



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DO ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

### **Extração de Neolignanas de *Piper regnellii* Usando Fluido Pressurizado**

Caroline Ortega Terra Lemos  
Eng<sup>a</sup> de Alimentos, UEM, 2008  
Orientador: Prof. Dr. Vladimir Ferreira Cabral  
Coorientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestrado em Engenharia Química, área de Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil

Dezembro de 2011

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

Lemos, Caroline Ortega Terra

L557eExtração de neolignanas de *Piper regnellii* usando fluido pressurizado / Caroline Ortega Terra Lemos. -- Maringá, 2011.

107 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Vladimir Ferreira Cabral.

Co-orientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2011.

1. *Piper regnellii* (Pariparoba) - Neolignanas. 2. Modelagem matemática. 3. Atividade biológica. 4. Extração supercrítica. I. Cabral, Vladimir Ferreira, orient. II. Cardozo Filho, Lúcio, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

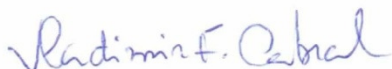
CDD 22.ed. 615.321

SOI-000226

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por  
Caroline Ortega Terra Lemos perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em  
Engenharia Química em 08 de dezembro de 2011.

COMISSÃO JULGADORA



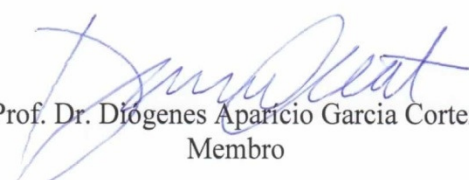
Prof. Dr. Vladimir Ferreira Cabral  
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho  
Coorientador



Profª Drª Kátia Regina Netto dos Santos  
Membro



Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez  
Membro

*“Os homens semeiam na Terra o que colherão  
na vida espiritual: os frutos da sua coragem  
ou da sua fraqueza”*

*Allan Kardec*

## AGRADECIMENTOS

Ao nosso **Senhormuito** obrigada pela Tua constante presença durante a minha caminhada.

Ao professor Vladimir Ferreira Cabral e Lúcio Cardozo Filho, muito obrigada pela orientação, pela oportunidade de crescimento e principalmente, pela confiança e presença em todas as dificuldades enfrentadas ao longo deste trabalho.

Ao professor Diógenes Aparício Garcia Cortez que me auxiliou muito com seu conhecimento em ressonância magnética nuclear e compartilhou suas idéias para o desenvolvimento deste trabalho.

Às professoras Lílian Baeza, Terezinha Svidzinsk e Vera Siqueira pela valiosa colaboração nas análises microbiológicas.

Aos meus queridos amigos de trabalho, pelos momentos difíceis, alegres e principalmente, pela companhia agradável e mútua colaboração.

Aos colegas de todos os laboratórios pelo suporte e auxílio na obtenção de resultados, em especial meus sinceros agradecimentos à Regiane Bertin, Patricia Bonfim e Janine Ribeiro.

À todos da minha família, que jamais mediram esforços acreditando que eu poderia chegar até aqui.

À meu esposo Flavio Lemos, companheiro e amigo, por estar sempre ao meu lado.

À CAPES pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudos.

Ao programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade.

Finalmente, a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Piper regnellii* USANDO FLUIDO PRESSURIZADO

**AUTOR: CAROLINE ORTEGA TERRA LEMOS**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. VLADIMIR FERREIRA CABRAL**

**COORIENTADOR: Prof. Dr. LÚCIO CARDOZO FILHO**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brasil, defendida em 8 de Dezembro de 2011, 107 p.

