

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Extração de Compostos Bioativos da Semente de Cumaru (*Dipteryx odorata*)
Utilizando Fluidos Pressurizados**

Jéssica de Carvalho Lima
Engenharia Química
Orientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho
Coorientadora: Profa. Dra. Lisiane dos Santos Freitas

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, área de Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil

Julho de 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

L732e Lima , Jéssica de Carvalho
Extração de compostos bioativos da semente de
Cumaru (*Dipteryx odorata*) utilizando fluidos
pressurizados / Jéssica de Carvalho Lima. --
Maringá, 2014.
xi, 65 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lisiane dos Santos
Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, 2014.

1. Cumarina. 2. Semente de cumaru. 3. Extração
supercrítica. 4. Comportamento de fases. 5. Método
sintético visual. I. Cardozo-Filho, Lúcio, orient.
II. Freitas, Lisiane dos Santos, coorient. III.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de
Tecnologia. Departamento de Engenharia Química.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV.
Título.

CDD 21.ed. 660.284248

GVS-002645

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho
Orientador/Presidente

Profª Drª Lisiane dos Santos Freitas
Coorientadora

Profª Drª. Andresa Carla Feirhmann
Membro

Profª Drª. Lisandra Ferreira de Lima
Membro

*“É graça divina começar bem.
Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas graça das graças é não desistir nunca”*

Dom Hélder Câmara

*A Deus;
À minha mãe Regina e à minha vó Creusa;
À minha irmã Milena;*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre se faz presente por meio das coisas mais simples, dos anjos que me manda no dia a dia, que me faz enxergar a beleza da vida e a quem devo tudo que sou;

Ao professor Lucio pela confiança colocada no meu trabalho, mesmo com as dificuldades que encontrei ao percorrer este caminho. As broncas sempre estarão em minha memória, mas os conselhos e orientações foram mais importantes;

Aos professores Lisiane dos Santos, Vladimir Cabral, Edson da Silva, Celso Nakamura, Carla Rossi, Nathielle Miranda, Juciara Nascimento, aos membros da comissão julgadora e a todos que estiveram relacionados com o desenvolvimento deste trabalho;

Ao amigo Leandro Pinto que teve papel fundamental no desenvolvimento deste material, me dando suporte, dedicando tempo e paciência sem nunca reclamar, do início ao fim do meu mestrado. Sem seu apoio poderia até ser possível, mas seria muito mais difícil e menos agradável;

Aos amigos Willyan Giufrida e Andreia Zanette, que compartilharam conhecimentos e momentos felizes e simples, os quais não esquecerei. Toda minha admiração a vocês, profissional e pessoalmente;

Aos amigos Ana Paula Sone, Janayna Presa, Carlos Eduardo, Fernando Alves e a todos os colegas que compartilharam momentos difíceis e alegres durante as disciplinas;

À minha mãe Regina, irmã Milena, vó Creusa, pai Ailton e a toda minha família que sempre acreditou, confiou e me motivou a buscar o conhecimento, me ensinando desde pequena que o estudo era o melhor caminho. Nunca esquecerei nenhum dos sábios conselhos que me deram;

À Ana Cristina Barros, Telma Barros, Nancy Costa, por todo o apoio e acolhida, mesmo nas horas de aperto. Ao Leandro Barros, por todo companheirismo, apoio, cuidado, atenção dedicadas a mim em muitas fases importantes da minha vida, em todos estes anos de convívio.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química/UEM e a toda a Universidade Estadual de Maringá;

À CAPES pela concessão da bolsa e todo o apoio financeiro.

LIMA, Jéssica de Carvalho. **Extração De Compostos Bioativos da Semente de Cumaru (*Dipteryx odorata*) Utilizando Fluidos Pressurizados**. Orientador: Lúcio Cardozo Filho. Maringá: UEM / Pós-graduação em Engenharia Química, 2014. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos).

RESUMO

A cumarina (benzopirona) é um princípio ativo com aroma característico, similar à baunilha. Possui efeito broncodilatador, anti-inflamatório e analgésico, além de ser utilizado em cosméticos e como aromatizante. É amplamente distribuída em frutas como o morango, a cereja, o damasco e em vegetais, como o guaco, a castanha da Índia, a emburana, o agrião, a canela e o cumaru. A semente de cumaru (*Dipteryx odorata*), por sua vez, é encontrada na região norte do Brasil, utilizada na naturopatia e na culinária e seu potencial farmacêutico ainda não foi devidamente explorado. A aplicação de princípios ativos na indústria farmacêutica exige que o composto extraído apresente-se livre de resíduos de solventes e possua alto grau de pureza. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo a obtenção de cumarina de forma seletiva a partir da semente de cumaru. Para isto, foi realizado o estudo de equilíbrio de fases a altas pressões, a fim de determinar o comportamento do sistema {CO₂ + cumarina} e determinar as condições favoráveis para a manipulação deste composto ao utilizar dióxido de carbono. Na condução do estudo de equilíbrio de fases foi utilizado o método sintético visual, nas faixas de temperatura e fração molar de 25°C a 65°C e 2x10⁻³ a 6x10⁻³, respectivamente. As pressões de transição de fases obtidas variaram de 58,45 bar a 198,66 bar. Foi utilizada a técnica de extração com fluidos pressurizados para obtenção da cumarina a partir da semente de cumaru, visto que apresenta a possibilidade de substituição de solventes orgânicos por gases não tóxicos, como o dióxido de carbono, o qual resulta em uma extração com menor impacto ambiental, com obtenção de um produto livre de solventes residuais. Com isso, garante-se a segurança do consumidor e evita-se gastos adicionais com a separação do produto e do solvente. A temperatura escolhida para a extração variou entre 60°C e 80°C, e pressões entre 180 bar e 220 bar. Foram utilizados os co-solventes etanol, acetato de etila e diclorometano nas porcentagens 1%, 3% e 5%, respectivamente, a fim de aumentar o poder de dissolução do fluido na matriz vegetal. As cinéticas de extração foram satisfatoriamente representadas pelo modelo matemático de Sovová e pela comparação dos dados calculados e experimentais. Além disso, foram realizadas extrações com os solventes orgânicos etanol e hexano por meio do aparelho Soxhlet, a fim de avaliar a eficiência da técnica com altas pressões. Todos os extratos obtidos a partir da semente de cumaru foram analisados qualitativamente e quantitativamente, por meio de cromatografia líquida e cromatografia gasosa. Por fim, a extração a partir de dióxido de carbono supercrítico utilizando co-solventes foi mais seletiva que a extração clássica, por ser mostrar ser um método promissor para a obtenção de cumarina a partir da semente de cumaru.

Palavras-chave: cumarina, semente de cumaru, extração supercrítica, comportamento de fases, método sintético visual.

ABSTRACT

The coumarin (benzopyrone), is an active principle with characteristic aroma, similar to vanilla. It has bronchodilator, anti-inflammatory and analgesic effect, besides being used in cosmetics and as a flavoring. It is widely distributed in fruits like strawberry, cherry, apricot and vegetables, as guaco chestnut India, emburana, watercress, cinnamon and tonka bean. The seed cumaru (*Dipteryx odorata*), in turn, is found in the northern region of Brazil, used in naturopathy and cuisine and its pharmaceutical potential has not yet been adequately explored. The application of active ingredients in the pharmaceutical industry requires that the present compound extracted is free of solvent residues and has high purity. In this sense this paper aims to obtain selectively coumarin from tonka bean seed. For this, the study of equilibrium phase at high pressures in order to determine the behavior of {CO₂ + coumarin} system and determine the conditions favorable for the handling of this compound using carbon dioxide was performed. In conducting the study phase equilibria visual synthetic method was used, the temperature and mole fraction ranges from 25°C to 65°C and 2×10^{-3} to 6×10^{-3} , respectively. The phase transition pressure values ranged from 58.45 bar to 198.66 bar. The extraction technique with pressurized fluids to obtain the coumarin from cumaru seed seen that presents the possibility for the substitution of organic non-toxic gases such as carbon dioxide solvent was used, resulting in a reduced environmental impact extraction, to obtain a product free of residual solvents, ensuring consumer safety and avoiding additional spending on product separation and solvent. The temperature chosen for extraction ranged between 60°C e 80 ° C and pressures between 180 bar e 220 bar. The co-solvents dichloromethane, ethyl acetate and ethanol was used in percentages 1%, 3% and 5%, in order to increase the dissolving power of the fluid in the vegetable matrix. The kinetics of extraction were satisfactorily represented by the mathematical model Sovová by comparing the calculated and experimental data. Further extractions with organic solvents ethanol and hexane Soxhlet through in order to evaluate the efficiency of the appliance with high pressure were performed. All extracts obtained from the cumaru seed were analyzed qualitatively and quantitatively by means of liquid chromatography and gas chromatography. Finally, the extract from the supercritical carbon dioxide using co-solvents was more selective than the classical extraction, proved to be a promising method for obtaining coumarin from *Dipteryx odorata* seed.

Keywords: coumarin, cumaru seed, supercritical extraction, phase behavior, visual synthetic method

LISTA DE SÍMBOLOS

$\hat{\phi}_i^\alpha$: coeficiente de fugacidade;

k_f : coeficiente de transferência de massa no meio externo (min^{-1});

k_s : coeficiente de transferência de massa no sólido (min^{-1});

q_0 : concentração inicial do óleo na matriz sólida (g óleo/g sólido);

R : constante universal dos gases ideais ($\text{cm}^3 \cdot \text{bar} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$);

h : coordenada axial (m);

ρ_s : densidade da fase sólida ($\text{Kg sólido}/\text{m}^3$);

ρ_f : densidade da fase fluida ($\text{Kg solvente}/\text{m}^3$);

ρ_F : densidade do solvente (g/L);

ρ_{leito} : densidade do leito (g sólido/L);

Δh : entalpia ($\text{J}/\text{mol} \cdot \text{K}$);

ADD: erro médio absoluto;

ESF: Equilíbrio sólido-fluido;

ESLV: Equilíbrio sólido-líquido-vapor;

ELV: Equilíbrio líquido-vapor;

EFF: Equilíbrio fluido-fluido; ω : fator acêntrico EFS – extração por fluido supercrítico;

f_i^α fugacidade do componente "i" na fase "α";

w_2 : fração molar na fase líquida (x) ou na fase vapor (y);

r : fração de óleo facilmente acessível;

r : fração de óleo de fácil acesso;

$m_{\text{óleo}}$: massa de óleo extraída (g);

m_s : massa de sólido isenta de óleo (g);

$m_{\text{óleo}}^{\text{MOD}}$: massa extraída calculada com o modelo;

$m_{\text{óleo}}^{\text{EXP}}$: massa extraída experimental;

R^2 : medida da proporção da variabilidade em uma variável que é explicada pela variabilidade da outra;

N : número de pontos sobre a curva cinética obtida a partir dos dados experimentais;

ne : número total de experimento de extração com CO_2 como solvente;

Z: parâmetro ajustável do modelo de Sovová referente à transferência de massa na fase fluida.

a_{ij} : parâmetro de atração entre as moléculas dos componentes “i” e “j”;

k_{ij} : parâmetro de interação binária;

l_{ij} : parâmetro de interação binária;

b_{ij} : parâmetro de repulsão entre as moléculas dos componentes “i” e “j”;

P_c : pressão crítica;

P : pressão absoluta (Mpa);

P^{sat} : pressão de saturação;

ε : porosidade do leito;

x : razão mássica de soluto (concentração) na fase sólida (g óleo/g sólido);

y : razão mássica de soluto (concentração) na fase fluida (g óleo/g solvente);

x_0 : razão mássica inicial de soluto na fase sólida (g/g).

S_b : solubilidade de óleo (g óleo/g solvente);

$J(x,y)$: taxa de transferência de massa interfacial (Kg/m³.s);

T : temperatura absoluta (K);

T_c : temperatura crítica;

T^{fus} : temperatura de fusão;

t : tempo (s);

t_{CER} : tempo em que ocorre a extração do óleo livre na entrada da coluna (min);

t_{FER} : tempo em que ocorre a extração do óleo livre na saída da coluna (min);

\dot{m}_F : vazão mássica do solvente (g/min);

U : velocidade superficial do solvente (m/s);

\underline{V} : volume molar (cm³/mol).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de interação binária kij, lij e propriedades dos componentes do sistema.....	19
Tabela 2: Planejamento experimental das extrações.....	22
Tabela 3: Eluição Gradiente da Fase Móvel	29
Tabela 4: Condições de Operação GC/q-MS.....	30
Tabela 5: Dados experimentais para medidas de transições de fases do tipo SF para o sistema CO ₂ (1) + Naftaleno(2) obtidos por Favareto (2010).	35
Tabela 6: Dados Experimentais de Transição de Fases para o do sistema {CO ₂ (1) + Cumarina(2)}.	37
Tabela 7: Rendimento em termos de massa de extrato total.	42
Tabela 8: Condições ótimas de extração em termos de extrato total.....	44
Tabela 9: Valores dos parâmetros calculados para o modelo Sovová.....	47
Tabela 10: Porcentagens de degradação da amostra na primeira e segunda zona de decaimento de massa obtidos por análise termogravimétrica (TG).	48
Tabela 11: Concentração de cumarina nas Extrações por fluido pressurizado e Soxhlet.	51
Tabela 12: Normalização dos ácidos graxos livres.	52
Tabela 13: Padrões utilizados na quantificação de ésteres metílicos via GC-FID.....	54
Tabela 14: Normalização de Ácidos Graxos Totais.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sementes de Cumaru	4
Figura 2: Rota Biosintética da cumarina	6
Figura 3: Métodos para estudo de comportamento de fases.	8
Figura 4: Aparato Experimental Equilíbrio de Fases Método Sintético Visual.	15
Figura 5: Aparato experimental utilizado para a extração com CO ₂ supercrítico.	21
Figura 6: Diagrama pressão x composição para o sistema {CO ₂ (1) + Naftaleno(2)} sob condições de equilíbrio sólido-vapor a 328 K	36
Figura 7: Diagrama de fases P-x para o sistema {CO ₂ (1) + Cumarina(2)}	39
Figura 8: Célula de Equilíbrio em diversas etapas do experimento.....	40
Figura 9: Diagrama P-x do sistema {CO ₂ (1) + Cumarina (2)} de medidas de transição do tipo SF.	41
Figura 10: Extratos a partir da semente de Cumaru.....	42
Figura 11: Condições ótimas de extração em termos de massa de extrato.	44
Figura 12: Gráfico que representa os modelos matemáticos - acetato de etila como co-solvente	45
Figura 13: Gráfico o qual representa os modelos matemáticos - diclorometano como co-solvente.....	45
Figura 14: Gráfico o qual demonstra os modelos matemáticos - etanol como co- solvente.....	46
Figura 15: Análise Termogravimétrica Cumarina Padrão, Óleo de Soja e Amostras E312 e S_Etanol.	49
Figura 16: Curva de calibração da Cumarina.....	50
Figura 17: Cromatograma expandido de ésteres metílicos.	54
Figura 18: Análise Termogravimétrica das amostras.	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Semente de Cumaru (<i>Dipteryx odorata</i>)	4
2.2 Cumarina	5
2.3 Equilíbrio de Fases a Alta Pressão	7
2.4 Métodos Aplicados na Extração a partir de Matrizes Vegetais.....	10
2.4.1 Extração Convencional	10
2.4.2 Extração com Fluido Supercrítico (EFS)	10
2.5 Planejamento Experimental	12
2.6 Modelagem Matemática do Processo de Extração	13
3. METODOLOGIA	15
3.1 Aparato e Procedimento de Equilíbrio de Fases do Sistema CO ₂ + Cumarina	15
3.2 Modelagem Termodinâmica do Equilíbrio de Fases	18
3.3 Extração a partir da Semente de Cumaru	20
3.3.1 Pré-tratamento da Matriz Vegetal.	20
3.3.2 Extração pelo Método Soxhlet.	20
3.3.3 Extração com Fluidos Pressurizados.....	20
3.4 Planejamento Experimental.	22
3.5 Modelagem Matemática de Extração com Fluidos Pressurizados	23
3.6 Análise das Amostras	27
3.6.1 Análise Termogravimétrica (TG).	28
3.6.2 Identificação e Quantificação de Cumarina Realizada em HPLC.	29
3.6.3 Análises de Ácidos Graxos Livres Realizadas em GC/q-MS.	29
3.6.4 Análises de Ácidos Graxos Totais por GC-FID.....	31
3.7 Análise de Citotoxicidade	32
3.8 Concentração Inibitória Mínima.....	32
3.8.1 Atividade Contra Fungos Leveduriformes.....	32
3.8.2 Atividade Antibacteriana	33
4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS	35
4.1. Validação do Aparato Instrumental Utilizado nos Experimentos de Comportamento de Fases.....	35

4.2 Dados de Equilíbrio de Fases do Sistema {CO ₂ (1) + Cumarina(2)}	36
4.3 Extrações por Soxhlet e Solventes Pressurizados	42
4.4 Modelagem Matemática do Processo de Extração Supercrítica	45
4.5 Análise Termogravimétrica (TG)	48
4.6 Teores de Cumarina Analisados por Meio de Cromatografia Líquida.....	50
4.7 Perfil de Ácidos Graxos Livres	52
4.8 Perfil de Ácidos Graxos Totais	53
4.9 Análise de Citotoxicidade e Concentração Inibitória Mínima (CIM)	56
CONCLUSÃO.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO I.....	67

1. INTRODUÇÃO

As principais fontes de princípios ativos na fabricação de medicamentos são as fontes naturais, mesmo com a possibilidade de desenvolvimento sintético de moléculas. O consumidor tem buscado cada vez mais fontes naturais no tratamento de doenças devido à conscientização da população a respeito dos benefícios oferecidos por diversas espécies nativas, de forma mais branda que muitos medicamentos industrializados.

No Brasil há vários produtos naturais ainda não explorados devidamente, como é o caso da semente de *Dipteryx odorata*, popularmente conhecida como cumaru. Esta semente é utilizada como aromatizante, em cosméticos, fumos, na medicina popular e possui odor similar à baunilha, devido à presença de cumarina. A cumarina tem efeitos antitussígeno, aplicações terapêuticas, antiasmáticas e como broncodilatador. Além disso, é usado externamente para o tratamento de dermatites e micoses (OLIVEIRA et al., 2013).

Atualmente existe uma série de estudos a respeito de técnicas para a obtenção de extratos de matrizes vegetais, os quais visam a otimização do produto final, que deve apresentar alta concentração de bioativos, elevada pureza, viabilidade econômica e ambiental. Técnicas tradicionais apresentam como inconveniente a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos, que muitas vezes não são removidos completamente mesmo com a aplicação de investimentos adicionais e resultam assim em extratos com pureza inferior, além da possível degradação térmica. A extração com fluido supercrítico apresenta a vantagem de manter ou exceder a atividade biológica dos extratos obtidos por técnicas convencionais, devido à especificidade destes processos. Com isso, gera-se extratos ricos em compostos desejáveis e livre de solventes (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Existem vários tipos de gases que vem sendo aplicados na extração supercrítica, como o propano, o butano, o etileno, entre outros, de acordo com o tipo de compostos que se deseja obter. Dentre eles, o dióxido de carbono é amplamente utilizado por apresentar características adequadas para este fim, além de não ser tóxico e inflamável (BOTT, 1993; MEIRELES, 2008).

Para utilização adequada de dióxido de carbono supercrítico na extração de cumarina se faz necessário ter conhecimento a respeito do comportamento de fases do sistema. Contudo, o equilíbrio de fases do CO₂ supercrítico + cumarina é pouco abordado na literatura.

O objetivo geral do presente trabalho é o estudo do comportamento de fases da cumarina em dióxido de carbono supercrítico e a extração de cumarina e compostos bioativos da semente de cumaru ao utilizar fluido pressurizado e solvente orgânico. Os objetivos específicos são:

- Obtenção de dados de comportamento de fases para o sistema dióxido de carbono + cumarina, por meio do método sintético visual;
- Determinação experimental do rendimento da extração a partir de sementes de cumaru com a utilização de solventes orgânicos (etanol e hexano) por meio do método Soxhlet e do uso de dióxido de carbono em condições supercríticas com adição de co-solventes (etanol, acetato de etila e diclorometano).
- Obtenção das cinéticas de extração a partir da semente de cumaru ao utilizar dióxido de carbono em meio supercrítico com adição de co-solventes para avaliação dos efeitos das variáveis de processo (temperatura, pressão e densidade) sobre o rendimento em extrato;
- Verificação de degradação do componente alvo por meio de análise termogravimétrica dos extratos obtidos a partir da semente de cumaru;
- Caracterização e quantificação de ácidos graxos livres (AGLs) e ácidos graxos totais (AGTs) por cromatografia gasosa dos extratos obtidos em diferentes condições experimentais;
- Quantificação do teor de cumarina presente no extrato da semente de cumaru em diversas condições de extração por cromatografia líquida;
- Avaliação do teor citotóxico e análise de Mínima Atividade Inibitória dos extratos de semente de cumaru.

