDA, S.S.M.S. Estudo fitoquímico, microbiológico, citotoxicidade e antioxidante do látex *Brosimum parinarioides* spp. *parinarioides* Ducke (Moraceae) com o *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocinaceae).

Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), v. 9, n. 2, p. 16-20, 2019. Doi:<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v9n2p16-20>.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology-a review. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115-176, 2014.

DE SOUZA, Pedro Paulo. **Moraceae gaudich. de Viçosa, Minas gerais, Brasil: Florística e Anatomia foliar de *Ficus mexiae* Standl.** 157 f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, p. 157, 2009.

DOS SANTOS MACHADO, P.F.; SIEGLOCH, A.M.; BALDIN, T.; COLDEBELLA, R.; PEDRAZZI, C.; MARCHIORI, J.N.C. Anatomia do lenho de *Maclura tinctoria* d. Don ex Steud. **Balduinia**, n. 49, p. 29-33, 30-VIII-2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.5902/2358198019218>.

FERREIRA, Sandra Regina Salvador. **Cinética de transferência de massa na extração supercrítica de óleo essencial de pimenta do reino.** 1996. 218f. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, p. 218, 1996.

GARDNER, E.M.; AUDI, L.; ZHANG, Q.; SAUQUET, H.; MONRO, A. K.; ZEREGA, N.J.C. Phylogenomics of *Brosimum* Sw. (*Moraceae*) and allied genera, including a revised subgeneric system. **Plant Biology**, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.15.098566>.

GOODSHIP, V.; OGUR, E. O. Polymer processing with supercritical fluids. **Rapra review reports**, v.15, n.8. Shawbury, UK: Rapra Technology Ltd, 2004.

GRANDTNER, M. M.; CHEVRETTE, J. **Dictionary of trees: South America, Nomenclature, Taxonomy and Ecology**, 1nd ed.; Elsevier: Quebec, Canadá, 2013, p.1172.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBANEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 67-83, 2013.

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4 ed. São Paulo: IAL, 2008. 1018p.

JORDAN, R.A.; BALDASSIN JUNIOR, R.; CORTEZ, L.A.B.; A.V.A, MOTOMIYA. Caracterização granulométrica de biomassa polidispersa pelo método de peneiramento mecânico. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering.**, n. 36, v.1, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v36n1p102-113/2016> JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. Thin-layer chromatography, New York: VCH, 1990.

KING, M.B.; BOTT, T.R. Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents. **Blackie Academic**, 1993.

KUNII, D.; LEVENSPIEL, O. **Fluidization engineering**, 2nd ed. Boston: Butterworth, 1991.

LAND, L. R. B.; BORGES, F. M.; BORGES, D. O.; PASCOAL, G. B. **Composição centesimal, compostos bioativos e parâmetros físico-químicos da mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Tréc) proveniente do Cerrado Mineiro.** Demetre: alimentação, nutrição & saúde, v. 12, n. 2, p. 509-518, 2017.

- LEVINE, I. N.; **Physical Chemistry**, 6^a ed., Me Graw Hill: New York, 2009.
- LUZ, R. F.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; MOREIRA, V.F. **¹³C-NMR Data from Coumarins from Moraceae Family**. American Journal of Analytical Chemistry, v. 6, n.11, p. 851-866, 2015. Doi: 10.4236/ajac.2015.611081.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008
- MAIA, J.D.; ALICIEO, T.V.R. Extração supercrítica aplicada a frutas: Revisão. **Revista Inova Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 36-48, 2017.
- MARINHO, Carolina Messias. **Extração de óleo de gérmen de milho com o uso de CO2 em condições supercríticas e cossolventes**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p.58, 2017.
- MAUÉS, L.A.L. **Atividade antiproliferativa e antineoplásica de flavonoides da espécie *Brosimum acutifolium* em modelo de glioblastoma *in vitro***. 2013.p.52. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia celular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará, p. 85, 2013.
- MAUÉS, L.A.L.; ALVESA, G.M.; COUTO, N.M.G.; SILVA, M.S.P.; ARRUDA, M.S.P.; MACCHIA, C.B.C.; SENAC, A.F.; PRADOC, M.E.; CRESPO-LOPEZ, E.O.; SILVA, J.L.M.; NASCIMENTO, F. Flavonoids from the Amazon plant *Brosimum acutifolium* induce C6 glioma cell line apoptosis by disrupting mitochondrial membrane potential and reducing AKT phosphorylation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 113, p. 108728, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108728>.
- MAUL, A.; WASICKY, R. e BACCHI, E. Extração por fluido supercrítico, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2000
- MAZZUTTI, S. et al. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 70, p. 48–56, 2012.
- McHUGH, M.A. and KRUKONIS, V.J. **Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice**. Butterworth Publishers, Stoneham, 1986.
- McHUGH, M.A.; KRUKONIS, V.J. **Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice**, 2^a ed, Butterworth-Heinemann: Stoneham, 1994.
- MENDIOLA, J.A.; HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; IBÁÑEZ. Supercritical fluid extraction. In: ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J.M. **Natural Product Extraction Principles and Application**. RSC Green Chemistry, 2013, p. 169-230. Doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.10753-X.
- MENDIOLA, J.A.; HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; IBÁÑEZ. Supercritical fluid extraction. In: ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J.M. **Natural Product Extraction Principles and Application**. RSC Green Chemistry, 2013, p. 169-230. Doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.10753-X.
- MOLVIEW. Disponível em: <https://molview.org/>