O restante do texto é composto por quatro capítulos. O Capítulo II traz uma revisão da literatura sobre a cumarina e suas aplicações, as características da semente de cumaru, técnicas para determinação de equilíbrio de fases e métodos

de extração. No Capítulo III é apresentado uma descrição dos materiais e métodos utilizados para a realização dos experimentos, sendo eles: (a) comportamento de fases do tipo Sólido-Fluido, Sólido-Fluido-Fluido, Fluido-Fluido, Sólido-Líquido-Vapor e Líquido-Vapor e a modelagem termodinâmica empregada para previsão do comportamento Sólido-Fluido do sistema e (b) técnicas utilizadas para extração a partir da semente de cumaru e as metodologias de análises de extrato. No Capítulo IV estão apresentados os resultados e as discussões a respeito dos dados de equilíbrio de fases e das análises dos extratos obtidos, com a observação da significância de cada variável estudada. Finalmente, no Capítulo V estão dispostas as conclusões do trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cumaru (*Dipteryx odorata*)

A espécie *Dipteryx odorata*, popularmente conhecida como cumaru, é uma espécie arbórea de vida longa, na qual as maiores árvores atingem 40 metros de altura, nativa do Brasil, principalmente nos estados Acre, Amazonas, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará e Rondônia, na Guiana e Venezuela e na América Central. O nome genérico *Dipteryx* deve-se ao fato de a flor apresentar duas asas, e *odorata* devido ao forte aroma da cumarina (ALLEN; ALLEN, 1981; CARVALHO, 2009).

A madeira, por ser muito densa e de propriedades físico-mecânicas altas a médias pode ser usada em construção civil, molduras, móveis e outros. As flores são hermafroditas, aromáticas, pequenas, zigomorfas, com perianto rosado e os vetores de polinização são essencialmente espécies de abelhas. O fruto é do tipo legume, pertencendo à família *Fabaceae*, e apresenta apenas uma semente, com endocarpo tardiamente deiscente, após a decomposição do mesocarpo. A produção do fruto pode começar jovem, aos 4 ou 5 anos de idade. No Pará, os frutos maduros ocorrem entre os meses de abril e julho (CARVALHO, 2009).

Na Figura 1 é possível visualizar a semente inteira de cumaru, com comprimento entre 2 e 3 centímetros, e moída, com diâmetro variando entre 1 e 2 milímetros.

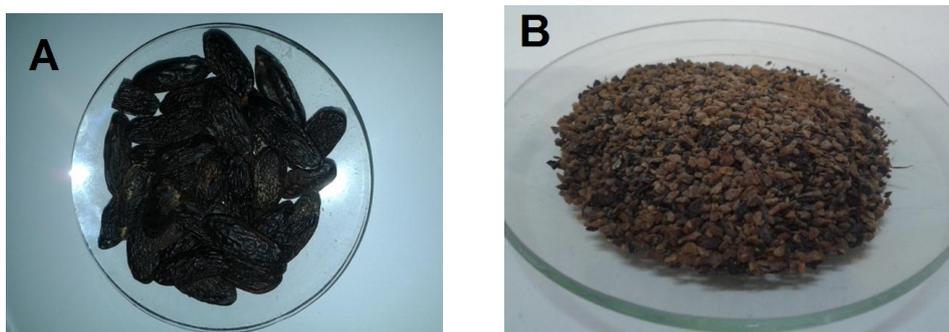


Figura 1: Sementes de Cumaru – A: Inteira; B: Moída de 1 a 2 mm de diâmetro.

As sementes dessa espécie são as maiores fontes de cumarina dentre as espécies da família *Dipteryx*, justificando a marcante fragrância semelhante à baunilha (ALLEN; ALLEN, 1981). São utilizadas na confecção de bijuterias (colares)

e de artesanato em geral. Contudo, seu uso em artesanato, não é recomendado por apresentarem ação antiespasmódica, causando inibição dos espasmos naturais do organismo; diaforética, promovendo maior transpiração; alterações nas contrações cardíacas; e emenagoga, por provocar ou restabelecer a menstruação, tudo isto diante da presença da cumarina, que também é utilizada como medicamento ou fortificante, com propriedades anestésicas a partir do cozimento dos frutos e das sementes, auxiliando ainda no tratamento de problemas respiratórios e cardíacos, além de combater vermes, incluindo-se a amebíase. A semente também é utilizada na fabricação de cervejas artesanais.

A casca é utilizada na preparação de xarope utilizado no combate à tosses, gripes e problemas pulmonares. O óleo da amêndoa pode ser utilizado diretamente em úlcera bucal, otite e em problemas no couro cabeludo, também pode ser usado na formulação de veneno para matar ratos, por sua capacidade de inibir a coagulação do sangue (CARVALHO, 2009).

2.2 Cumarina

A cumarina ($C_9H_6O_2$, 1,2-benzopirona) é um composto formado por um anel aromático fundido em um anel lactona (éster cíclico), derivado do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (MIRANDA, 2001). Fortemente solúvel em diclorometano, levemente em acetato de etila e etanol e pouco solúvel em água. A Figura 2 representa a formação da cumarina.

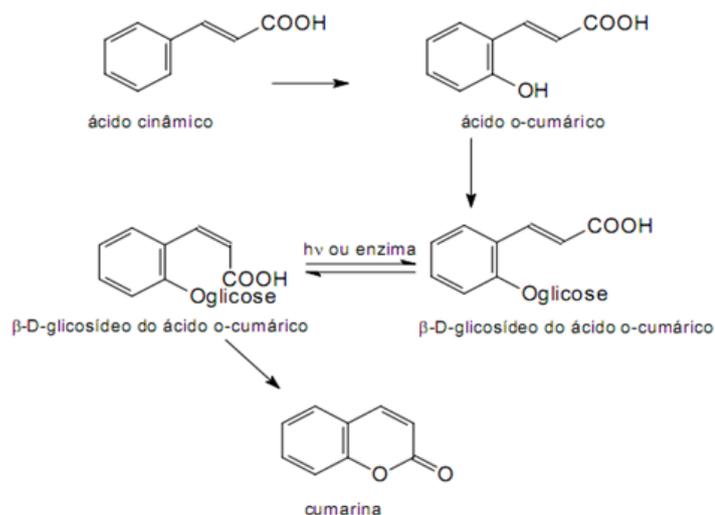


Figura 2: Rota Biosintética da cumarina (MIRANDA, 2001).

A maioria das cumarinas comercializadas são obtidas sinteticamente, por meio de processos longos, caros e fortemente poluentes (RODRIGUES et al., 2008). Apresentam-se com formato de cristal sólido branco em temperatura ambiente com aroma similar ao da baunilha, com potencial para utilização como herbicida (OLIVEROS-BASTIDAS; DEMUNER; BARBOSA, 2013) na composição de perfumes, cosméticos, cigarros (SULLIVAN, 1982), possuindo ainda fins medicinais.

A utilização de cumarina no tratamento contra o câncer de próstata, na prevenção da metástase (MOHLER et al., 1994) e ainda na prevenção e retardamento do câncer maligno (THORNES et al., 1994) foram estudadas, obtendo-se resultados satisfatórios. As atividades antinociceptiva (inibição dos estímulos que causam dor), anti-inflamatória e broncodilatadora de diversas plantas estão relacionadas à presença de cumarina nas mesmas (LEAL et al., 2000). Atualmente, a cumarina encontra-se presente em diversos grupos de medicamentos (JANG et al., 2003; LACY; KENNEDY, 2004; VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013). Além disso, a combinação da cumarina com o troxerutina foi descrita como eficiente no tratamento e prevenção de edema na mucosa, decorrente das radioterapias no tratamento contra o câncer (GRÖTZ et al., 2001).

Os compostos bioativos apresentam propriedades funcionais e são encontrados em ampla variedade de frutos, flores e sementes, sendo utilizados nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e alimentares (MEIRELES, 2009). O isolamento da cumarina a partir da *Cuscuta reflexa* (MITRA; BARMAN; CHANG,

2009), da semente de emburana, *Torresea cearensis* (RODRIGUES et al., 2008), e de duas espécies de guaco, a *Mikania laevigata* e a *Mikania glomerata* (OLIVEIRA et al., 2013), fora realizado anteriormente utilizando-se tecnologia supercrítica e a partir da semente de cumaru, *Dipteryx odorata*, foram empregados métodos convencionais, como Soxhlet utilizando diclorometano como solvente (SULLIVAN, 1982) e maceração assistida, com banhos ultrassônicos utilizando vários solventes (OLIVEROS-BASTIDAS; DEMUNER; BARBOSA, 2013).

2.3 Equilíbrio de Fases a Alta Pressão

Acima da temperatura e pressão crítica, uma substância torna-se um líquido expandido ou um gás comprimido, não podendo mais ser liquefeito independentemente do quanto se eleve a pressão. Neste estado a substância se denomina fluido supercrítico (BERNARDO-GIL et al., 2009; BRUNNER, 2005).

Os fluidos supercríticos apresentam densidade próxima a dos líquidos e viscosidade, difusividade e tensão superficial próxima a dos gases, características que aumentam o poder de solvatação, principalmente devido à alta densidade, sendo que esta pode ser facilmente alterada na área supercrítica, a qualquer aumento da pressão (FAVARETO, 2003; KING; BOTT, 1993). Esta característica atribuída ao fluido supercrítico permite a alteração da solubilidade de um sistema com a adequação da temperatura e pressão, tornando necessário o conhecimento do comportamento de fases de misturas binárias ou ternárias, com a finalidade de otimizar a utilização das propriedades críticas nos processos industriais.

Para obtenção de dados de equilíbrio de fases podem ser utilizados os métodos analíticos ou sintéticos (GIUFRIDA, 2010). Um esquema referente aos tipos de métodos utilizados encontra-se disponível na Figura 3.

Os métodos analíticos envolvem a determinação das composições das fases coexistentes. Quando a célula de equilíbrio é preenchida com os componentes no início do experimento, a composição global da mistura não é precisamente conhecida, somente quando a mistura alcança as condições desejadas de pressão e temperatura, e ocorre a formação de mais de uma fase, é feita a determinação da composição das fases, que pode ser determinada por amostragens ou por medidas indiretas que não requerem a retirada de amostras. Neste último caso são

empregados métodos de análise físico-químicas que usam aparatos de medida dentro da célula de equilíbrio de alta pressão (GIUFRIDA, 2010).

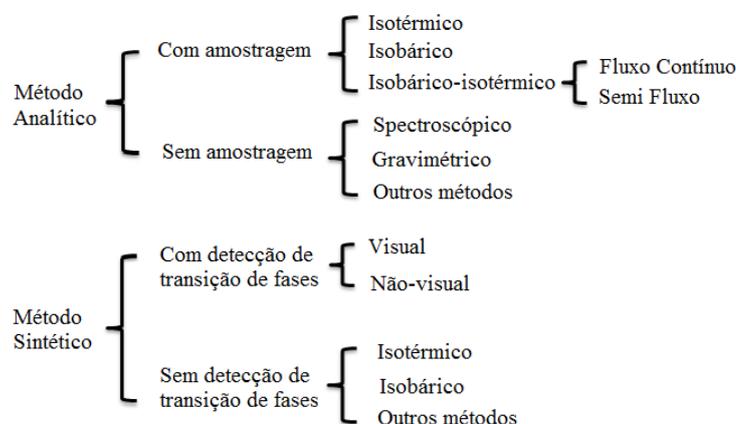


Figura 3: Métodos para estudo de comportamento de fases.

A maior dificuldade do método analítico com amostragem é a retirada da amostra, que pode perturbar a condição de equilíbrio do sistema, e o transporte das amostras até os instrumentos de análise sem provocar mudanças na composição e homogeneidade do sistema (FAVARETO, 2003).

Nos métodos analíticos isobáricos-isotérmicos, muitas vezes chamados de métodos dinâmicos, um ou mais fluxos de fluido são bombeados continuamente para uma célula de equilíbrio termostatizada, a pressão é mantida constante durante o experimento, controlando-se o fluxo de efluente do aparato experimental, geralmente da fase de vapor. Dentre os métodos analíticos Isobáricos-Isotérmicos, destacam-se o método de fluxo-contínuo, e o método de semi-fluxo (DOHRN; PEPER; FONSECA, 2010).

No método de fluxo-contínuo, bombas de alta pressão alimentam os componentes pré-aquecidos em um misturador, onde a temperatura desejada e a transição de fases são alcançadas (FONSECA; SIMOES; NUNES, 2003). Uma corrente de alimentação da mistura proveniente do misturador é separada em uma célula de equilíbrio, obtendo uma fase vapor e uma fase líquida. Os efluentes de ambas as fases são retirados continuamente da célula de equilíbrio para posterior análise, apresentando a vantagem de não perturbação do equilíbrio de fases com a realização de amostragem (BAMBERGER; SIEDER; MAURER, 2000).

Os métodos sintéticos consistem na preparação de uma mistura com composição precisamente conhecida, observando-se posteriormente o comportamento de fases em uma célula de equilíbrio medindo-se as propriedades do estado de equilíbrio como pressão e temperatura. Estes métodos não necessitam da coleta de amostras.

Nos métodos sintéticos com detecção de transições de fases, os valores de temperatura e pressão são ajustados de tal forma que o sistema apresente uma única fase. Em seguida, a temperatura, ou a pressão, é variada até o início da formação de uma segunda fase. Podem ser divididos em métodos sintéticos com detecção de transição de fases visual e não-visual, dependendo de como a transição de fases é detectada (GIUFRIDA, 2010).

No método sintético visual, o surgimento de uma nova fase é geralmente detectado pela observação visual da turbidez ou do menisco resultante em uma célula de equilíbrio com uma janela para visualização. O método sintético visual é usado para a determinação do equilíbrio líquido-vapor, ou mais complexos, como o equilíbrio de sistemas multifásicos, sólido-líquido, entre outros (FRANCESCHI et al., 2004).

Maiores informações a respeito dos métodos para estudo de comportamento de fases são descritos por Favareto (2003) e Giufrida (2010).

Cada método possui vantagens e limitações próprias, sendo cada um deles adequado a um tipo de situação.

No presente caso, o comportamento de fases entre a cumarina e dióxido de carbono foi analisado por meio do método sintético visual, adequado para transições próximas do ponto crítico, devido a não necessidade de amostragem, que pode provocar perturbações no sistema, principalmente na zona onde a densidade é muito elevada. Assim sendo, este método é considerado mais preciso. A disponibilidade do aparato instrumental foi também um fator determinante na escolha do método.

A solubilidade da cumarina + CO₂ foi estudada anteriormente por (RODRIGUES et al., 2008) utilizando o método analítico dinâmico. Este é o método economicamente mais viável, no entanto, apresenta algumas limitações devido a impossibilidade de verificação de transição de fases, a possível insaturação do

solvente, e entupimento ou perda do componente na válvula de saída. (SANTOS et al., 2012).

2.4 Métodos aplicados na extração de compostos bioativos.

2.4.1 Extração Convencional

Métodos de extração utilizando prensagem mecânica e Soxhlet são considerados convencionais (NIMET et al., 2011). Estes métodos foram, e ainda são muito utilizados, no entanto, estão sendo substituídos por outras técnicas, vez que geram subprodutos e demandam grande quantidade de solventes orgânicos, agressivos ao meio ambiente e menos limpos, além disso, requerem investimentos financeiros superiores na separação do extrato final e do solvente (AHANGARI; SARGOLZAEI, 2012; CASAS et al., 2009; LIN; TSAI; WEN, 1999).

O processo de extração por prensa mecânica realiza o esmagamento das sementes obtendo parcialmente o óleo. Esse procedimento pode ser precedido de um aquecimento controlado de grãos, visando aumentar o rendimento da extração (NIMET, 2009).

A extração com Soxhlet apresenta alguns inconvenientes, como o tempo excessivo, visto que são vários os ciclos até a exaustão da matriz vegetal, bem como o uso de alta temperatura necessária para remoção do solvente remanescente, afetando a qualidade do produto (MORETTO, 1998).

2.4.2 Extração com fluido supercrítico (EFS)

A Extração com Fluido Supercrítico (EFS) consiste na obtenção de compostos bioativos utilizando fluido com temperatura e pressão acima do ponto crítico (CAVERO et al., 2006), permitindo que o mesmo seja utilizado como solvente em extrações sólido-fluido. Entre as vantagens da EFS, em relação aos métodos convencionais, destaca-se a flexibilidade do método através da variação no poder solvente e na seletividade, visto que próximo do ponto crítico qualquer alteração na

temperatura e pressão resultaria em grandes variações na densidade, e conseqüentemente no poder de solvatação.

A elevada taxa de transferência de massa dos solutos em meio supercrítico, devido a maior difusividade, menor viscosidade e menor tensão superficial em relação ao solvente líquido, faz dos fluidos supercríticos um meio de processamento adequado para técnicas de extração e separação (RAVENTOS; DUARTE; ALARCON, 2002; SIHVONEN et al., 1999).

A utilização dos fluidos supercríticos torna-se cada vez mais viável: por ser mais rápida, ampliando o retorno financeiro; pelo maior controle e regulamentação governamental dos solventes industriais comuns; pela aceitação do dióxido de carbono; por ser uma alternativa aos solventes orgânicos, apresentando menor impacto ambiental; e pelo aumento das exigências dos processos de separação para obtenção de um produto mais seguro, livre de resíduos de solventes. Este último, grandemente favorecido pela utilização de fluidos que se apresentem em estado gasoso em condições ambientes, visto que ao sofrer despressurização é automaticamente separado do extrato, sendo possível ainda a recuperação do gás solvente de forma limpa, e a reutilização do mesmo, tornando o processo ainda mais sustentável (BOTT, 1993).

O dióxido de carbono tem sido amplamente utilizado neste tipo de extração por ser considerado um solvente atóxico, não inflamável, de baixo impacto ambiental, prontamente disponível, e facilmente removível do produto extraído, além de apresentar condições supercríticas leves (Temperatura Crítica = 31,06°C e Pressão Crítica = 73,80 bar), evitando degradação de componentes termolábeis, apresentando ainda baixo custo, alta compressibilidade, densidade similar ao líquido, alta difusividade, baixa viscosidade e baixa tensão superficial (CASAS et al., 2009; CAVERO et al., 2006; DANH et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013; LIN; TSAI; WEN, 1999; MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2009; MEIRELES, 2009).

O dióxido de carbono supercrítico é altamente solúvel em solutos apolares e de alto peso molecular, para aumentar a interação com solutos polares há a possibilidade de adição de co-solventes polares (também chamados modificadores) ao CO₂ (MEIRELES, 2009). Estes co-solventes são adicionados em quantidades pequenas, evaporando rapidamente na saída do extrator, não reduzindo as

vantagens de obtenção de um extrato livre de solventes orgânicos. Acetato de etila, diclorometano e etanol estão entre os mais utilizados como co-solventes para extração de componentes bioativos. (KITZBERGER et al., 2007; MEIRELES, 2009).

Na extração supercrítica o extrator é alimentado com a matriz sólida, e aquecido até a temperatura na qual será conduzida a extração. O gás solvente previamente pressurizado entra em contato com a matriz sólida e atravessa o leito fixo formado, e então solubiliza os componentes com o qual possui afinidade, extraíndo-os até o esgotamento do substrato. A mistura formada entre o fluido e o extrato segue até a válvula de saída, onde o extrato é coletado e o fluido é automaticamente separado do produto. A curva cinética formada pela massa de extrato ao longo do tempo é dependente das condições de extração e por ela é possível avaliar o esgotamento do substrato.

2.5 Planejamento Experimental

Para a avaliação de variáveis é necessário um planejamento experimental adequado, que permita a condução de experimentos de forma concisa, reduzindo ao máximo o desperdício de materiais e trabalhos repetitivos, sem prejudicar a confiabilidade dos resultados. A utilização do design fatorial fracionado (arranjo ortogonal) conhecido como Taguchi possibilita a avaliação de vários níveis e fatores, atendendo aos fatores que garantem a eficiência e o número reduzido de experimentos, e conseqüentemente o custo e tempo para realização. Desta forma, um planejamento muito numeroso na forma fatorial completa pode ser reduzido consideravelmente, mantendo a confiabilidade dos resultados (ROY, 2001).

O tratamento dos resultados obtidos através deste Design Experimental Ortogonal pode ser realizado por meio de Análise de Variância (ANOVA). Este método foi utilizado em diferentes áreas, inclusive na EFS (ANSARI; GOODARZNI, 2012; CHEAH; HENG; CHAN, 2010; DESAI; PARIKH, 2012; LIU et al., 2008; LÓPEZ-SEBASTIÁN et al., 1998).

2.6 Modelagem Matemática do processo de extração

Os modelos matemáticos são ferramentas que permitem análises do processo e previsões do comportamento de determinadas variáveis do processo, em diferentes condições de operação. Para avaliar a performance do modelo são necessários dados experimentais do processo, geralmente obtidos em escala laboratorial. Os modelos matemáticos fenomenológicos são obtidos a partir de balanços de massa e energia, e possuem parâmetros que são estimados a partir de dados experimentais (SANTOS, 2013).

Em geral, estes modelos conseguem prever o comportamento do sistema, em várias condições de operação, sua aplicabilidade não se limita à faixa em que foram ajustados seus parâmetros. Na modelagem matemática da extração por fluido supercrítico deve ser observada a estrutura do material, que geralmente é previamente triturado afim de aumentar a área de contato com o solvente supercrítico, e para facilitar a acessibilidade do solvente ao soluto presente no interior da estrutura celular, resultando numa maior taxa de transferência de massa (MEIRELES, 2009).

Para reduzir a complexidade dos modelos matemáticos são feitas algumas simplificações acerca de como o soluto está distribuído no interior do sólido (adsorvido na rede de poros, amarrado dentro das estruturas celulares ou homogeneamente distribuído no interior da partícula), e sobre o mecanismo envolvido na cinética de transferência de massa resistência interna ou externa de transferência de massa ou a combinação de várias resistências (OLIVEIRA; SILVESTRE; SILVA, 2011).

Na Extração com Fluido Supercrítico a utilização de modelagem matemática é necessária para melhor compreensão do fenômeno, além de descrever o comportamento da cinética de extração em diferentes condições operacionais e permitir o projeto e otimização em escala industrial.

Todos os modelos empregados para descrever a EFS de óleos ou outros componentes de materiais vegetais consideram que as partículas estão empacotadas dentro da coluna do extrator. As simplificações empregadas pela maioria dos autores são no sentido de que a operação é isotérmica, a queda de pressão no interior do extrator é desprezível, e de que a porosidade do leito e a

densidade do sólido são constantes durante a extração. Além disso, é usual assumir que a densidade do fluido e a velocidade permanecem constantes, pois em geral, a solubilidade dos extratos é baixa no solvente, e que a dispersão axial negligenciável. Essas suposições reduzem a complexidade para obtenção das solução das equações do modelo, que são as seguintes: balanço de massa, relações de equilíbrio e leis cinéticas para descrever o processo de extração (MCHUGH; KRUKONIS, 1986).

Na literatura, existem vários modelos com solução analítica usados para descrever as cinéticas de EFS, tais como: CRANK (1975), MARTÍNEZ et al.(2003); SOVOVÁ (1994), entre outros, são geralmente utilizados.

3. METODOLOGIA

A seguir, serão apresentadas as metodologias utilizadas para estudo de equilíbrio de fases da cumarina, modelagem termodinâmica do comportamento de fases do sistema, extração, análise termogravimétrica, modelagem das curvas cinéticas da extração via fluidos pressurizados, identificação e quantificação dos compostos bioativos da semente de cumaru, concentração inibitória mínima e citotoxicidade.

3.1 Aparato e Procedimento de Equilíbrio de Fases do Sistema CO₂ + cumarina.

O diagrama esquemático apresentado na Figura 4 representa o aparato utilizado nos experimentos de equilíbrio de fases:

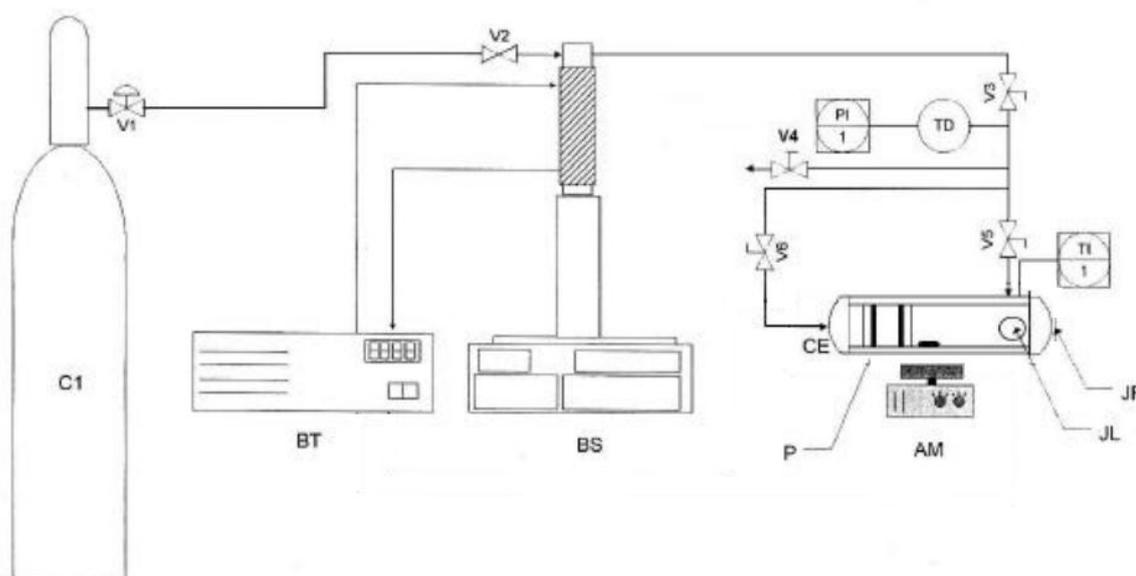


Figura 4: Aparato Experimental Equilíbrio de Fases Método Sintético Visual. C1) cilindro de solvente; V1, V3, V4, V5 e V6) válvula; V2) válvula de retenção; BS) bomba de alta pressão; CE) célula de equilíbrio; TI) termopar; JL) janela de safira lateral; JF) janela de safira frontal; P) pistão, TI) indicador de temperatura; TD) Transdutor de Pressão; PI) Indicador de Pressão; AM) Agitador Magnético; BT) Banho Termostático.

O cilindro de solvente armazena o dióxido de carbono utilizado nos experimentos. A primeira válvula (V1), quando aberta, permite o fluxo de solvente do cilindro para a bomba e a válvula de retenção impede a volta do solvente da bomba para o cilindro.

A bomba de alta pressão é do tipo seringa, marca ISCO, modelo 260D, com capacidade máxima de 260 mL e 500 bar de pressão.

A célula de equilíbrio consiste de um cilindro de aço inox 316, com capacidade máxima de 25 mL. No interior da célula há um pistão móvel que tem por objetivo controlar o volume e, conseqüentemente, a pressão do sistema. A célula possui duas entradas superiores: uma para conexão com o termopar e outra com a válvula de alimentação; uma entrada lateral onde é fixada a janela de safira lateral para entrada de luz e janela de safira frontal, para permitir a visualização do interior da célula, e traseira (fechamento e conexão com a válvula V6).

O pistão é inserido no interior da célula e possui dois anéis BUNA N90 localizados em suas extremidades, permitindo seu deslizamento pelo interior da célula para controle de pressão, garantindo a vedação entre a câmara do fundo e da frente da célula.

A V2 e V3 são válvulas agulha (Marca HIP, Modelo 15- 11AF2), sendo que a primeira permite o fluxo de solvente, e a segunda é utilizada para descarga da célula.

A V5 e V6 são válvulas agulha (Marca HIP, Modelo 15- 11AF1), sendo que a primeira permite a alimentação de solvente à célula por meio de uma abertura gradual e, conseqüentemente, uma regulagem do fluxo de solvente alimentado à célula, e a segunda é utilizada para a compressão do fundo da célula.

O indicador de temperatura (Marca COEL, Modelo HW4200) é composto por um termopar do tipo T e um indicador de temperatura. O termopar é inserido diretamente no interior da célula para leitura da temperatura do sistema, e um controlador PID (DIGI MEC mark, SHM 112 model) com incerteza na temperatura de $\pm 1.0K$.

O Transdutor de Pressão (Smar LD 301) é conectado à linha proveniente da bomba para medir a pressão do sistema. O indicador de pressão (Smar HT2) recebe um sinal digital do TD e indica a pressão na linha.

O agitador magnético (Marca IKA) proporciona a agitação do sistema no interior da célula, acionando uma barra magnética revestida com teflon.

O banho termostático (Marca TECNAL, Modelo TE- 184) é utilizado para controlar a temperatura no cilindro da bomba.

O mesmo aparato foi utilizado em trabalhos anteriores (GIUFRIDA et al., 2011; PINTO et al., 2013; SOUZA et al., 2008).

Para a montagem do aparato experimental utilizado no estudo de comportamento de fases, o pistão foi ajustado dentro da célula de equilíbrio, o que garantiu resistência adequada e deslizamento de forma uniforme, e o fundo da célula foi fechado. Uma quantidade exata de massa de soluto foi colocada dentro da célula, juntamente com uma barra magnética. Na parte anterior foi primeiramente colocado um anel de teflon que garantisse a vedação da mesma, além da janela de safira e um anel de cobre. Então, ela foi fechada. A linha de alimentação e o termopar foram conectados na célula e uma quantidade exata de solvente foi inserida, por meio de diferença no volume da bomba.

Ao atingir a proporção soluto/solvente desejada, o sistema foi aquecido a uma determinada temperatura e mantido em constante perturbação por meio de um agitador e da barra magnética dentro da célula.

O CO₂ foi utilizado também para pressurizar o sistema. Para isso, o gás foi inserido na parte posterior do pistão e a pressão exercida por ele no sistema era controlada por meio da bomba seringa. A pressurização do sistema foi realizada de forma gradativa, até que a mistura apresentasse um sistema homogêneo, o qual pode ser observado por meio da janela de safira.

O sistema era mantido em equilíbrio por 30 minutos e, então, a pressão na célula era diminuída de forma gradativa, até ser observada a transição de fases. Este procedimento foi realizado em triplicata para as temperaturas 25, 35, 45, 55 e 65°C.

Para determinar a quantidade de massa de soluto e volume de CO₂ que deveriam ser alimentados foram realizados cálculos que utilizaram a densidade e o peso molecular dos componentes, sendo o peso molecular da cumarina de 146,15 g/mol e densidade 0,7 g/cm³ (RODRIGUES et. al., 2008), e o peso molecular do dióxido de carbono de 44,01 g/mol e densidade de 0,86 g/cm³, com pressão igual a 100 bar e temperatura igual a 20°C.

3.2 Modelagem Termodinâmica do Equilíbrio de Fases

Para modelagem dos dados experimentais obtidos no presente trabalho foi utilizado o critério de isofugacidade das fases em equilíbrio. Quando se trata de equilíbrio sólido-fluido, a equação de isofugacidade é resolvida para a fase sólida e a fase fluida, sendo que a fase sólida é considerada soluto puro (POLING; PRAUSNITZ; O'CONNELL, 2001).

$$f_2^S = f_2^F \quad (1)$$

O subscrito $_2$ refere-se ao soluto (cumarina) e os sobrescritos “S” e “F” à fase sólida e à fluida, respectivamente.

A fugacidade da fase fluida pode ser dada por:

$$\hat{f}_2^F = w_2 \hat{\phi}_2^F P \quad (2)$$

no qual w pode ser a fração molar na fase líquida (x) ou na fase vapor (y), $\hat{\phi}_2^F$ é o coeficiente de fugacidade da fase fluida da cumarina, e P é a pressão.

A fugacidade da fase sólida pode ser calculada por:

$$\hat{f}_2^S(T, P) = \hat{f}_2^{LSR}(T, P) \cdot \exp \left[\int_{P_2^{sat}}^P \frac{V_2^S - V_2^{LSR}}{RT} dP + \frac{\Delta h_2^{fus}}{RT_2^{fus}} \left(1 - \frac{T_2^{fus}}{T} \right) \right] \quad (3)$$

Sendo $\hat{f}_2^{LSR}(T, P)$ a fugacidade do sólido puro no estado de líquido sub-resfriado em função da temperatura e da pressão do sistema. Considerando que o volume específico do sólido no estado de líquido sub-resfriado (V_2^{LSR}) depende fracamente da pressão, tem-se:

$$\hat{f}_2^S(T, P) = \hat{f}_2^{LSR}(T, P) \cdot \exp \left\{ \frac{(V_2^S - V_2^{LSR})[P - P_2^{sat}(T)]}{RT} + \frac{\Delta h_2^{fus}}{RT_2^{fus}} \left(1 - \frac{T_2^{fus}}{T} \right) \right\} \quad (4)$$

Sendo o volume de sólido = 156,30 cm³/mol.

Para o cálculo da pressão de saturação foi utilizada a equação:

$$\ln P_2^{sat}(\text{bar}) = 22,00492 + \frac{10479,46}{T(K)} \quad (5)$$

Para o cálculo do $\hat{\phi}_2^F$ foi empregada a equação de estado cúbica de Peng-Robinson (ECE-PR):

$$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a}{V^2 + 2bV - b^2} \quad (6)$$

No qual P é a pressão absoluta do sistema, T é a temperatura absoluta e V é o volume molar. Para o cálculo dos coeficientes a e b da equação (6) foi empregada a regra de mistura quadrática de Van der Waals a dois parâmetros, independentes da temperatura:

$$a = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j a_{ij} \quad (7)$$

$$b = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j b_{ij} \quad (8)$$

Com,

$$a_{ij} = \sqrt{a_{ii} a_{jj}} (1 - k_{ij}) \quad (9)$$

e

$$b_{ij} = \frac{b_{ii} + b_{jj}}{2} (1 - l_{ij}) \quad (10)$$

Para a ECE-PR tem-se que:

$$b_{ii} = 0,07779R \frac{Tc_i}{Pc_i} \quad (11)$$

$$a_{ii} = a(Tc)\alpha(T) \quad (12)$$

No qual:

$$a(Tc) = \frac{0,4572R^2 Tc_i^2}{Pc_i} \quad (13)$$

$$\alpha(T) = \left[1 + f(\omega) \left(1 - \sqrt{\frac{T}{Tc_i}} \right) \right]^2 \quad (14)$$

$$f(\omega) = 0,37464 + 1,54226\omega - 0,26992\omega^2 \quad (15)$$

Os valores das propriedades críticas da cumarina foram calculados por meio do método de contribuição por grupos. Empregou-se a metodologia de Marrero e Gani (2001) e utilizou-se grupos de primeira e segunda ordem. Os valores encontrados na literatura para o CO_2 (Angus, et. al., 1976) e calculados para a cumarina estão dispostos na Tabela 1:

Tabela 1: Parâmetros de interação binária k_{ij} , l_{ij} e propriedades dos componentes do sistema.

Componentes	Parâmetro k_{ij} : 0,2075		Parâmetro l_{ij} : $1,13 \times 10^{-8}$	
	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (bar)	Pressão crítica (bar)	ω
CO_2	31,06	73,80	73,80	0,2390
Cumarina	521,77	43,47	43,47	0,3945

3.3 Extração a partir da semente de cumaru

3.3.1 Pré-tratamento da matriz vegetal

Foram adquiridos 3kg da semente de cumaru na Oriental Central Comércio Ltda, no Estado do Pará, Brasil, em junho de 2013. Com a utilização de um processador de uso doméstico obteve-se partículas da semente com diâmetro entre 1 e 2mm, e as mesmas foram armazenadas sob refrigeração até o início das extrações.

3.3.2 Extração pelo método Soxhlet

Foram realizadas duas extrações por método de Soxhlet, uma com a utilização de 300 mL de álcool etílico 95% (Synth, p.a.) e outra 300 mL de hexano (Synth, p.a.), massa de 25 gramas de semente de cumaru moídas e temperatura de 45°C. A extração foi desenvolvida com duração de 48 horas de maneira contínua, até o esgotamento da amostra. Os rendimentos obtidos foram calculados de acordo com o peso inicial da amostra. A metodologia utilizada foi similar à descrita por Sullivan (1982).

3.3.3 Extração com Fluidos Pressurizados

A extração de cumarina a partir da semente de cumaru com o uso de fluidos pressurizados ainda não havia sido realizada. Sendo assim, baseado nas numerosas vantagens da utilização do dióxido de carbono, este foi escolhido como solvente. A utilização de co-solventes para a extração de cumarina foi sugerida no trabalho realizado por RODRIGUES et. al. (2008), visto que ao utilizar apenas dióxido de carbono como fluido extrator obteve quantidades pequenas de cumarina na extração a partir da semente de emburana. Contudo, foram realizados testes preliminares com a utilização de CO₂ puro e obteve-se pouca quantidade de extrato. Assim, optou-se pela utilização dos co-solventes etanol, acetato de etila e

diclorometano. Foi utilizado o aparato em escala laboratorial, conforme mostra o esquema da Figura 5.

O cilindro de CO₂ obtido pela White Martins S.A. (Brasil) apresentava 99,9% de pureza. O cilindro extrator tinha volume aproximado de 163 mL (25,6 cm de altura e 2,85 cm de diâmetro). As bombas do tipo seringa eram da marca ISCO, Modelo 500D, sendo que uma era abastecida com o dióxido de carbono e outra com co-solvente.

Mais detalhes sobre o aparato utilizado são descritos em trabalhos anteriores deste grupo de pesquisa (GARCIA et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013; LEMOS et al., 2012).

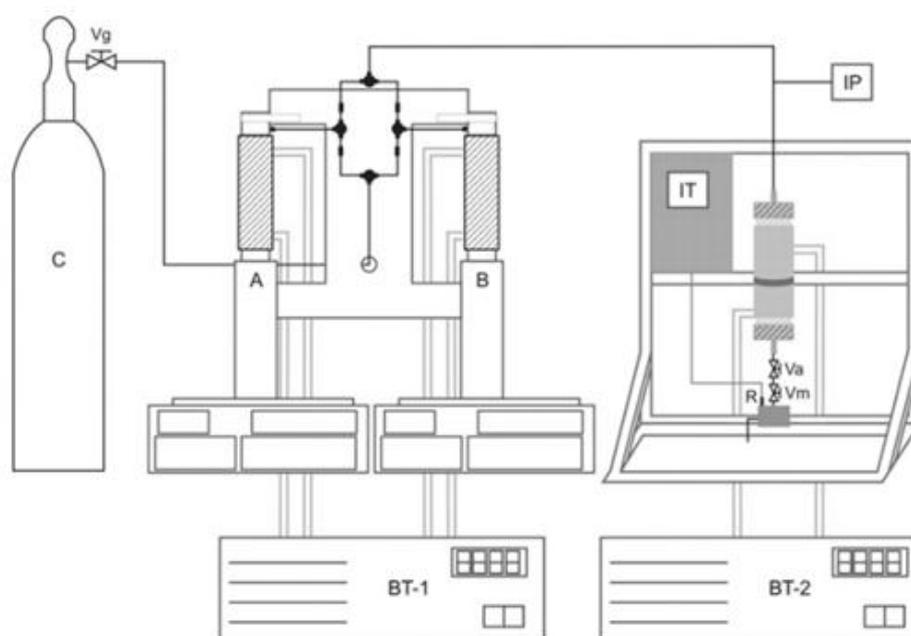


Figura 5: Aparato experimental utilizado para a extração com CO₂ supercrítico. C: Cilindro de CO₂; A e B: Bomba do tipo seringa; IP: Indicador de pressão; IT: Indicador de temperatura; Vg: Válvula globo que permite a passagem de CO₂ do cilindro até a bomba; Va: Válvula agulha para saída dos solventes saturados de extrato; Vm: Válvula micrométrica que permite regulagem do fluxo de solventes; R1: Reservatório de coleta do extrato; BT1 e BT2: Banho termostatizado.

Aproximadamente 60 gramas de semente de cumaru foram utilizados em cada experimento e acondicionados no cilindro extrator. O dióxido de carbono e o co-solvente eram pressurizados por meio das bombas até o extrator, aonde entrava em

contato com a matriz vegetal e permanecia por 20 minutos, a fim de atingir o equilíbrio entre o soluto e o solvente. A válvula era aquecida a uma temperatura de 80°C, para evitar o congelamento do CO₂ e o entupimento da mesma. A mistura era levada até a saída do extrator, com uma vazão pré-determinada de 3 mL min⁻¹, e o extrato era instantaneamente separado do solvente por meio da despressurização. Os compostos bioativos eram finalmente coletados em frascos. A cinética de cada extração foi realizada em intervalos de 20 minutos até completar 140 minutos.