MORETTI, C.; GAILLARD, Y.; GRENAND, P.; BÉVALOT, F.; PRÉVOSTO, J.M. Identification of 5-hydroxy-tryptamine (bufotenine) in takini (*Brosimum acutifolium* Huber subsp. *acutifolium* C.C. Berg, Moraceae), a shamanic potion used in the Guiana Plateau. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 106, 198-202, doi: 10.1016/j.jep.2005.12.022.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide**. CRC Press, Boca Raton, p.339, 2000. Doi: [http:// dx.doi.org/10.1201/9781420041699](http://dx.doi.org/10.1201/9781420041699)

NASCIMENTO, Fábio Pedro do. **Desenvolvimento da equação de estado Polar SAFTVR Mie: Medida experimental do equilíbrio de fases e da velocidade do som de sistemas contendo CO₂ e hidrocarbonetos típicos das faixas da nafta ao diesel**. 2016. 321 f. Tese (Doutorado em Processos Químicos e Meio Ambiente), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.bdttd.uerj.br/handle/1/11890>

PAULETTO, G.; KLAROSK, R.P.; MACHADO, F.Z.; BELLO, M.C.; MACEDO, C.L.R.; DOS SANTOS, R.B. **Novas alternativas terapêuticas para prevenção do câncer labial com produtos à base de extratos naturais com potencial fotoprotetor: Uma revisão de literatura**. Revista Da Faculdade de Odontologia, v. 22, n.3, p. 378384, 2017. Doi: <https://doi.org/10.5335/rfo.v22i3.7688>.

PE 2000 (Phase Equilibrium 2000) (software), A Powerful Tool to Correlate Phase Equilibria by PFOHL, O.; STANIMIR P.; BRUNNER, G. Download: <https://www.tuhh.de/v8/links/pe-2000.html>

PEREIRA, C. G; PRADO, J. M.; MEIRELES, A. J. A.; MEIRELES, M. A. A. Extração sólido-líquido. In: TADINI, C. C.; TELIS, V. R. N.; MEIRELES, A. J. A.; PESSOA FILHO, P. A. Operações unitárias na indústria de alimentos. Livros técnicos e científicos (LTC), Rio de Janeiro, 2016. v. 1, cap.18, p. 168-208

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

PIES, Gustavo. **Tecnologia supercrítica aplicada à obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos a partir de casca de jabuticaba *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, p. 75, 2017.

PINTO, G.M.F.; F. PINTO, J.; JARDIM, I.C.S.F. Extração com fluido supercrítico. **Rev. Chemkeys**, n.4, p.1-13, 2006.

PINTO, Rafael Henrique Holanda. **Extração do óleo de Bacaba (*Oenocarpus bacaba*) com CO₂ supercrítico: parâmetros de processo, perfil de ácidos graxos e aplicação na síntese de nanopartículas de Fe₃O₄**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos), Universidade federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Belém, p. 66, 2016.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of chromatography A**, v.1163, p.2-24, 2007.

QUEVEDO, Adriana Elias Pires. **Atividades melanogênica, genotóxica e antiproliferativa de extratos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam induzidas por radiação UVA**. 2011. p. 105. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

QUISPE-CONDORI, S. **Determinação de Parâmetros de Processo nas Diferentes Etapas da Extração Supercrítica de Produtos Naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenaceae*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare***. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

REIS, D.V.C.; COUTO, N.M.G.; BRUST, F.R.; TRENTIN, D.S.; SILVA, J.K.R.D.; ARRUDA, M.S.P.; GNOATT, S.C.B.; MACEDO, A.J. Remarkable capacity of brosimine b to disrupt methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) preformed biofilms. **Microb Pathog.**, v,140, p.103967, 2020. doi: 10.1016/j.micpath.2020.103967.

REIS, S.V.D.; COUTO, N.M.G.; BRUST, F.R.; TRENTIN, D.S.; SILVA, J.K.R.D.; ARRUDA, M.S.P.; GNOATTO, S.C.B.; MACEDO, A.J. Remarkable capacity of brosimine b to disrupt methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) preformed biofilms. **Microb Pathogenesis**, v.140, p.103967. Doi: 10.1016/j.micpath.2020.103967.

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

RIOS, Mary Naves da Silva; PASTORE JÚNIOR, Floriano. **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. Brasília: Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011. 3378 p., il.