3.4 Planejamento Experimental

Nas extrações utilizando CO₂ supercrítico com adição de co-solventes foi utilizado um planejamento experimental ortogonal com quatro variáveis e três níveis (3⁴) - método Taguchi, o que totalizou em nove experimentos, realizados em duplicata, conforme descrito por Liu et al. (2008). As variáveis independentes a serem avaliadas foram o co-solvente, sua porcentagem em relação ao volume de CO₂, pressão e temperatura. A variável dependente foi a porcentagem de extrato em relação à quantidade de sementes utilizada. Os dados foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) por meio do software Statistica 8.0. O nível de significância foi definido com p-valor < 0,05. Nas extrações por Soxhlet foram utilizados os solventes orgânicos etanol e hexano.

O hexano é utilizado como solvente de óleos vegetais segundo a AOAC e está entre os principais solventes usados nestes tipos de extração (LAMEIRA; COELHO; MOTHÉ, 1997). No entanto, este solvente é tóxico e apresenta riscos à saúde humana se não for completamente removido do produto final após a extração. Já o etanol é um solvente não tóxico e amplamente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia.

O planejamento utilizado está disposto na Tabela 2.

Tabela 2: Planejamento experimental das extrações

Exp	Amostra	Tipo do Solvente orgânico	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Solvente Orgânico (%)
1	E123	Etanol	60	200	5
2	E231	Etanol	70	220	1
3	E312	Etanol	80	180	3
4	A111	Acetato de Etila	60	180	1

5	A222	Acetato de Etila	70	200	3
6	A333	Acetato de Etila	80	220	5
7	D132	Diclorometano	60	220	3
8	D213	Diclorometano	70	180	5
9	D321	Diclorometano	80	200	1
10	S_etanol	Soxhlet com Etanol	45	-	-
11	S_hexano	Soxhlet com Hexano	45	-	-

3.5 Modelagem Matemática de Extração com Fluidos Pressurizados

A modelagem matemática proposta teve como objetivo geral calcular os parâmetros de transferência de massa relevante ao processo de extração supercrítica conduzida em escala laboratorial. A curva cinética para a extração a partir da semente de cumaru por meio de fluidos pressurizados foi construída com a utilização do modelo proposto por SOVOVÁ (1994) (AHANGARI; SARGOLZAEI, 2012; PEDERSSETTI et al., 2011; RIBAS et al., 2014; SANTANA, 2013). Este modelo considera as seguintes hipóteses:

- I. O processo é isotérmico e isobárico;
- II. A transferência de massa por dispersão axial e radial dentro do extrator é negligenciável;
- III. Os compostos bioativos são tratados como pseudocomponente;
- IV. Dois mecanismos de transferência de massa: difusão no filme externo e difusão intrapartícula.

O modelo apresentado por SOVOVÁ (1994) se baseia em balanços de massa que consideram o escoamento do solvente na direção de um leito fixo, com seção transversal cilíndrica e velocidade superficial U .

O modelo assume que o conteúdo de óleo extraível (x_0) é dividido em duas partes: óleo de fácil acesso (x_p) e óleo de difícil acesso (x_k). Isto ocorre, pois algumas células se rompem durante a moagem, fato o qual expõe o óleo que está em seu interior. No entanto, algumas células permanecem intactas e ficam em seu interior um conteúdo de óleo de difícil extração, visto que a moagem excessiva resulta em partículas demasiadamente finas que podem resultar em compactação da matriz sólida. Sendo assim, dificulta-se a permeabilidade do fluido e se faz necessário a difusão do solvente para o interior das células de modo a solubilizar o

óleo presente. Desta maneira, na primeira etapa de extração, onde o óleo está na superfície, a transferência de massa é controlada pela difusão no filme externo. A segunda etapa, onde o óleo é de difícil acesso, é caracterizada pelo coeficiente de transferência de massa da fase sólida. Sendo assim, a característica do modelo é computar as contribuições de cada etapa em termos de quantidade de óleo.

Desta maneira, as equações do balanço de massa, propostas pelo modelo de SOVOVÁ (1994), são representadas pelas Equações (16) e (17):

Fase sólida:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = \frac{-J(x,y)}{\rho_s(1-\varepsilon)} \quad (16)$$

Fase fluida:

$$U \frac{\partial y}{\partial h} = \frac{J(x,y)}{\rho_f} \quad (17)$$

$$J(x,y) = \begin{cases} k_s \cdot x & x < r \text{ (Fase sólida)} \\ k_f \cdot (y - y_{eq}) & x > r \text{ (Fase fluida)} \end{cases}$$

Sendo:

x : a razão mássica de soluto (concentração) na fase sólida (góleo/gsólido);

y : a razão mássica de soluto (concentração) na fase fluida (góleo/gsolvente);

t : o tempo (s);

h : coordenada axial (m);

U : a velocidade superficial do solvente (m/s);

ρ_s : a densidade da fase sólida (Kg_{sólido}/m³);

ρ_f : a densidade da fase fluida (Kg_{solvente}/m³);

ε : a porosidade do leito;

$J(x,y)$: a taxa de transferência de massa interfacial (Kg/m³.s);

k_f : o coeficiente de transferência de massa no meio externo (min⁻¹)

k_s : o coeficiente de transferência de massa no sólido (min⁻¹)

Como descrito anteriormente, o teor inicial de óleo no sólido (0) é dividido em óleo livre (P), que se concentra na superfície do sólido, e óleo o qual se encontra no interior do sólido (K). A concentração de soluto na fase sólida é descrita por meio do

teor de sólidos totais livre de soluto, ou sólido inerte (N), por meio das seguintes relações:

$$x_0 = \frac{O}{N}; x_K = \frac{K}{N}; x_P = \frac{P}{N}$$

As condições iniciais e de contorno para as equações diferenciais do balanço de massa para as fases sólida e fluida são:

$$x(h, t = 0) = x_0 \quad (C.I.1)$$

$$y(h = 0, t) = 0 \quad (C.C.)$$

Sendo:

x_0 : a razão mássica inicial de soluto na fase sólida (g/g).

A solução analítica do modelo Sovová é formada por três equações distintas, correspondentes aos diferentes mecanismos que controlam a transferência de massa na coluna. Estas são representadas pelas Equações (18) – (20):

Para $t < t_{CER}$, tem-se que:

$$m_{\acute{o}leo} = \dot{m}_F S_b t [1 - \exp(-Z)] \quad (18)$$

Sendo:

t_{CER} : tempo em que ocorre a extração do óleo livre na entrada da coluna (min);

$m_{\acute{o}leo}$: massa de óleo extraída (g);

\dot{m}_F : vazão mássica do solvente (g/min);

S_b : solubilidade de extrato (g extrato/ g solvente);

Z : parâmetro ajustável do modelo de Sovová referente à transferência de massa na fase fluida.

Para $t_{CER} \leq t \leq t_{FER}$, tem-se que:

$$m_{\acute{o}leo} = \dot{m}_F S_b [t - t_{CER} \exp(Zm(t) - Z)] \quad (19)$$

Para $t > t_{FER}$, tem-se que:

$$m_{\acute{o}leo} = m_S \left\{ q_0 - \frac{S_b}{W} \ln[1 + (A - 1)Br] \right\} \quad (20)$$

Sendo:

t_{FER} : tempo em que ocorre a extração do óleo livre na saída da coluna (min);

m_S : massa de sólido isenta de óleo (g);

q_0 : concentração inicial do óleo na matriz sólida (g óleo/g sólido);

r : fração de óleo facilmente acessível.

As variáveis para estas equações são propostas pelas Equações (21)-(27):

$$A = \exp\left(\frac{Wq_0}{S_b}\right) \quad (21)$$

$$B = \exp\left(\frac{W\dot{m}_F}{m_S}\right) (t_{CER} - t) \quad (22)$$

$$Zm(t) = \frac{ZS_b}{Wq_0} \ln\left\{\frac{1}{1-r}(B - r)\right\} \quad (23)$$

$$Z = \frac{k_F a m_S \rho_F}{\dot{m}_F \rho_{leito}} \quad (24)$$

$$W = \frac{m_S k_S a}{\dot{m}_F (1-\varepsilon)} \quad (25)$$

$$t_{CER} = \frac{(1-r)m_S q_0}{S_b Z \dot{m}_F} \quad (26)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_S}{W \dot{m}_F} \ln[r + (1-r)A] \quad (27)$$

Onde:

ρ_F é a densidade do solvente (g/L);

ρ_{leito} é a densidade do leito (g sólido/L)

O parâmetro r do modelo de Sovová representa a fração de óleo de fácil acesso. Como em todos os experimentos as sementes de cumaru utilizadas passaram pelo mesmo tratamento (moagem e peneiramento), o valor deste parâmetro deve ser constante, isto é, independe das condições experimentais de extração e do solvente. Para o ajuste do parâmetro foi usado o método "golden search", e a função objetivo utilizada foi a da Equação (28):

$$F = \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^N \left(m_{\acute{o}leo_{i,j}}^{MOD} - m_{\acute{o}leo_{i,j}}^{EXP} \right) \quad (28)$$

Onde $m_{\acute{o}leo}^{MOD}$ representa a massa extraída calculada com o modelo, $m_{\acute{o}leo}^{EXP}$ a massa extratada experimental, neo número total de experimento de extração com CO₂ como solvente e No número de pontos sobre a curva cinética obtida a partir dos dados experimentais.

No cálculo da função objetiva representada pela Equação (28), os valores dos parâmetros Z e W variam de acordo com as condições experimentais de extração, enquanto que o parâmetro r é constante. Os valores dos parâmetros Z e W para cada experimento são estimados a partir da aplicação do método Simplex e do uso da seguinte função objetiva:

$$F = \sum_{j=1}^N (m_{\acute{o}leo_j}^{MOD} - m_{\acute{o}leo_j}^{EXP})$$

O coeficiente de determinação (R^2) é uma medida em percentagem que explica o quanto o modelo consegue explicar os valores observado (SARMENTO, 2006) e foi calculado de acordo com a Equação (29):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{j=1}^n (m_{\acute{o}leo_j}^{EXP} - m_{\acute{o}leo_j}^{MOD})^2}{\sum_{j=1}^n (m_{\acute{o}leo_j}^{EXP} - \bar{m}_{\acute{o}leo_j})^2} \quad (29)$$

O erro médio absoluto (ADD) é a diferença entre o valor experimental e o valor predito pelo modelo, calculado conforme a Equação (30):

$$ADD = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \frac{|m_{\acute{o}leo_j}^{EXP} - m_{\acute{o}leo_j}^{MOD}|}{m_{\acute{o}leo_j}^{EXP}} \times 100 \quad (30)$$

3.6 Análise das Amostras

Foram realizadas análises termogravimétricas (TG) para verificação de degradação dos componentes decorrente da aplicação de altas temperaturas na extração (CARRIER et al., 2011; ELDER; KUSH; HERMANN, 2011; SANTOS et al., 2012; SHADANGI; MOHANTY, 2014).

As análises qualitativas e quantitativas foram desenvolvidas por meio do uso de: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível (HPLC-UV-Vis) para caracterização de componentes não voláteis; cromatografia

gasosa com um espectrômetro de massas quadrupolar rápido (GC/q-MS) para análise de ácidos graxos livres; e cromatografia gasosa com um detector de ionização em chama (GC-FID) para análise de ácidos graxos totais.

3.6.1 Análise Termogravimétrica (TG)

As análises termogravimétricas foram realizadas com o objetivo de verificar se houve degradação de compostos de interesse com as temperaturas aplicadas na extração.

A variação da massa ocorre devido a fenômenos físicos e químicos como, por exemplo, a decomposição térmica, a retenção de gás, a dessorção de espécies previamente absorvidas ou adsorvidas. Isso foi registrado com precisão de 0,1 µg.

A exposição à temperatura elevada pode alterar a estrutura química e, conseqüentemente, as propriedades físicas do material. Portanto, a curva de degradação térmica, em condições não isotérmicas, mostra o perfil de resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura. As curvas termogravimétricas apresentam informações sobre estabilidade térmica e a composição da amostra original, identificação de algum composto intermediário que pode ter sido formado e, ainda, a composição de resíduos, se houver. A estabilidade térmica é definida como a capacidade da substância em manter suas propriedades, durante o processo térmico, o mais próximo possível de suas características iniciais (SALIM, 2005).

Foi utilizado o analisador térmico Shimadzu- DTG-60 H com um fluxo de nitrogênio de 100 mL min⁻¹, o qual teve início com temperatura ambiente até atingir 600°C, com uma rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹. Cinco miligramas de amostra foram colocadas em um cadinho de alumínio para a condução do experimento. Este procedimento foi realizado para o óleo de soja como material de referência, visto que é composto majoritariamente por triglicerídeos, cumarina padrão e extratos obtidos nas extrações por Soxhlet e Fluido Supercrítico.

3.6.2 Identificação e quantificação de cumarina realizada em HPLC

A identificação e quantificação de cumarina foi feita por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, visto que se trata de um composto não volátil. As análises do extrato foram desenvolvidas com o uso do equipamento Varian Polaris Modelo 210, equipado com coluna de fase reversa Luna 5 μ m, fase estacionária C18 (2) 100 Å (150 mm x 4,6 mm), o qual operou a 30°C. As amostras foram injetadas com um volume de 2 μ L manualmente. A fase móvel foi 5% de ácido acético em fase aquosa e uma mistura de 60% de acetonitrila e 40% de metanol, utilizado em modo gradiente conforme Tabela 3. O procedimento foi baseado no método de Oliveira (2013) com modificações.

Tabela 3: Eluição Gradiente da Fase Móvel

Tempo (min)	Fase A	Fase B
0	60	40
5	60	40
10	40	60
20	10	90
25	10	90
30	60	40

Para a análise foi utilizado um detector UV-VIS com o comprimento de onda 274nm. Os dados foram processados por meio do software Galaxie. Foi injetada soluções do padrão de cumarina (Synth 99,5%) para a comparação do tempo de retenção e quantificação do composto no extrato. A curva de calibração da cumarina foi realizada nas concentrações de 20, 25, 30, 35 e 40 mg L⁻¹. A equação da reta desta curva e a área dos picos cromatográficos de cada extrato injetado foram utilizados para a determinação da concentração de cumarina.

3.6.3 Análises de ácidos graxos livres realizada em GC/q-MS

A determinação e quantificação de ácidos graxos foram desenvolvidas em um cromatógrafo gasoso equipado com um espectrômetro de massas da marca

Shimadzu GC/q-MS-QP2010 Plus com coluna capilar ZB-5MS (diâmetro interno 0,25 mm × 30 m, espessura do filme 0,25µm).

Para análise dos compostos não ligados ao glicerol em GC/q-MS foi feita derivatização com BSTFA (Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide). Os ácidos graxos livres da molécula de glicerol, embora sejam componentes com baixa concentração, são responsáveis pela acidez da amostra e variam conforme a condição de extração. Assim, é importante a quantificação desses ácidos, a fim de avaliar as condições de operação (GARCIA et al., 2012).

Na derivatização com BSTFA ocorreu a troca de hidrogênios ativos por um grupo trimetilsilil, para transformar os ácidos graxos livres em ésteres sililados. Os demais (triglicerídeos) ficam retidos no *liner* por não serem vaporizados na temperatura do injetor.

Para a sililação 10 mg de cada amostra foram acondicionadas em um vial, sendo acrescentado 25 µL do padrão interno (heptadecanoato de metila) na concentração de 1000 mg L⁻¹ e 25 µL de BSTFA e diclorometano até completar 1 mL. O vial foi selado com o septo e a amostra foi aquecida uniformemente em banho de areia a 60°C durante 30 minutos, para assegurar que ocorresse a reação completa. O mesmo procedimento de derivatização foi efetuado para a solução que contém a mistura dos padrões dos ácidos graxos. Todos os padrões utilizados foram adquiridos na empresa Sigma Aldrich com pureza superior a 99%. A condição de operação está descrita na Tabela 4.

Tabela 4: Condições de Operação GC/q-MS

T. T. (°C min ⁻¹)*	T.C. (°C)**	T. P. (min)***
0	110	2
8	200	4
2	210	6
15	280	0

* T. T.: Taxa de Aumento de Temperatura

** T.C.: Temperatura da Coluna

*** T.P.: Tempo de Permanência

A temperatura do injetor foi 280°C; volume da injeção de 1µL, Split 1:20, fluxo de gás hélio 1 mL min⁻¹. O espectrômetro foi conduzido com o modo de impacto de

elétrons a 70 eV. A leitura foi efetuada no modo SIM, onde a razão massa/carga monitoradas foram 73 e 74.

A identificação dos ácidos graxos livres na amostra foi realizada por meio do tempo de retenção da solução padrão, com a confirmação dos fragmentos de massa presentes nos espectros de massa no modo SCAN. A quantificação foi feita por padronização interna (heptadecanoato de metila) e levou-se em consideração a área e o fator de resposta calculado para cada ácido graxo analisado (FREITAS, 2007; VISENTAINER; FRANCO, 2012).

3.6.4 Análises de ácidos graxos totais realizadas em GC-FID

Para análise dos ácidos graxos totais foi utilizado o procedimento de Hartman e Lago (1973), no qual os ácidos graxos livres e ligados ao glicerol que tenham sido saponificados têm as hidroxilas substituídas por um grupo metila por meio da derivatização.

O procedimento consiste em pesar 50mg da amostra em um erlenmeyer de boca esmerilhada conectado a um condensador. Em seguida foram adicionados 4mL de solução de hidróxido de potássio em metanol (2% m/V), sob agitação e aquecimento mantido em refluxo por 5 minutos. Após este tempo, foi adicionado 6mL de uma solução de cloreto de amônio (8,4g de NH_4Cl + 250mL de MeOH + 13,6mL de H_2SO_4) a qual permaneceu por 3 minutos, e 5mL de bicarbonato de sódio por 2 minutos. Para a extração foram adicionados 5mL de hexano (grau HPLC) sob agitação por 2 minutos. Após este período, a solução permaneceu acoplada no condensador até esfriar. Para a análise, o sobrenadante (fração orgânica) foi transferido para um balão volumétrico, onde foi completado o volume a 10 mL com hexano.

A quantificação de ácidos graxos totais foi realizada em um cromatógrafo gasoso por ionização em chama, da marca Shimadzu GC-FID 2010, com coluna capilar ZB-Wax (30m x 0,25 mm x 0,25 μm), temperatura do injetor e detector a 230°C, Split 1:20, fluxo de 1,2 mL min^{-1} .

A rampa de aquecimento foi: 170°C por 1 minuto, incremento de 10°C min^{-1} até 210°C, permanecendo por 1 minuto e por fim aumento de 5°C min^{-1} até atingir 230°C, permanecendo por 6 minutos. Os padrões utilizados na identificação e

quantificação foram adquiridos na empresa Sigma Aldrich, com pureza superior a 99%.

3.7 Análise de citotoxicidade

As análises da citotoxicidade foram realizadas com todos os extratos obtidos por extração com Soxhlet e com fluidos pressurizados, segundo metodologia de Dias (1999) e Siqueira (2003). A observação se deu no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos – UEM, para todas as amostras de extratos de semente de cumaru obtidas via supercrítica e uma por extração com solvente orgânico (etanol).

O efeito citotóxico das amostras sobre células VERO foi determinado com a utilização de um inóculo inicial de $2,5 \times 10^5$ células mL^{-1} em DMEM, acrescidos de 10% de SFB (soro fetal bovino) e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços estéreis, com incubação em 37°C e tensão de 5% de CO_2 , durante 24 horas, para a formação de uma microcamada de células. Após este tempo foram adicionadas diferentes concentrações das amostras. Foi realizado controle de células, ou seja, sem adição das amostras. A microplaca foi incubada por 72 horas e, após esse período, o meio dos poços foi removido e as células lavadas com $100 \mu\text{L}$ de PBS (tampão fosfato de salina). Em seguida, foi adicionado MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrasólio) na concentração de 2mg mL^{-1} . A placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37°C protegida da luz. Na sequência, foi adicionado $150 \mu\text{L}$ por poço de DMSO. A absorbância foi determinada em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS), a 570nm . A concentração 50% citotóxica (CC_{50}) foi avaliada por análise de regressão linear.

3.8 Concentração Inibitória Mínima

3.8.1 Atividade Contra Fungos Leveduriformes

Os ensaios de Concentração Inibitória Mínima foram realizados no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos – UEM, para todas as amostras de extratos de semente de cumaru obtidas via supercrítica e uma por extração com solvente orgânico (etanol).

Para todos os testes de atividades fungicidas dos extratos de *Dipteryx odorata* foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), por meio da metodologia de microdiluição em caldo, segundo o documento M27-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007 - 2009).

Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (AMRESCO, 99,9% de pureza), seguido de diluição seriada com caldo Sauboraud. As concentrações testadas foram de 1000 µg/mL a 1 µg/mL.

Para o preparo do inóculo, uma cultura de 48 horas das leveduras crescidas em caldo Sauboraud foi suspensa em solução salina estéril e a concentração padronizada a 10^8 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias), por meio do uso da escala de McFarland. Foi realizada uma diluição de 1:10 em tubo Eppendorf e obteve-se uma suspensão de 10^7 UFC/mL. O teste se deu em microplacas de 96 poços (TPP), com caldo Sauboraud, onde os extratos foram testados com as suspensões com leveduras e incubadas a 37°C por 48 h.

Para os testes foram utilizadas cepas de *Cândida tropicalis* (ATCC 28707), *Cândida albicans* (ATCC 10231) e *Cândida parapsilosis* (ATCC 22019).

3.8.2 Atividade Antibacteriana

As análises da atividade antibacteriana foram realizadas com os extratos obtidos por extração supercrítica, além do extrato obtido com o etanol por Soxhlet, de acordo com a metodologia que segue.

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram testadas as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Para o preparo do inóculo, uma cultura de 24 horas das bactérias crescidas em caldo Mueller-Hinton foi suspensa em solução salina estéril, e a concentração padronizada a 10^8 UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colonias), com a utilização da escala de McFarland. Foi realizada uma diluição de 1:10 em tubo Eppendorf e obteve-se uma suspensão de 10^7 UFC/mL. O teste se deu em microplacas de 96 poços TPP com caldo Mueller-Hinton, onde os extratos foram testados com as suspensões com leveduras e incubadas a 37°C por 24 h.

A concentração inibitória mínima (CIM) de todos os extratos vegetais foi determinada por meio da técnica de micro-diluição em caldo Mueller-Hinton, conforme recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007 - 2009).

Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (AMRESCO, 99,9% de pureza), seguido de diluição seriada com caldo Muller-Hinton. As concentrações testadas foram de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A CIM foi definida como a menor concentração dos extratos em que os micro-organismos testados não demonstram crescimento visível.

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo são apresentados os resultados para as transições de fases do sistema CO₂(1) + Cumarina(2).

Inicialmente são apresentados dados do comportamento de fases para validação experimental, realizados em trabalhos anteriores por Favareto et al.(2010) na reprodução dos dados experimentais de solubilidade do sistema binário {CO₂(1) + naftaleno(2)}, reportados na literatura.

Logo após, são apresentados os resultados de rendimento em termos de massa obtidos na extração via Soxhlet e tecnologia supercrítica a partir da semente de cumaru, seguido pelas análises termogravimétricas e cromatográficas e a discussão a respeito da seletividade da cumarina em relação às condições de extração e análise do perfil de ácidos graxos.

O capítulo é finalizado com os resultados das análises de citotoxicidade e Concentração Inibitória Mínima realizadas com os extratos obtidos nas extrações.

4.1. Validação do Aparato Instrumental Utilizado nos Experimentos de Comportamento de Fases

O aparato utilizado neste trabalho e em outros trabalhos do nosso grupo foi anteriormente validado por meio de medição de dados de equilíbrio de fases do sistema CO₂(1) + naftaleno(2), e comparado com dados já existentes na literatura. Estes dados são apresentados na Tabela 5, em função de composição molar, onde x_2 representa a fração molar de naftaleno, e P a pressão em bar. Os experimentos foram realizados na temperatura de 55°C.

Tabela 5: Dados experimentais para medidas de transições de fases do tipo SF para o sistema CO₂(1) + Naftaleno(2) obtidos por Favareto (2010).

x_2	P (bar)
T = 55°C	
0.0052	110,0 ± 2,0
0.0105	122,0 ± 2,0
0.0178	135,0 ± 2,0
0.0215	136,0 ± 2,0
0.0252	143,0 ± 2,0
0.0291	147,0 ± 2,0

Na Figura 6, os dados de comportamento de fases do sistema $\{\text{CO}_2(1) + \text{naftaleno}(2)\}$ são apresentados em um gráfico pressão x composição, comparados com dados existentes na literatura.

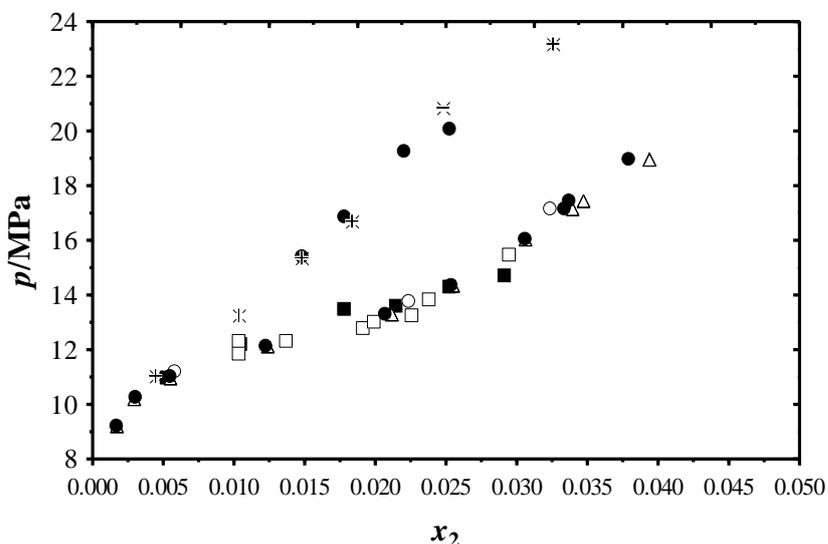


Figura 6 Diagrama pressão x composição para o sistema $\{\text{CO}_2(1) + \text{Naftaleno}(2)\}$ sob condições de equilíbrio sólido-vapor a 328 K (■ Nosso grupo de pesquisa - (FAVARETO et al., 2010)); △ (MCHUGH; PAULAITIS, 1980); ○ (CHANG; MORRELL, 1985); □ (ZÚÑIGA-MORENO; GALICIA-LUNA; CAMACHO-CAMACHO, 2005) e sistema $\{\text{CO}_2(1) + \text{bifenil}(2)\}$ sob condições de equilíbrio sólido - vapor a 328 K (● Nosso grupo de pesquisa - FAVARETO et al. (2010)); ✱ (MCHUGH; PAULAITIS, 1980).

O gráfico demonstra que a validação do aparato obteve resultados satisfatórios, ou seja, houve reprodutibilidade dos dados prolatados na literatura. Com isso, conclui-se que a unidade experimental está apta para condução de experimentos de obtenção de dados de equilíbrio de fases a altas pressões.

4.2 Dados de Equilíbrio de Fases do Sistema $\{\text{CO}_2(1) + \text{Cumarina}(2)\}$

O comportamento de fases do sistema $\{\text{CO}_2(1) + \text{Cumarina}(2)\}$ foi estudado nas isotermas 25, 35, 45, 55 e 65°C e isopletras 2×10^{-3} , 3×10^{-3} , 4×10^{-3} , 5×10^{-3} e 6×10^{-3} . O limite superior das frações molares em termos de cumarina foi 6×10^{-3} , devido à insolubilidade de concentrações superiores de soluto, mesmo à pressões próximas a

do limite do aparato (300 bar). Na Tabela 6 estão dispostos todos os dados de transição de fases observados, dispostos em isotermas.

Tabela 6: Dados Experimentais de Transição de Fases para o do sistema {CO₂(1) + Cumarina(2)}.

X ₂	P (bar)	Desvio Padrão	Tipo de Transição	X ₂	P (bar)	Desvio Padrão	Tipo de Transição
T=25°C				T=45°C			
0,002	64,033	0,15	LV	0,002	81,85	0,55	FF
0,003	78,15	1,08	SF	0,003	108,57	0,32	FF
0,003	60,06	0,31	SLV	0,004	136,58	1,53	FF
0,004	92,34	0,66	SF	0,0045	148,07	0,07	FF
0,004	58,80	0,42	SLV	0,005	154,66	1,18	FF
0,0045	100,93	1,03	SF	0,0055	162,25	0,13	FF
0,0045	58,78	0,13	SLV	0,006	170,05	0,71	FF
0,005	108,57	0,61	SF	T=55°C			
0,005	59,76	0,23	SLV				
0,0055	60,46	0,47	SLV	0,002	100,96	1,66	FF
0,006	119,62	0,52	SF	0,003	139,34	1,90	FF
0,006	60,8	1,06	SLV	0,004	152,24	0,35	FF
T=35°C				0,0045	159,24	1,75	FF
0,002	76,23	0,25	FF	0,005	167,27	0,38	FF
0,003	88,73	0,93	SF	0,0055	173,64	2,05	FF
0,003	83,60	0,30	SFF	0,006	179,19	0,34	FF
0,004	116,0	0,02	SF	T=65°C			
0,004	100,0	0,99	SFF				
0,0045	129,1	1,15	SF	0,002	112,46	1,12	FF
0,0045	105,24	1,80	SFF	0,003	155,36	1,05	FF
0,005	134,03	0,15	SF	0,004	180,06	2,74	FF
0,005	115,04	0,08	SFF	0,0045	183,9	0,17	FF
0,0055	135,59	0,58	SF	0,005	188,66	1,08	FF
0,0055	121,88	2,20	SFF	0,0055	194,59	0,21	FF
0,006	140,13	0,99	SF	0,006	198,66	0,57	FF
0,006	71,0	0,50	SLV				

Onde:

LV: Transição de fases do tipo líquido-vapor;

SF: Transição de fases do tipo sólido-fluido;

SLV: Transição de fases do tipo sólido-líquido-vapor;

FF: Transição de fases do tipo fluido-fluido;

SF: Transição de fases do tipo sólido-fluido;

SFF: Transição de fases do tipo sólido-fluido-fluido;

Ao conduzir o experimento a 25°C na menor concentração de sólido (2×10^{-3}), o sistema foi totalmente solubilizado com a elevação da pressão. Após diminuição da pressão do sistema foi observada a transição de vaporização do CO_2 , sendo rotulada como LV. Contudo, nas demais concentrações para a mesma temperatura, cristais pontiagudos caracterizaram a formação da fase sólida, o que resultou na transição SF, onde a janela de safira mostrou-se límpida e os sólidos bem marcados. Além dessas transições, observou-se também o ponto trifásico SFF nas isopletras entre 3×10^{-3} e 6×10^{-3} .

Para a isoterma de 35°C observou-se a transição sólido-fluido SF, no entanto, a precipitação de sólidos ocorreu de maneira diferente: eles se formaram como flocos aderidos à janela e se apresentaram em um sistema com aspecto turvo. Após formação desses sólidos e diminuição progressiva da pressão houve a formação de gotículas de cumarina fundidas na janela, com uma coloração amarela, o qual caracterizou a formação de uma terceira fase, rotulada como SFF. As transições trifásicas SFF não ocorreram na concentração 6×10^{-3} .

Em sistemas pressurizados, a temperatura de fusão do sólido tende a diminuir. Assim, a cumarina, que possui temperatura de fusão próxima a 70°C, apresentou-se na forma fluida a 45°C. Em temperaturas iguais ou superiores a 45°C houve a formação de gotículas na janela, que posteriormente se acumularam. Caracterizou-se assim a transição do tipo FF.

Um fato particular foi observado para os experimentos de transição de fases na isoterma de 25°C. Para essa isoterma foram encontradas duas pressões de transição de fases distintas: ao iniciar o experimento da menor (25°C) para a maior temperatura (70°C) e ao iniciar o experimento da maior (70°C) para a menor temperatura (25°C). Para o primeiro caso (na ordem crescente da temperatura), as pressões de transição de fases foram significativamente superiores às transições de fases obtidas no segundo caso (na ordem decrescente da temperatura). Observou-se ainda que quanto maior a fração molar, mais perceptível se tornava este efeito. Este fato pode ser explicado, novamente, pela diminuição da temperatura de fusão da cumarina com o aumento da pressão. Desta maneira, a cumarina é solubilizada de forma mais efetiva pelo CO_2 . No entanto, em temperaturas menores, a mistura se

torna aparentemente homogênea, mas não se estabiliza suficientemente. Além disso, é nítida a mudança no tamanho das partículas da cumarina com a elevação da temperatura.

Na maioria dos tipos de transição de fases há interferência da fração molar e da temperatura na obtenção das pressões de transição de fases, pois à medida que a fração molar de cumarina no sistema é elevada e se mantém a mesma temperatura, a pressão necessária para obtenção de uma mistura homogênea é, conseqüentemente, maior.

Este efeito é igualmente notado em relação à temperatura: se tomarmos uma isopleta, verificamos que o aumento da temperatura do sistema acarretará na elevação da pressão para obtenção de uma mistura homogênea. Estas observações podem ser notadas com clareza na Figura 7, referente ao diagrama de fases do sistema.

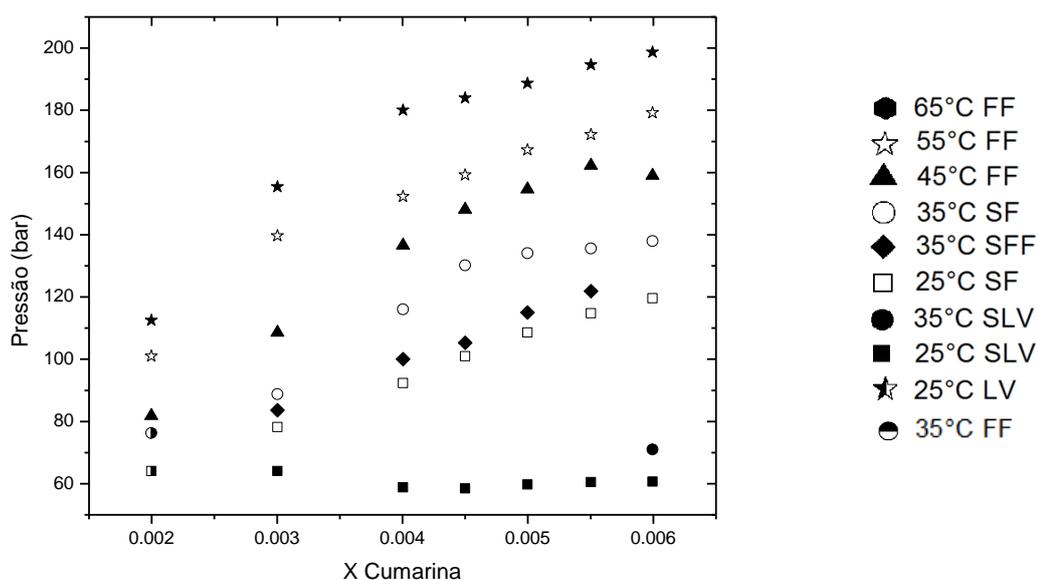


Figura 7: Diagrama de fases P-x para o sistema {CO₂(1) + Cumarina(2)}

O sistema apresentou transições de fases bastante diversificadas ao alterar as condições dos experimentos. Na Figura 8 é possível observar os vários estágios do sistema, do início ao fim da condução do estudo de comportamento de fases da cumarina em dióxido de carbono.

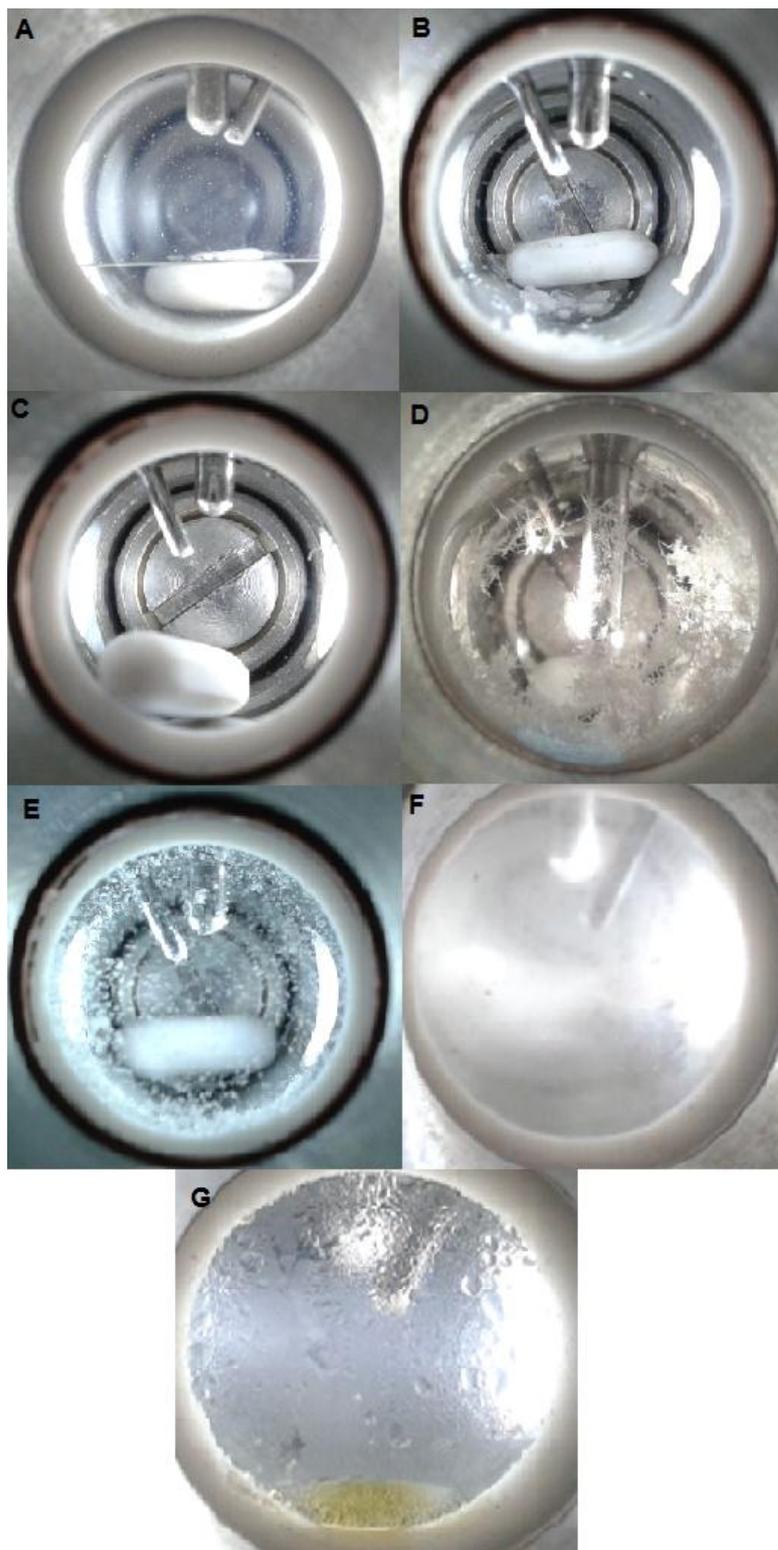


Figura 8: Célula de Equilíbrio em diversas etapas do experimento.

Sendo:

- A: Célula com cumarina sendo alimentada com CO₂ - todas as temperaturas;
- B: Pressurização da célula, com CO₂ já liquefeito - todas as temperaturas;
- C: Mistura completamente homogênea - todas as temperaturas;
- D: Mistura heterogênea sólido-fluido a 25°C;
- E: Mistura heterogênea sólido-fluido a 35°C;
- F: Mistura heterogênea fluido-fluido a 45°C;
- G: Mistura heterogênea fluido-fluido a 45°C, após acúmulo da cumarina fluida.

A estimativa dos parâmetros do modelo (ECE-PR) foi obtida a partir dos dados experimentais de equilíbrio SF para as temperaturas 25°C e 35°C. O diagrama de fases do tipo pressão x composição está disposto na Figura 9.