RODRIGUES, Cintya Cordovil. **Estudo de métodos de extração, quantificação dos polifenóis totais, avaliação das atividades antioxidantes e antimicrobianas da casca do caule de *Cróton palanostigma***, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Belém p. 103, 2017.

ROMANIUC-NETO, S.; PEDERNEIRAS, L.C.; GAGLIOTI, A.L. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Moraceae. **Rodriguésia**, n.69, v.3, p. 1255-1257, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869326>

S. GEORGÉ, P. BRAT, P. ALTER, M.J. AMIOT, RAPID. Determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 1370–1373. <https://doi.org/10.1021/jf048396b>.

SALAZAR, Marielba de los Angeles Rodriguez. **Avaliação da composição química, efeito neuroprotetor e anti-inflamatório de extratos de cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) obtidos via extração supercrítica**. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos), Universidade federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Belém, p. 89, 2017.

SANTOS, Débora Nascimento. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 99 p. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, p. 99, 2012.

SANTOS, Valderi Pacheco. Equilíbrio de Fases: Influência das Forças Intermoleculares nos Diagramas de Fases. **Rev. Virtual Quim.**, v. 12, n. 6, 2020, p. 1541-1558. Doi: 10.21577/1984-6835.20200117.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais. **Arte e Livros**, p. 135, 2000.

SMITH, J.M.; VAN NESS, H.C.; ABBOTT, M.M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2007

- SOVOVÁ, H., Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *J. Supercr. Fluids*, v.33, p.35-52, 2005.
- Spencer Lima, L. Propriedades coligativas. *Revista de Ciência Elementar*, v. 2, n.1, p.52, 2014.
- TAKASHIMA J, OHSAKI A. Brosimacutins A-I, nine new flavonoids from *Brosimum acutifolium*. *Jornal of Natural Products*, v. 65, n. 12, p. 1843-1847, 2002. Doi: 10.1021/np020241f.
- TAKASHIMA, J.; ASANO, S.; OHSAKI, A. Mururins A-C, three new lignoids from *Brosimum acutifolium* and their protein Kinase inhibitory activity. *Planta medica*, v. 68, n. 7, p. 621-625, 2002. Doi: 10.1055/s-2002-32906.
- TAKASHIMA, J.; KOMIYAMA, K.; ISHIYAMA, H.; KOBAYASHI, J. OHSAKI, A. Brosimacutins J-M, Four New Flavonoids from *Brosimum acutifolium* and their cytotoxy activity. *Planta medica*, v. 71, n. 7, p. 654-658, 2005. Doi: 10.1055/s-2005-871272.
- TAKASHIMA, J.; OHSAKI, A. Acutifolins A-F, a New Flavan-Derived Constituent and Five New Flavans from *Brosimum acutifolium*. *Jornal of Natural Products*, v. 64, n. 12, p. 1493-1496, 2001. Doi: 10.1021/np010389j.
- TAYLOR, L. T., **Supercritical Fluid Extraction**. Wiley-Interscience publication, p. 181, 1996.
- TEIXEIRA, A.F.; ALCÂNTARA, A.F.C.; PILÓ-VELOSO, D. Structure determination by ¹H and ¹³C NMR of a new flavan isolated from *Brosimum acutifolium*: 40,7dihydroxy8-prenylflavan. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 38, n. 4, p. 301-304, 2000. Doi: 10.1002/(SICI)1097-458X(200004)38:4<301::AID-MRC632>3.0.CO;2-T.
- TORRES, S.L.; ARRUDA, M.S.P.; ARRUDA, A. C.; MULLER, A.H.; SILVA, S.C. Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. *Phytochemistry* V. 53, p. 1047-1050, 2000.
- TORRES, S.L.; MONTEIRO, J.C.M.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, C. A. Two flavans from *Brosimum acutifolium*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 2, p. 347-349, 1997. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00447-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00447-5).
- TURNER, C.; KING, J. W.; MATHIASSEN, L. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *Journal of Chromatography*, v. 936, p. 215237, 2001.
- URBINA, Glides Rafael Olivo. **Avaliação da composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo de cipó-de-alho (*Mansoa standleyi*) (Steud.) a. h. gentry (Bignoniaceae) obtido via extração supercrítica**. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos), Universidade federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Belém, p. 66, 2019.
- VIEIRA, E.F.M.; LUCAS, F.C.A.; CAMPOS, M.G.R.; GERMANO, C.M. Mururé (*Brosimum acutifolium* Huber) in the treatment of syphilis in colonial Amazonia: historical data to the actual contribution to treatment. *Acta Botanica Brasilica*, v. 33, n. 2, p. 183-190, 2019. Doi: 10.1590/0102-33062019abb0030.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drugs analysis: thin-layer chromatography atlas**, 2. ed., Munchen: Springer, 2001

V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, **Methods Enzymol.** 299 (1998) 152–178.

W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, **LWT - Food Sci. Technol.** 28 (1995) 25–30.