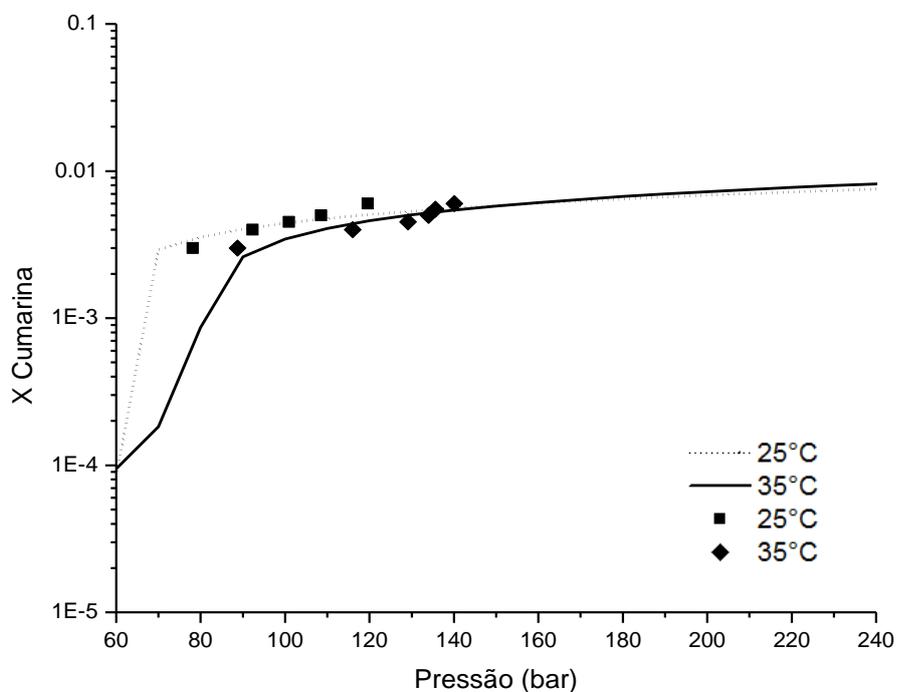


Figura 9: Diagrama P-x do sistema {CO₂ (1) + Cumarina (2)} de medidas de transição do tipo SF.

Verifica-se a partir deste diagrama que o modelo ECE-PR foi capaz de prever adequadamente o comportamento de equilíbrio SF.

4.3 Extrações por Soxhlet e solventes pressurizados

A partir das extrações por Soxhlet, com os solventes orgânicos etanol e hexano, o extrato obtido apresentou coloração amarela, devido à possível presença de maiores teores de subprodutos. Já na extração que utilizou fluidos pressurizados, o extrato se apresentava na forma sólida, de coloração branca com uma pequena quantidade líquida em algumas condições de extração. É possível ver as características dessas amostras na Figura 10.

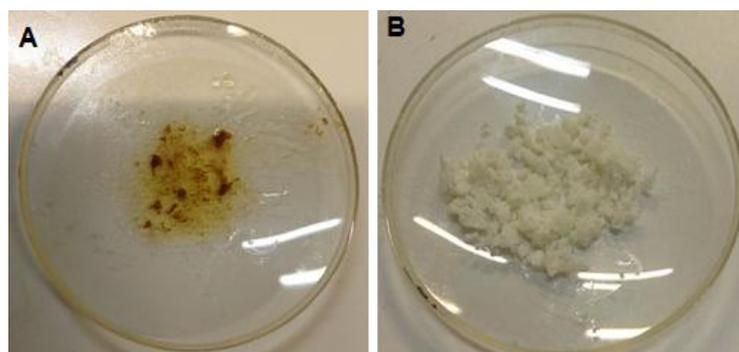


Figura 10: Extratos a partir da semente de Cumaru - A - Extração via solvente orgânico; B - Extração via fluido pressurizado.

Os rendimentos foram calculados em termos de porcentagem de massa extraída em relação à massa de semente seca utilizada, dispostos na Tabela 7. As siglas das amostras são referentes às condições de extração, conforme descrito anteriormente na Tabela 2.

Tabela 7: Rendimento em termos de massa de extrato total.

Exp	Amostra	Rendimento da Extração (%)	Desvio Padrão
1	E123	4,61	0,19
2	E231	3,19	0,04
3	E312	2,14	0,07
4	A111	3,76	0,23
5	A222	3,64	0,27
6	A333	4,28	0,25
7	D132	5,29	0,24
8	D213	2,89	0,24
9	D321	2,60	0,01
10	S_etanol	46,50	0,30
11	S_hexano	19,13	0,87

Ao observar os resultados descritos na Tabela 7 nota-se que as extrações por Soxhlet resultaram em rendimentos superiores às SFE em termos de massa, principalmente por meio da utilização de álcool etílico com um rendimento de 46,6%. Enquanto isso, as extrações com dióxido de carbono obtiveram um rendimento entre 2,14% e 5,29%. Este comportamento está relacionado a diversos fatores, como o tempo de extração superior e a recirculação e a polaridade do solvente (BENELLI et al., 2010; GONÇALVES et al., 2013). No entanto, devem ser feitas as análises qualitativas e quantitativas das amostras, visto que o componente de interesse é a cumarina, sendo que a extração com solventes orgânicos pode apresentar grandes quantidades de subprodutos, como abordado na literatura anteriormente.

Com relação às extrações que utilizaram fluidos pressurizados, a condição que obteve o maior rendimento foi a de maior pressão (220 bar), menor temperatura (60°C) e 3% de diclorometano. Este comportamento é devido à influência da densidade do CO₂ em seu poder de dissolução, sendo proporcional à pressão com temperatura constante e inversamente proporcional à temperatura quando a pressão é constante, principalmente em áreas próximas do ponto crítico (KING; BOTT, 1993). A densidade também reflete em uma maior força de arraste, a qual extrai todos os tipos de compostos presentes na amostra, inclusive produtos indesejáveis.

Os resultados obtidos em termos de extrato total mostram também a influência do co-solvente, visto que ao utilizar etanol e acetato de etila os rendimentos aumentaram na proporção do uso de uma maior quantidade de co-solvente. Esse fato não foi notado ao utilizar diclorometano, visto que a pressão influenciou fortemente e resultou em rendimento superior ao utilizar a condição D132.

O planejamento experimental, método de Taguchi, consiste em um arranjo incompleto, não sendo realizadas todas as combinações de níveis de variáveis possíveis. As condições são avaliadas estatisticamente e, com isso, possibilitam prever os resultados da combinação das variáveis mais significativas. Esta análise foi realizada a partir do software Statistica, com os rendimentos obtidos a partir de cada condição de extração. Na Tabela 8 estão dispostas as condições ótimas apontadas pelo software e o tamanho do efeito para cada variável.

Tabela 8: Condições ótimas de extração em termos de extrato total.

Fator	Nível	Tamanho do Efeito
Tipo de co-solvente	Acetato de Etila	0,259
Temperatura (°C)	60	0,853
Pressão (bar)	220	0,583
Co-solvente (%)	5	0,291
Rendimento Estimado	5,233	

A partir do tamanho do efeito é possível perceber que a variável de maior significância foi a temperatura e a de menor significância foi o tipo de co-solvente utilizado. A combinação das variáveis ótimas é confirmada com a visualização do gráfico na Figura 11.

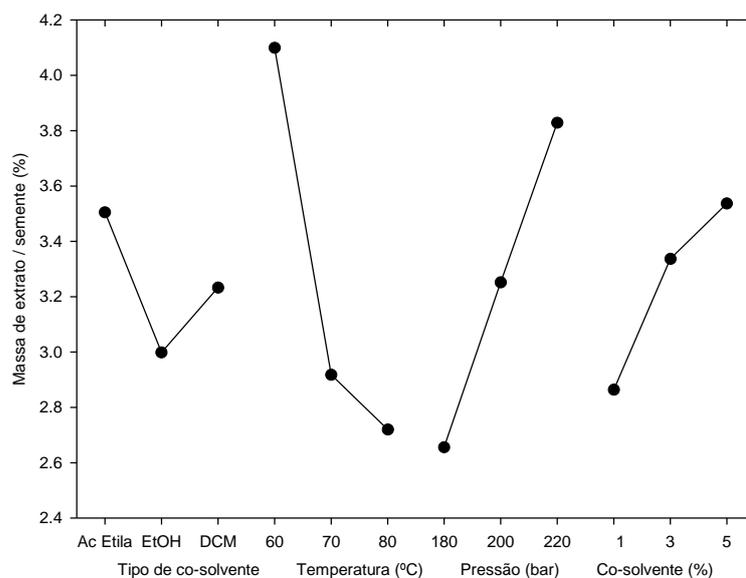


Figura 11: Condições ótimas de extração em termos de massa de extrato.

Este gráfico mostra os efeitos das variáveis. A partir da Análise de Variância (ANOVA) é possível perceber que todas as variáveis escolhidas são influentes no rendimento da extração ($p < 0,05$), embora o tipo de co-solvente utilizado, seguido da pressão, mostraram maior significância onde a condição mais impactante para maior teor de extrato é a maior concentração de acetato de etila. Dentre os co-solventes utilizados, o acetato de etila apresenta a menor constante dielétrica.

4.4 Modelagem Matemática do Processo de Extração Supercrítica

A cinética da extração de compostos bioativos a partir da semente de *Dipteryx odorata* foi representada pelo modelo de Sovová, conforme metodologia descrita no Capítulo 3.5. As curvas experimentais e calculadas para todas as condições experimentais são apresentadas nas Figuras 12, 13 e 14.

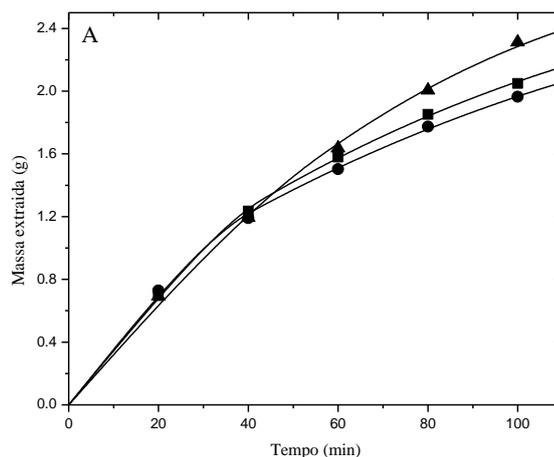


Figura 12: Gráfico que representa os modelos matemáticos para as diferentes curvas cinéticas experimentais de extração de compostos bioativos da semente de cumaru, por meio da utilização do CO₂ supercrítico com adição de acetato de etila como co-solvente (▲: 220 bar e 80°C, ■: 180 bar e 60°C; ●: 200 bar e 70°C).

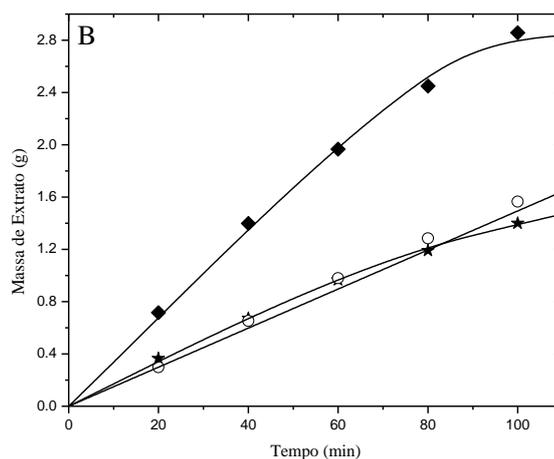


Figura 13: Gráfico o qual representa os modelos matemáticos para as diferentes curvas cinéticas experimentais de extração de compostos bioativos da semente de cumaru, com a utilização de CO₂ supercrítico e a adição de diclorometano como co-solvente (◆: 220 bar e 60°C; ★: 200 bar e 80°C; ○: 180 bar e 70°C).

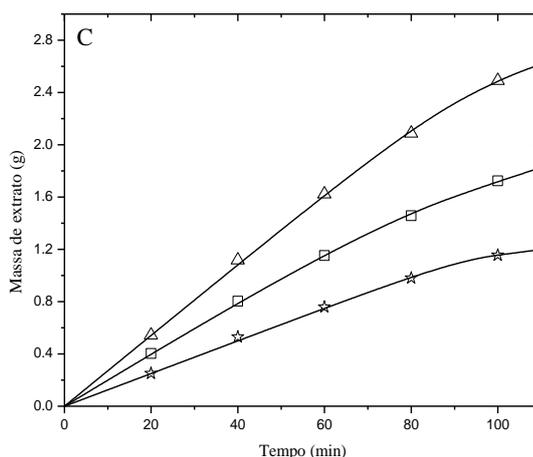


Figura 14: Gráfico o qual demonstra os modelos matemáticos para as diferentes curvas cinéticas experimentais de extração de compostos bioativos da semente de cumaru, com a utilização de CO₂ supercrítico e a adição de etanol como co-solvente (☆: 180 bar e 80°C; □: 220 bar e 70°C; △: 200 bar e 60°C).

A partir das Figuras 12, 13 e 14 é possível verificar a adequação do modelo de Sovová ao representar a cinética de extração sob altas pressões e com a utilização de CO₂ e vários co-solventes.

Na Tabela 9 são apresentados o valor de parâmetro adimensional relacionado à transferência de massa na superfície do sólido (Z), o parâmetro adimensional relacionado à transferência de massa no interior do sólido (W), o tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte inicial do leito (t_{CER}) e o tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte final do leito (t_{FER}) para cada condição de extração utilizando fluidos pressurizados, para a simulação das curvas cinéticas de extração.

Para avaliar o modelo testado foram analisados os índices da função objetivo, o coeficiente de correlação (R^2) e o erro médio absoluto (ADD), também apresentados na Tabela 9 e calculados de acordo com as Equações (29) e (30), respectivamente.

Os valores apresentados para o coeficiente de correlação variaram entre 0,9957 e 0,9995, valores muito próximos a 1, os quais indicam que o modelo foi satisfatório ao representar a cinética de extração (NIMET et al., 2011; PEDERSSETTI et al., 2011; REBOLLEDA et al., 2013). Os parâmetros com melhor

ajuste foram obtidos para a amostra com as condições de extração: 1% de etanol, 70°C e 220 bar (E231).

Tabela 9: Valores dos parâmetros calculados para o modelo Sovová.

Extração	Z	W	r	Sb (g/g)	t _{CER} (min)	t _{FER} (min)	Função objetivo	R ²	ADD (%)
A111	4,488	0,406	0,681	0,0169	12,467	77,378	7,744E-4	0,9993	1,021
A222	3,497	0,357	0,681	0,0184	15,291	75,945	0,00262	0,9973	2,030
A333	2,581	0,725	0,681	0,0181	21,833	91,241	0,00542	0,9967	3,047
D321	2,705	0,236	0,681	0,0103	39,369	162,36	0,00112	0,9983	2,555
D132	2,792	2,691	0,681	0,0159	19,482	95,708	0,01248	0,9957	3,409
D213	85,654	1,688	0,681	0,0081	1,522	185,866	0,02269	0,9774	6,343
E312	9,936	0,112	0,681	0,0077	15,686	187,891	0,00105	0,9980	2,800
E123	6,819	1,543	0,681	0,0125	10,531	109,408	0,00188	0,9992	1,617
E231	4,476	0,389	0,681	0,0096	21,619	140,896	5,767E-4	0,9995	1,306

Baseado nos parâmetros calculados pelo modelo de Sovová (apresentados na Tabela 9), é possível calcular os coeficientes de transferência de massa intrapartícula (K_s) e no filme externo (K_f). Estes parâmetros foram calculados para a condição de extração com melhor ajuste dos parâmetros (amostra E231) e, com isso, obteve-se os valores K_f $1,36 \times 10^{-07}$ (m/s) e K_s $1,12 \times 10^{-08}$ (m/s). Valores de K_f entre $1,75$ e $6,06 \times 10^{-7}$ foram descritos para o óleo semente de prímula e $1,98 \times 10^{-7}$ para o óleo de candeia, obtidos via CO_2 supercrítico (BOTT, 1993; RIBAS et al., 2014).

No cálculo do coeficiente de difusão (CD), ao considerar o perfil de concentração parabólico para uma partícula esférica, foi utilizada a seguinte expressão, sendo R_p o raio da partícula:

$$CD = \frac{K_s * R_p}{5}$$

O coeficiente de difusão para a condição de extração E231 foi $6,64 \times 10^{-13}$, o qual está compatível aos valores na literatura (RIBAS et al., 2014).

A extração de 3% de acetato de etila, 70°C e 200 bar obteve maior solubilidade (0,0184 g de extrato/g de solvente). O valor do erro absoluto corresponde à soma dos erros relativos e foi aceitável nesta modelagem, pois variou entre 1,0% e 6,34%.

4.5 Análise Termogravimétrica (TG)

Foram realizadas análises termogravimétricas a fim de verificar as faixas de temperatura de degradação e de estabilidade dos extratos obtidos, bem como da cumarina padrão e do óleo de soja. Os dados obtidos estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10: Porcentagens de degradação da amostra na primeira e segunda zona de decaimento de massa obtidos por análise termogravimétrica (TG).

Amostra	Primeira zona de decaimento			Segunda zona de decaimento		
	T inicial (°C)	T final (°C)	% de massa degradada	T inicial (°C)	T final (°C)	% de massa degradada
E123	116,8	200,4	67,8%	339,0	406,0	18,2%
E231	115,6	195,6	60,2%	341,7	410,2	23,8%
E312	109,6	195,5	77,6%	332,6	370,8	3,2%
A111	99,4	198,7	71,4%	292,0	395,9	19,0%
A222	99,6	198,1	45,5%	316,4	418,6	43,2%
A333	109,3	199,0	28,8%	327,4	424,1	49,3%
D132	118,6	201,0	52,8%	343,2	431,4	33,0%
D213	119,9	200,4	69,7%	342,3	400,8	13,3%
D321	117,0	204,6	72,6%	342,3	403,6	10,9%
S-etanol	109,7	197,7	5,0%	322,2	445,6	87,5%
S-hexano	111,4	194,1	15,1%	336,2	437,0	77,4%
Óleo de Soja	-	-	-	291,5	445,5	96,2%
Cumarina	91,1	202,0	98,2%	-	-	-

Os dados obtidos apresentam a faixa de degradação da cumarina, que se encontra entre 91°C e 202°C, e do óleo de soja (triglicerídeos) entre 290°C e 450°C. Estes valores indicam que as temperaturas até 90°C não possuem relevantes degradações das substâncias de interesse. Portanto, as temperaturas utilizadas nas extrações foram seguras.

De acordo com a análise termogravimétrica da cumarina e do óleo de soja, a primeira zona de decaimento de massa das amostras é referente, principalmente, à degradação da cumarina, e a segunda zona de decaimento é referente à degradação de triglicerídeos. Assim, nota-se que a amostra que apresenta maior

concentração de cumarina em relação à concentração de triglicerídeos é a E123, visto que a primeira zona de decaimento é muito superior à segunda. Já a amostra S-etanol apresenta a menor perda na primeira zona de decaimento, e isso indica que esta amostra apresentou menor concentração de cumarina em relação à concentração de triglicerídeos. Estes dois casos podem ser confirmados na Figura 15.

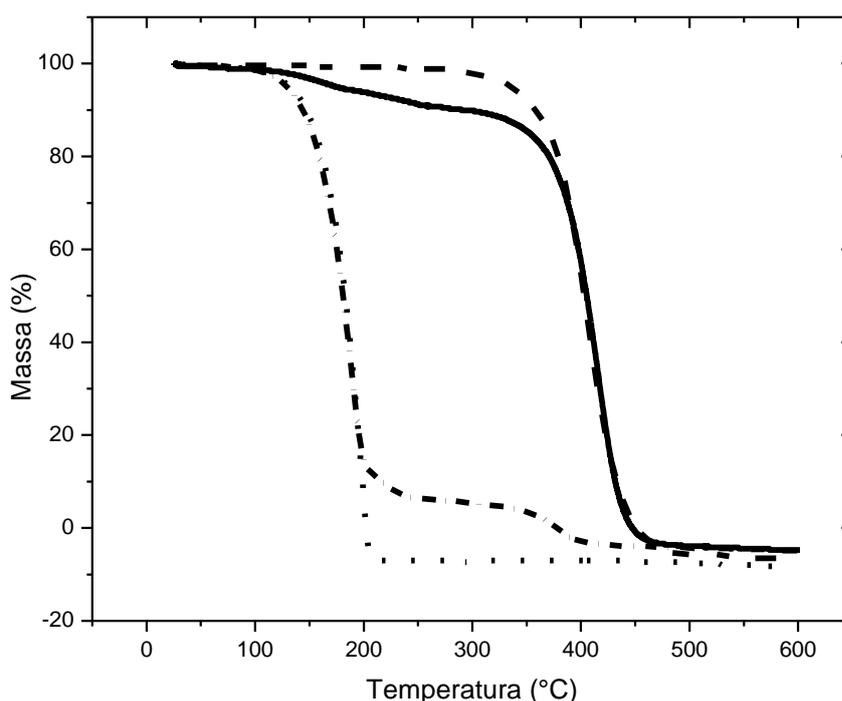


Figura 15: Análise Termogravimétrica Cumarina Padrão, Óleo de Soja e Amostras E312 e S_Etanol. (— Óleo de Soja; — S_Etanol; — E312;Padrão de cumarina).

Além da degradação dos componentes majoritários, há a degradação de outras substâncias, como os ácidos graxos livres. Dentre eles, o ácido oleico, que apresenta temperatura de degradação entre 210°C e 220°C (ÇAYLI; KÜSEFOĞLU, 2008) e queda de massa próxima à zona de decaimento da cumarina. Neste sentido, há também outras zonas de degradação, embora a quantidade seja inferior, e isso faz com que este método não seja definitivamente qualitativo e quantitativo, mas apenas forneça informações complementares importantes.

Os demais gráficos obtidos pela análise termogravimétrica encontram-se no Anexo I deste trabalho e, assim como o gráfico anterior, sugerem que as extrações

via fluido pressurizado obtiveram amostras mais ricas em cumarina, visto que apresentam a primeira zona de decaimento (referente à cumarina) superior à segunda zona de decaimento (referente aos triglicerídeos).

Já a amostra obtida via Soxhlet com a utilização de hexano como solvente apresentou a segunda zona de decaimento superior à primeira, sendo assim, provavelmente apresente uma menor concentração de cumarina em relação aos triglicerídeos.

4.6 Teores de Cumarina analisados por meio de Cromatografia Líquida

As áreas dos picos do padrão de cumarina foram utilizadas na construção da curva de calibração disposta na Figura 16.

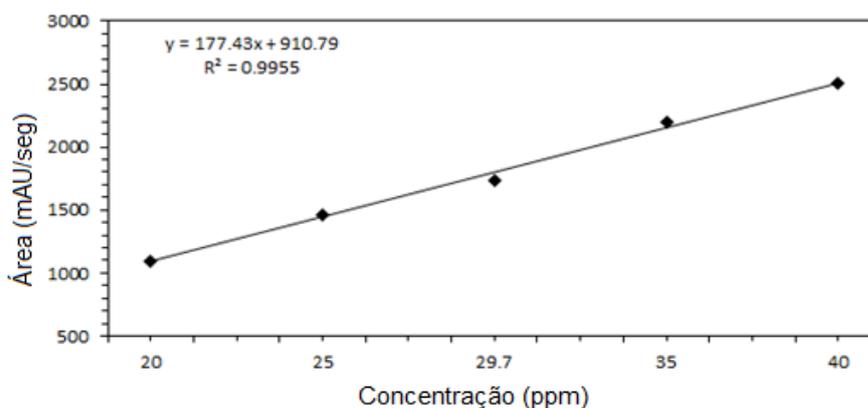


Figura 16: Curva de calibração da Cumarina.

O coeficiente de determinação (R^2) mostra bom ajuste da equação da reta em relação aos pontos referentes às áreas dos picos da cumarina, pela qual é possível finalmente calcular a concentração da mesma nas amostras. Os valores calculados estão dispostos na Tabela 11.

A condição mais seletiva em relação à cumarina mediante ao extrato obtido se deu ao utilizar menor pressão (180 bar), maior temperatura (80°C) e 3% de etanol como co-solvente. Porém, também apresentou o menor rendimento em termos de extrato total: 2,14% da matriz sólida, conforme a Tabela 7, devido à menor extração de subprodutos. A utilização de menor pressão aumenta a seletividade do composto alvo, visto que o aumento da densidade pode aumentar a solubilidade de

componentes secundários (LEMOS et al., 2012). Ao utilizar 3% de etanol como co-solvente foi possível notar o aumento da solubilidade da cumarina.

Tabela 11: Concentração de cumarina nas Extrações por fluido pressurizado e Soxhlet.

Amostra	Cumarina/ extrato (g/100g)	Cumarina/ semente (g/100g)
E123	11,55	0,55
E231	8,17	0,26
E312	20,92	0,44
A111	7,19	0,26
A222	5,27	0,12
A333	2,07	0,09
D132	3,96	0,20
D213	11,75	0,36
D321	13,10	0,34
S_etanol	0,51	0,30
S_hexano	1,43	0,35

Por outro lado, a utilização de maior quantidade de co-solvente (5%) pode resultar em um maior arraste do componente alvo, como aconteceu na condição E123, a qual obteve maior quantidade de cumarina em relação à quantidade de semente utilizada para a extração. No entanto, resultou também no arraste de outros componentes, o que diminuiu a seletividade da cumarina no extrato total. Isso justifica um rendimento elevado em termos de extrato total igual a 4,61% da matriz sólida.

Os teores de cumarina obtidos nas extrações com fluidos pressurizados foram analisados estatisticamente. Por sua vez, os níveis das extrações definidos como ótimos para obterem melhor recuperação de cumarina foram: 60°C, 180 bar e 5% de etanol, com concentração estimada a partir do software Statistica de 0,56g de cumarina em 100g de semente.

A variável que apresentou maior significância foi devido ao tipo de co-solvente utilizado, seguida da pressão. As variáveis temperatura e quantidade de co-solvente apresentaram influência inferior, mas também foram significativas.

As análises por cromatografia líquida confirmam as hipóteses levantadas nas análises termogravimétricas em relação à seletividade da cumarina em comparação

aos subprodutos extraídos, sendo a amostra E312 mais seletiva que o componente alvo e a S-etanol menos seletiva.

As extrações de cumarina realizadas por Oliveira et al. (2013) por meio da utilização de dióxido de carbono supercrítico a partir de duas espécies da folha de guaco apresentaram resultados inferiores aos obtidos neste trabalho. A espécie *Mikania laevigata* obteve menor concentração de cumarina igual a 0,10 (g x 100 g⁻¹) ao utilizar como variáveis na extração a temperatura de 45°C e a pressão de 83 bar, e a maior concentração igual a 0,41 (g x 100 g⁻¹), no uso de 55°C e 240 bar. Já as extrações a partir da espécie *Mikania glomerata* apresentaram valores de cumarina ainda menores, sendo a concentração inferior/igual a 4,41x10⁻⁵ (g x 100 g⁻¹) ao utilizar condições de extração com temperatura de 55°C e pressão de 110 bar, e maior concentração igual a 2,10x10⁻⁴ (g x 100 g⁻¹) sob temperatura também de 55°C e pressão igual a 240 bar. Todas as extrações foram conduzidas durante duas horas. Esta diferença entre os resultados pode estar relacionada aos tipos das espécies e também às condições escolhidas para condução dos experimentos.

4.7 Perfil de Ácidos Graxos Livres

Na Tabela 12 está disposta a determinação do perfil de ácidos graxos livres para cada amostra obtida via dióxido de carbono supercrítico com adição de co-solventes, e via Soxhlet com a utilização de solventes orgânicos.

Os resultados demonstram que a partir das extrações com o uso de dióxido de carbono podem-se obter resultados com maiores números de compostos livres de glicerol.

Tabela 12: Normalização dos ácidos graxos livres.

Ácidos (%)	E123	E231	E312	A111	A222	A333	D132	D213	D321	S etanol	S hexano
Láurico	n.d.										
Mirístico	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,0	0,3
Palmitoleico	n.d.										
Palmitico	11,1	12,1	13,4	12,1	12,7	12,1	11,8	11,9	12,6	11,5	12,3
Linoleico	20,5	22,3	23,0	22,1	22,8	22,8	21,8	22,3	22,5	20,8	21,0
Oleico	61,7	57,9	54,6	58,2	55,7	56,0	58,6	58,3	56,8	59,8	58,8
Esteárico	6,6	7,5	8,7	7,5	8,5	8,9	7,7	7,4	7,9	7,9	7,6

Acidez Total (g/100g de extrato)	3,4	5,5	12,3	3,7	4,9	6,3	5,7	3,8	4,3	2,6	1,4
-------------------------------------	-----	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Os altos teores de ácidos graxos monoinsaturados trazem benefícios à saúde, principalmente o ácido oleico (ômega 9), que prevaleceu em todas as condições de extração a partir da semente de cumaru. Em seguida aparece o ácido linoleico (ômega 6), que é poliinsaturado e desejável em concentrações menores que dos ácidos monoinsaturados (GODOY; OLIVEIRA; CARVALHO, 2005).

A amostra que apresentou maior acidez foi a E312, com 12,3%, seguida da amostra A333, com 6,3% de acidez. Ambas foram extraídas com elevada temperatura, a qual mostrou que esta variável apresenta influência em relação à obtenção de extratos com maior acidez, devido à quebra da ligação entre o glicerol e o ácido graxo.

A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Desta forma, os óleos vegetais que apresentam um elevado teor de ácidos graxos livres são considerados ranços. De acordo com Ajayi et al. (2006), o limite máximo desejável de ácidos graxos livres presente em óleo é de 5%. Algumas amostras apresentam concentração além de 5%, como é o caso da E312, A333, D132 e E231, que devem ser armazenadas por um tempo inferior e com maiores atenções. Outros extratos apresentaram níveis de AGL abaixo deste percentual, os quais indicam que os óleos poderiam ser armazenados por um longo tempo sem deterioração via ranço oxidativo.

4.8 Perfil de Ácidos Graxos Totais

Todas as amostras obtidas por extração convencional e em altas pressões foram analisadas por meio de cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chamas, conforme metodologia descrita no capítulo 3.6.4.

O cromatograma da Amostra A111 está representado na Figura 17, juntamente com os padrões. Os demais cromatogramas são similares a estes, visto que não há grande diferença na apresentação dos ácidos graxos totais para cada condição de extração.

A partir da análise deste perfil cromatográfico é possível perceber que os compostos majoritários estão representados pelos picos 4, 6 e 8.

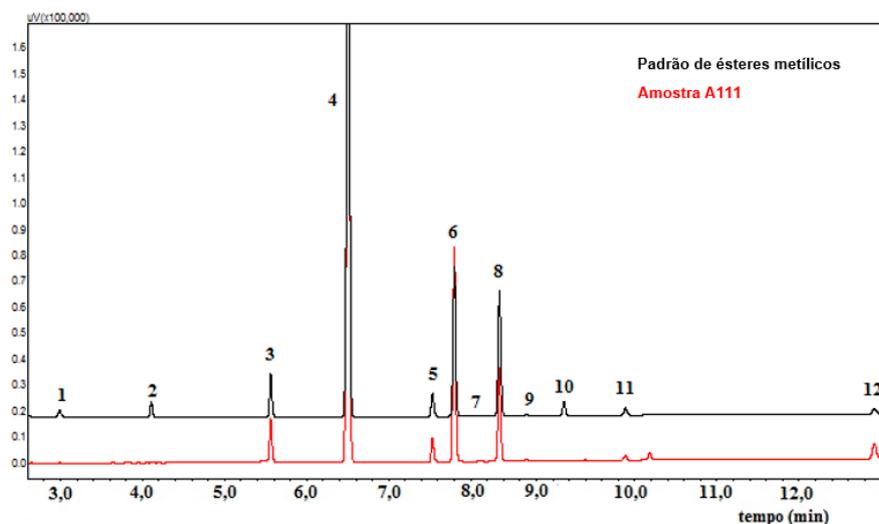


Figura 17: Cromatograma expandido de ésteres metílicos.

A partir da Tabela 13 é possível identificar os ácidos graxos em forma de ésteres metílicos contidos no perfil cromatográfico da Figura 17.

Tabela 13: Padrões utilizados na quantificação de ésteres metílicos via GC-FID.

Picos	TR (min)	Esteres metílicos
1	2.992	Laurato de metila
2	4.107	Miristato de metila
3	5.564	Palmitato de metila
4	6.514	Heptadecanoato de Metila (PI)
5	7.538	Estearato de Metila
6	7.807	Oleato de Metila
7	8.156	Elaidato de Metila
8	8.356	Linoleato de Metila
9	8.673	Linolelaidato de Metila
10	9.139	Linolenato de Metila
11	9.886	Araquidato de Metila
12	12.92	Behenato de Metila

Por meio do Tempo de Retenção (TR) foi possível identificar os ésteres contidos na amostra.

Diferente dos ácidos graxos livres, as condições de extração (temperatura, pressão, solvente orgânico e quantidade de solvente orgânico) não são muito influentes na extração de ácidos graxos totais, o que resulta em teores aproximados em todas as extrações realizadas. Este fato foi notado igualmente na extração do óleo de semente de canola (PEDERSSETTI et al., 2011), do óleo de semente de girassol (NIMET et al., 2011) e do óleo da semente de mucuna (GARCIA et al., 2012).

Por fim, na Tabela 14 estão dispostos os perfis de ácidos graxos totais presentes nos extratos obtidos a partir da semente de cumaru. A quantidade de cada ácido está disposta em relação à quantidade total de ácidos contida na amostra.

Tabela 14: Normalização de Ácidos Graxos Totais.

Ácidos (%)	E 123	E231	E312	A111	A222	A333	D132	D213	D321	S. Etanol	S. Hexano
Láurico	n.d.										
Mirístico	n.d.										
Palmitico	10.9	11.7	12.9	11.8	11.5	11.3	10.4	15.3	16.0	10.8	10.4
Esteárico	7.0	7.1	7.4	7.2	7.3	7.1	6.7	6.6	6.8	7.0	7.5
Oleico	41.2	41.2	34.5	42.8	42.5	42.4	41.4	36.5	37.2	44.3	39.7
Elaídico	n.d.										
Linoleico	32.1	31.1	39.0	29.1	29.2	30.7	32.2	33.4	32.2	25.5	27.3
Linolelaídico	n.d.										
Linolenico	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0
Araquídico	1.6	1.6	1.3	1.7	1.7	1.6	1.6	1.4	1.5	1.8	2.0
Behênico	7.3	7.3	4.9	7.4	7.7	6.7	7.6	6.8	6.3	10.5	13.0
Saturados	25,1	26,1	25,2	26,2	26,4	25,1	24,6	28,8	29,1	28,3	31,0
Insaturados	74,8	73,9	74,7	73,7	73,5	75,0	75,3	71,2	70,8	71,6	69,0
O/L*	1,3	1,3	0,9	1,5	1,5	1,5	1,3	1,1	1,2	1,7	1,5

*O/L: Ácido oleico / ácido linoleico.

O extrato da semente de cumaru é composto majoritariamente por ácidos graxos insaturados, entre eles prevalece o ácido oleico (37,2% - 44,3%), seguido do ácido linoleico (25,5% a 39,0%). Os dois compostos estão dentre os ácidos graxos insaturados mais importantes. Os ácidos graxos insaturados são ditos essenciais,

visto que não são sintetizados no organismo humano (NELSON, 2011) e variaram entre 69% e 75,3% nos extratos.

A relação de oleico/linoleico é um indicador de estabilidade do óleo que avalia a tendência auto-oxidativa (LÓPEZ et al., 2001). Além disso, a alta concentração de ácido oleico tem sido preferencial por esta apresentar benefícios à saúde referente à diminuição da pressão sanguínea (CHAMBERLIN et al., 2014). Nas extrações a partir da semente de cumaru, esta relação variou entre 0,9% (E312) e 1,7% (S_etanol), valores inferiores aos relatados por Cerretani et al. (2011). As taxas insaturados/saturados (taxa da soma dos ácidos graxos insaturados pela soma dos ácidos graxos saturados) apresentaram valores baixos e uma variação entre 2,23 e 3,05, o que indica longo tempo de prateleira (BERNARDO-GIL et al., 2009).

4.9 Análise de citotoxicidade e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

No teste de citotoxicidade, a concentração citotóxica contra 50% das células VERO, que são células consideradas saudáveis, variou entre 213 e 267 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já para as células tumorais, a concentração variou entre 227,7 e 281,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para que houvesse um índice de seletividade adequado, a concentração citotóxica para células tumorais deveria ser menor do que a concentração citotóxica contra as células VERO.

No teste para avaliar a concentração inibitória mínima, ou seja, qual a menor concentração necessária da droga para inibir os fungos ou bactérias, as bactérias foram mais resistentes que os fungos. Entre os fungos testados, a *C. albicans* apresentou menor sensibilidade à droga do que a *C. tropicalis* e a *C. parapsilosis*. Na maior concentração testada (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi encontrada a concentração inibitória para estas duas leveduras, diferente da *C. albicans* e das bactérias testadas. Ou seja, foi necessária uma grande quantidade da droga para inibir as duas espécies de fungos. Conclui-se que a ação do extrato de cumaru como antimicrobiano não é adequada.

CONCLUSÃO

No presente trabalho foram obtidos dados inéditos de transição de fases para o sistema CO₂ + cumarina, ao utilizar o método sintético visual em uma célula de volume variável.

O comportamento de fases do sistema se mostrou complexo, visto que apresentou diversos tipos de transição, sendo eles: sólido-fluido, sólido-líquido-vapor, sólido-fluido-fluido, fluido-fluido e líquido-vapor. Estes dados foram adequadamente calculados por meio da equação de Peng-Robinson, com regra de mistura de Van der Waals, com dois parâmetros independentes da temperatura.

Os dados reportados a respeito da solubilidade da cumarina em CO₂ supercrítico foram obtidos por metodologia diferente da utilizada neste estudo (HAE CHOI et al., 1998; RODRIGUES et al., 2008). Nestes trabalhos, o estudo da solubilidade foi feito por método de fluxo contínuo, e isso impediu a visualização da formação de fases apresentada neste trabalho.

Nas extrações a partir da semente de cumaru, os rendimentos globais variaram entre 2,14% e 5,29% nas extrações com fluido pressurizado, e no método clássico de extração obtiveram rendimentos de 19,13% e 46,50%. Além da grande diferença nos rendimentos obtidos, as características dos produtos foram bem divergentes. Prevaleceu o estado sólido nos extratos obtidos via EFS, e em forma líquida e com coloração amarela nas extrações convencionais. Embora a quantidade de extrato obtida via solventes orgânicos tenha sido superior às obtidas via EFS, após as análises por HPLC foi possível notar que a quantidade de cumarina conseguida a partir da utilização de CO₂ foi superior aos solventes orgânicos, principalmente ao utilizar as seguintes condições de extração: 3% de etanol como co-solvente, 80°C e 180 bar, condições estas que tornaram a extração mais seletiva em relação ao componente alvo, a cumarina.

A partir das análises termogravimétricas foi possível constatar que as temperaturas entre 60°C e 80°C não provocaram degradação da cumarina e dos ácidos graxos presentes nos extratos da semente de cumaru.

O modelo matemático proposto para descrever a extração supercrítica foi capaz de reproduzir as curvas de extração com boa concordância com os dados

experimentais obtidas na EFS. Com isso, pode ser utilizado no projeto e na otimização de uma unidade de extração de compostos bioativos da semente de cumaru em escala industrial.

A extração com fluidos pressurizados por meio dos co-solventes mostra-se eficiente na extração de cumarina a partir da semente de *Dipteryx odorata*. A condição ótima avaliada foi com 5% de etanol, 60°C e 180 bar, a qual é viável também economicamente, visto que o solvente é de fácil acesso e a temperatura e a pressão são as mais amenas dentre as estudadas, o que resultou em menores gastos de energia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHANGARI, B.; SARGOLZAEI, J. Extraction of Pomegranate Seed Oil Using Subcritical Propane and Supercritical Carbon Dioxide 1. v. 46, n. 3, p. 258–265, 2012.
- AJAYI, I.A., ODERINDE, R.A., KAJOGBOLA, D.O., UPONI, J.I. Oil content and fatty acid composition of some underutilized legumes from Nigeria. *Food Chemistry*, v. 99, n. 1, p. 115–120, jan. 2006.
- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The Leguminosae**. [s.l: s.n.]. v. 62, 1981.
- ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; DE REUCK, K.M., **International Thermodynamic Tables of the Fluid State - 3 Carbon Dioxide**, Pergamon, New York, 1976
- ANSARI, K.; GOODARZANIA, I. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using Taguchi methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 67, p. 123–130, jul. 2012.
- BAMBERGER, A.; SIEDER, G.; MAURER, G. High-pressure (vapor + liquid) equilibrium in binary mixtures of (carbon dioxide + water or acetic acid) at temperatures from 313 to 353 K. v. 17, p. 97–110, 2000.
- BENELLI, P., RIEHL, C.A.S., JR, A.S., SMÂNIA, E.F.A., FERREIRA, S.R.S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 55, n. 1, p. 132–141, nov. 2010.
- BERNARDO-GIL, M.G., CASQUILHO, M., ESQUÍVEL, M.M., RIBEIRO, M.A. Supercritical fluid extraction of fig leaf gourd seeds oil: Fatty acids composition and extraction kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, n. 1, p. 32–36, maio 2009.
- BOTT, M. B. K. T. R. **Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents**. [s.l.] Springer Netherlands, 1993.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21–33, mar. 2005.
- CARRIER, M., LOPPINET-SERANI, A., DENUX, D., LASNIER, J.-M., HAMPICHAVANT, F., CANSELL, F., AYMONIER, C. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 1, p. 298–307, jan. 2011.
- CARVALHO, P. E. R. **Cumaru-Ferro *Dipteryx odorata***. Brasília: [s.n.].

CASAS, L., MANTELL, C., RODRÍGUEZ, M., TORRES, A., MACÍAS, F.A., MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. Extraction of natural compounds with biological activity from sunflower leaves using supercritical carbon dioxide. v. 152, p. 301–306, 2009.

CAVERO, S., GARCÍA-RISCO, M.R., MARÍN, F.R., JAIME, L., SANTOYO, S., SEÑORÁNS, F.J., REGLERO, G., IBAÑES, E. Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano Chemical and functional characterization via LC – MS and in vitro assays. v. 38, p. 62–69, 2006.

ÇAYLI, G.; KÜSEFOĞLU, S. Increased yields in biodiesel production from used cooking oils by a two step process: Comparison with one step process by using TGA. **Fuel Processing Technology**, v. 89, n. 2, p. 118–122, fev. 2008.

CERRETANI, L., MAGGIO, R.M., BARNABA, C., TOSCHI, T.G., CHIAVARO, E. Application of partial least square regression to differential scanning calorimetry data for fatty acid quantitation in olive oil. *Food Chemistry*, v. 127, n. 4, p. 1899–1904, ago. 2011.

CHAMBERLIN, K.D., BARKLEY, N. A., TILLMAN, B.L., DILLWITH, J.W., MADDEN, R., PAYTON, M.E., BENNETT, R.S. A comparison of methods used to determine the oleic/linoleic acid ratio in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Agricultural Sciences*, v. 05, n. 03, p. 227–237, 2014.

CHANG, H.; MORRELL, D. G. Solubilities of methoxy-1-tetralone and methyl nitrobenzoate isomers and their mixtures in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 30, n. 1, p. 74–78, jan. 1985.

CHEAH, E. L. C.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Optimization of supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of active principles from *Magnolia officinalis* using the Taguchi design. **Separation and Purification Technology**, v. 71, n. 3, p. 293–301, 10 mar. 2010.

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. [s.l: s.n.]. vol 2. 1975.

DANH, L.T., MAMMUCARI, R., TRUONG, P., FOSTER, N. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. v. 155, p. 617–626, 2009.

DESAI, M. A.; PARIKH, J. Hydrotropic Extraction of Citral from *Cymbopogon flexuosus*(Steud.) Wats. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 9, p. 3750–3757, 7 mar. 2012.

DIAS, N., NICOLAU, A, CARVALHO, G.S., MOTA, M., LIMA, N. Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *Journal of basic microbiology*, v. 39, n. 2, p. 103–8, jan. 1999.

DOHRN, R.; PEPPER, S.; FONSECA, J. M. S. Fluid Phase Equilibria High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (2000 – 2004). v. 288, p. 1–54, 2010.

ELDER, T.; KUSH, J. S.; HERMANN, S. M. Thermogravimetric analysis of forest understory grasses. **Thermochimica Acta**, v. 512, n. 1-2, p. 170–177, jan. 2011.

FAVARETO, R. **Equilíbrio de fases de progesterona em gases comprimidos**. [s.l: s.n.], 2006.

FAVARETO, R., PEREIRA, J.R.D., SANTANA, C.C., MADUREIRA, E.H., CABRAL, V.F., TAVARES, F.W., CARDOZO-FILHO, L. High-pressure phase diagram of the drug mitotane in compressed and / or supercritical CO₂. The Journal of Chemical Thermodynamics, v. 42, n. 2, p. 286–290, 2010.

FONSECA, J.; SIMOES, P. C.; NUNES, M. An apparatus for high-pressure VLE measurements using a static mixer . Results for (CO₂ + limonene + citral) and (CO₂ + limonene + linalool). v. 25, p. 7–17, 2003.

FRANCESCHI, E., GRINGS, M.B., FRIZZO, C.D., OLIVEIRA, J.V., DARIVA, C. Phase behavior of lemon and bergamot peel oils in supercritical CO₂. Fluid Phase Equilibria, v. 226, p. 1–8, dez. 2004.

FREITAS, L. DOS S. **Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos**. [s.l: s.n.].

GARCIA, V.A.D.S., CABRAL, V.F., CABRAL, E.F., ZANOELO, CAMILA DA SILVA, L.C.F. Extraction of Mucuna seed oil using supercritical carbon dioxide to increase the concentration of L-Dopa in the defatted meal. The Journal of Supercritical Fluids, v. 69, p. 75–81, set. 2012.

GIUFRIDA, W. M. **Determinação do Comportamento de Fases a Altas Pressões dos Sistemas CO₂ + Solvente Orgânico + Curcumina**. [s.l: s.n.], 2010.

GIUFRIDA, W.M., RODRIGUEZ-REARTES, S.B., ALONSO, C.G., ZABALOY, M.S., CABRAL, V.F., TAVARES, F.W., CARDOZO-FILHO, L. High-Pressure Experimental Data of CO₂ + Mitotane and CO₂ + Ethanol + Mitotane Mixtures. Journal of Chemical & Engineering Data, v. 56, n. 12, p. 4333–4341, 8 dez. 2011.

GODOY, I. J. DE; OLIVEIRA, E. J. DE; CARVALHO, C. R. L. **ANÁLISE DE POPULAÇÕES SEGREGANTES DE AMENDOIM PARA A CARACTERÍSTICA “ALTO OLÉICO”** Varginhas: 2005

GONÇALVES, R.M., LEMOS, C.O.T., LEAL, I.C.R., NAKAMURA, C.V., CORTEZ, D.A.G., DA SILVA, E.A., CABRAL, V.F., CARDOZO-FILHO, L. Comparing conventional and supercritical extraction of (-)-mammea A/BB and the antioxidant

activity of *Calophyllum brasiliense* extracts. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 18, n. 6, p. 6215–29, jan. 2013.

GRÖTZ, K.A., WÜSTENBERG, P., KOHNEN, R., ZEPELIN, H.H. Prophylaxis of radiogenic sialadenitis and mucositis by coumarin / troxerutine in patients with head and neck cancer – a prospective , randomized , placebo-controlled , double-blind study. n. 39, p. 34–39, 2001.

HAE CHOI, Y., KIM, J., JEONG NOH, M., SUN CHOI, E., YOO, K.-P. Effect of functional groups on the solubilities of coumarin derivatives in supercritical carbon dioxide. *Chromatographia*, v. 47, n. 1-2, p. 93–97, jan. 1998.

HARTMAN, L. AND LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 8, p. 475–476, 1973.

JANG, D.S., PARK, E.J., HAWTHORNE, M.E., VIGO, J.S., GRAHAM, J.G., CABIESES, F., SANTARSIERO, B.D., MESECAR, A.D., FONG, H.H.S., MEHTA, R.G., PEZZUTO, J.M., KINGHORN, A.D. Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Seeds of. v. 66, n. 5, p. 3–7, 2003.

KING, M. B.; BOTT, T. R. **Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents**. [s.l: s.n.]. v. 62

KITZBERGER, C.S.G., JR., A.S., PEDROSA, R.C., FERREIRA, S.R.S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. v. 80, p. 631–638, 2007.

LACY, A.; KENNEDY, R. O. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. p. 3797–3811, 2004.

LAMEIRA, C. P.; COELHO, G. L. V.; MOTHÉ, C. G. Extração De Lipídeos Da Amêndoa De Castanha De Caju Com Co2 Supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 4, 1997.

LEAL, L.K., FERREIRA, A A, BEZERRA, G. A, MATOS, F.J., VIANA, G.S. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal of ethnopharmacology*, v. 70, n. 2, p. 151–9, maio 2000.

LEMONS, C.O.T., GARCIA, V.A.D.S., GONÇALVES, R.M., LEAL, I.C.R., SIQUEIRA, V.L.D., FILHO, L.C., CABRAL, V.F. Supercritical extraction of neolignans from *Piper regnelli* var. *pallescens*. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 71, p. 64–70, nov. 2012.

LIN, M.; TSAI, M.; WEN, K. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae Radix* 1. v. 830, n. July 1998, p. 387–395, 1999.

LIU, B., SHEN, B., GUO, F., CHANG, Y. Optimization of supercritical fluid extraction of dl-tetrahydropalmatine from rhizome of *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang with orthogonal array design. *Separation and Purification Technology*, v. 64, n. 2, p. 242–246, dez. 2008.

LÓPEZ, Y., SMITH, O.D., SENSEMAN, S.A., ROONEY, W.L. Genetic Factors Influencing High Oleic Acid Content in Spanish Market-Type Peanut Cultivars. *Crop Science*, p. 51–56, 2001.

LÓPEZ-SEBASTIÁN, S., RAMOS, E., IBÁÑEZ, E., BUENO, J.M., BALLESTER, L., TABERA, J., REGLERO, G. Dearomatization of Antioxidant Rosemary Extracts by Treatment with Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 46, n. 1, p. 13–19, 19 jan. 1998.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D., SERRANO, C.M., RODRÍGUEZ, M.R., MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. Kinetics of the supercritical fluid extraction of carotenoids from microalgae with CO₂ and ethanol as cosolvent. v. 150, p. 104–113, 2009.

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

MARTÍNEZ, J., MONTEIRO, A.R., ROSA, P.T. V., MARQUES, M.O.M., MEIRELES, M.A.A. Multicomponent Model To Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide. p. 1057–1063, 2003.

MCHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. **Supercritical fluid extraction: principles and practice**. Boston: [s.n.].

MCHUGH, M.; PAULAITIS, M. E. Solid solubilities of naphthalene and biphenyl in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 25, n. 4, p. 326–329, out. 1980.

MEIRELES, M. **Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications**. [s.l: s.n.], v. 62

MEIRELES, M. A. A. **Extracting Bioactive Compounds for Food Products - Theory and Applications**, 2009.

MIRANDA, J. A. **Caracterização Fotofísica de Derivados de Cumarinas**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2001.

MITRA, P.; BARMAN, P. C.; CHANG, K. S. Coumarin Extraction from *Cuscuta reflexa* using Supercritical Fluid Carbon Dioxide and Development of an Artificial Neural Network Model to Predict the Coumarin Yield. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 737–744, 3 mar. 2009.

MOHLER, J.L., WILLIAMS, B.T., THOMPSON, I.M., MARSHALL, M.E. Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, v. 120 Suppl, p. S35–8, jan. 1994.

MORETTO, E. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: [s.n.].

NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5°. ed. Porto Alegre: [s.n.]. p. 1273

NIMET, G. **AVALIAÇÃO DOS SOLVENTES DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E PROPANO SUBCRÍTICO NA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE GIRASSOL**. [s.l: s.n.].

NIMET, G., DA SILVA, E.A., PALÚ, F., DARIVA, C., FREITAS, L.D.S., NETO, A.M., FILHO, L.C. Extraction of sunflower (*Heliantus annuus* L.) oil with supercritical CO₂ and subcritical propane: Experimental and modeling. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 1, p. 262–268, mar. 2011.

OLIVEIRA, A.L., POZZA, L.N.L., SANTOS, D.N., KAMIMURA, E.S., VICENTE, E., CABRAL, F.A. Supercritical extraction of coumarin from guaco (*Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*) for pharmaceutical applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 83, p. 65–71, nov. 2013.

OLIVEIRA, E. L. G.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Review of kinetic models for supercritical fluid extraction. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 7, p. 1104–1117, jul. 2011.

OLIVEROS-BASTIDAS, A. D. J.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. DE A. Chemical Characterization by GC-MS and Phytotoxic Potential of non-polar and polar fractions of seeds of *Dipteryx odorata* (Aubl.) Wild. from Venezuelan regions. v. 36, n. 4, p. 502–506, 2013.

PEDERSSETTI, M.M., PALÚ, F., DA SILVA, E.A., ROHLING, J.H., CARDOZO-FILHO, L., DARIVA, C. Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 2, p. 189–196, jan. 2011.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 3 out. 2010.

PINTO, L.F., RODRIGUEZ-REARTES, S.B., CORAZZA, M.L., CABRAL, V.F., DE ARAÚJO, P.H.H., MADUREIRA, E.H., ZABALOY, M.S., CARDOZO-FILHO, L. Phase behavior of carbon dioxide+medroxyprogesterone acetate system at high pressures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 349, p. 1–11, jul. 2013.

POLING, B. E.; PRAUSNITZ, J. M.; O'CONNELL, J. P. **THE PROPERTIES OF GASES AND LIQUIDS**. 5^a. ed. [s.l: s.n.]. p. 768

RAVENTOS, M.; DUARTE, S.; ALARCON, R. Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 5, p. 269–284, 1 out. 2002.

REBOLLEDA, S., BELTRÁN, S., SANZ, M.T., GONZÁLEZ-SANJOSE, M.L., SOLAESA, Á.G. Extraction of alkylresorcinols from wheat bran with supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 814–821, dez. 2013.

RIBAS, M.C., MANTOVANI, D., AWADALLAK, J.A., CANEVESI, R.L., TAZINAFO, N.M., FILHO, L.C., PALÚ, F., SILVA, E.A. DA. Study of candeia oil extraction using pressurized fluids and purification by adsorption process. **The Journal of Supercritical Fluids**, maio 2014.

RODRIGUES, R.F., TASHIMA, A.K., PEREIRA, R.M.S., MOHAMED, R.S., CABRAL, F. Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 3, p. 375–382, jan. 2008.

ROY, R. K. **Design of experiments using the Taguchi approach: 16 steps to product and process improvement**. [s.l: s.n.].

SALIM, V. A. **Desenvolvimento de uma metodologia usando a termogravimetria para a avaliação da retenção de CO₂ em substrato sólido**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2005.

SANTANA, Á. L. DE. **Determinação de Parâmetros de Transferência de Massa do Processo de Extração Supercrítica**. [s.l: s.n.].

SANTOS, J. C., MAZZER, H.R., MACHADO, G.D., ANDREAUS, J., CABRAL, V.F., ZABALOY, M.S., CARDOZO-FILHO, L. High-pressure phase behaviour of the system (CO₂+C.I. Disperse Orange 30 dye). **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 48, p. 284–290, maio 2012.

SANTOS, W. J. **Extração de Compostos Antioxidantes da Folha de Mangueira (*Mangifera Indica* L.) Utilizando CO₂ Supercrítico, Água e Etanol**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2013.

SANTOS, O.V., CORRÊA, N.C.F., SOARES, F.A.S.M., GIOIELLI, L.A., COSTA, C.E.F., LANNES, S.C.S. Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 253–258, jul. 2012.

SHADANGI, K. P.; MOHANTY, K. Kinetic study and thermal analysis of the pyrolysis of non-edible oilseed powders by thermogravimetric and differential scanning calorimetric analysis. **Renewable Energy**, v. 63, p. 337–344, mar. 2014.

SIHVONEN, M., JARVENPA, E., HIETANIEMI, V., HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. v. 10, p. 217–222, 1999.

SIQUEIRA, C., ANDRÉO, R., REGASINI, L.O., SIQUEIRA, D.H., MARIA, R., CICALI, B. Avaliação da Atividade Biológica de Extratos de *Pterogyne nitens* em *Trypanossoma cruzi* e em Macrófagos. p. 2753–2756, 2003.

SOUZA, A.T. DE, BENAZZI, T.L., GRINGS, M.B., CABRAL, V., ANTÔNIO DA SILVA, E., CARDOZO-FILHO, L., ANTUNES, O.A.C. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 182–187, dez. 2008.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—II. Extraction of grape oil. v. 49, 1994.

SULLIVAN, G. Occurrence of Umbelliferone in the Seeds of *Dipteryx odorata* (Aubl .) Willd . **J. Agric. Food Chem.**, n. 30, p. 609–610, 1982.

THORNES, R.D., DALY, L., LYNCH, G., BRESLIN, B., BROWNE, H., BROWNE, H.Y., CORRIGAN, T., DALY, P., EDWARDS, G., GAFFNEY, E., HENLEY, J., HEALY, T., KEANE, F., LENNON, F., MCMURRAY, N., LOUGHLIN, S.O., SHINE, M., TANNER, A. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. v. 120, p. 32–34, 1994.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. v. 2013, n. Table 1, 2013.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras. Identificação e Quantificação.** 2^a. ed. Maringá: [s.n.]. p. 122

ZÚÑIGA-MORENO, A.; GALICIA-LUNA, L. A.; CAMACHO-CAMACHO, L. E. Measurements of solid solubilities and volumetric properties of naphthalene+carbon dioxide mixtures with a new assembly taking advantage of a vibrating tube densitometer. **Fluid Phase Equilibria**, v. 234, n. 1-2, p. 151–163, jul. 2005.

ANEXO I

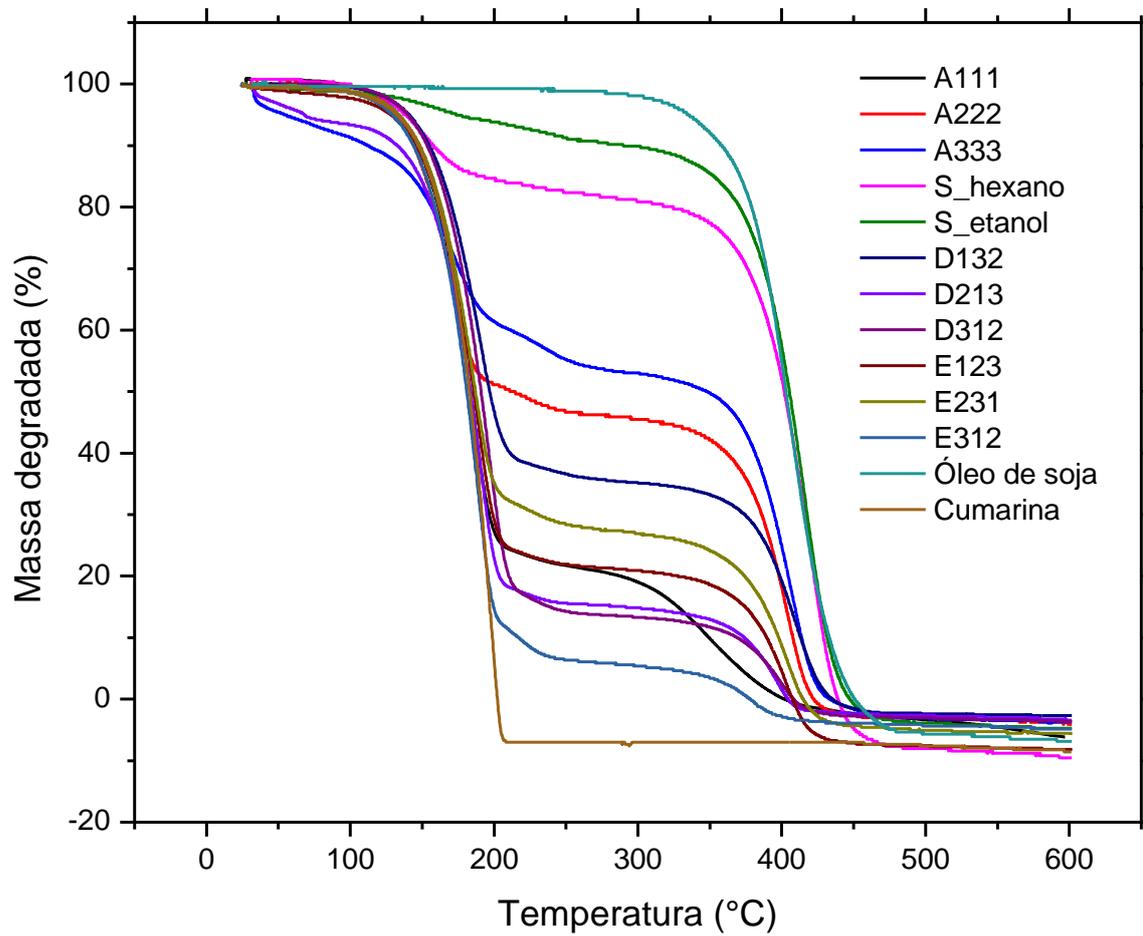


Figura 18: Análise Termogravimétrica das amostras.