### RESUMO

A *Piper regnellii* var. *pallescens* é conhecida popularmente como pariparoba, caapeba e capeba. Na medicina popular, suas raízes são utilizadas no tratamento das obstruções do fígado e do baço, para cicatrização de feridas, redução de inchaços e irritações na pele. Além disso, apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana. A aplicação de tecnologia supercrítica para a extração de compostos bioativos desta espécie pode ser atrativa, devido à baixa temperatura de operação e alta pureza dos extratos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade biológica de extratos supercríticos de *Piper regnellii* obtidos sob variação dos parâmetros pressão e temperatura e compará-las com os extratos obtidos por método convencional. Para tal tarefa extratos das folhas e caules de pariparoba foram obtidos sob diversas formas de extração e posteriormente caracterizados segundo sua composição das neolignanas conocarpano e eupomatenóide-5. A extração supercrítica ocorreu nas temperaturas de 40 e 60 °C e em pressões que variaram de 109,2 à 250 bar. Testes de atividade antifúngica, antimicrobiana, citotóxica e antioxidante foram realizados. Apesar do baixo rendimento em massa de extrato obtido na extração supercrítica, estes apresentam maiores teores das neolignanas conocarpano e eupomatenóide-5. Devido à alta qualidade destes extratos, as atividades biológicas testadas se mostraram melhores no método de extração por soxhlet. Os extratos obtidos por extração supercrítica apresentaram CIMs entre 1,95 e 7,81 µg/mL frente a *S. aureus* e CIMs de 0,98 a 7,81 µg/mL frente à MRSA. Em testes com diferentes espécies do gênero *Candida* estes mesmos extratos apresentaram CIM variando de 7,81 à 250 µg/mL. Na análise da citotoxicidade os extratos se mostraram mais tóxicos para os patógenos do que para a célula animal testada. Além disso, o material testado apresentou elevado poder antioxidante exibindo valores de CE<sub>50</sub> entre 41,23 e 85,41 µg/mL. Para representar a cinética de extração em uma coluna de leito fixo, foi empregado um modelo matemático de segunda ordem que se mostrou satisfatório, com base na comparação entre o resultado experimental e teórico. Sendo assim, a extração supercrítica apresenta-se como o melhor método para a obtenção de compostos bioativos promissores para o desenvolvimento de medicamentos a base de produtos naturais.

**Palavras-Chave:** *Piper regnellii*, neolignanas, extração supercrítica, atividade biológica, modelagem matemática.

## EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF *Piper regnellii* USING PRESSURIZED FLUID

**AUTHOR: CAROLINE ORTEGA TERRA LEMOS**

**SUPERVISOR: Prof. Dr. VLADIMIR FERREIRA CABRAL**

**CO-SUPERVISOR: Prof. Dr. LÚCIO CARDOZO FILHO**

MSc Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brazil, presented on 8<sup>th</sup> December 2011, 107 p.

### ABSTRACT

*Piper regnellii* var. *pallescens* is popularly known as pariparoba caapeba and capeba. In folk medicine, its roots are used in the treatment of obstructions of the liver and spleen, wound healing, it reduces swelling and skin irritation. It also gives broad spectrum of antimicrobial activity. The application of supercritical technology for the extraction of bioactive compounds of this kind can be attractive due to low temperature operation and high purity of the extracts. In this context, the objective of this study was to evaluate the biological quality of supercritical extracts of *Piper regnellii* obtained under variation of pressure and temperature parameters and compare them with the extracts obtained by conventional method. For this task extracts from the leaves and stems of pariparoba were obtained in various ways to extract and subsequently characterized according to their composition and neolignans conocarpan and eupomatenoid-5. The supercritical extraction occurred at temperatures of 40 and 60 °C and at pressures ranging from 109.2 to 250 bar. Tests of antifungal, antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity were performed. Despite the low yield in mass of extract obtained in supercritical extraction, they have higher levels of neolignans and conocarpan eupomatenoid-5. Due to the high quality of these extracts, the biological activities tested proved best in the Soxhlet extraction method. The extracts obtained by supercritical extraction showed MICs between 1.95 and 7.81 µg/mL against *S. aureus* and MICs from 0.98 to 7.81 µg/mL against MRSA. In tests with different species of the genus *Candida*, these same extracts showed MIC ranging from 7.81 to 250 µg/mL. In the analysis of cytotoxicity extracts were more toxic to the pathogens than for animal cell tested. In addition, the test material showed high antioxidant exhibiting EC<sub>50</sub> values between 41.23 and 85.41 µg/mL. To represent the kinetics of extraction in a fixed-bed column a second-order mathematical model was employed and proved satisfactory, based on the comparison between the experimental and theoretical results. Thus, the supercritical extraction is presented as the best method for obtaining bioactive compounds promising for the development of drugs based on natural products.

**Key-Words:** *Piper regnellii*, neolignans, supercritical extraction, biological activity, mathematical modeling.

**LISTA DE SÍMBOLOS**

- AA - atividade antioxidante
- % AA - percentual da atividade antioxidantes
- Abs<sub>.amostra</sub> – absorbância da amostra
- Abs<sub>.controle negativo</sub> – absorbância do controle negativo
- ANOVA – análise de variância
- ATCC - american type culture collection
- BHT - butilhidroxitolueno
- C - concentração dos compostos bioativos no solvente
- CAMHB - caldo mueller-hinton cátions ajustados
- $C_{eq}$  – concentração de equilíbrio dos compostos bioativos no solvente
- $C$  – concentração de compostos bioativos no solvente
- CB – compostos bioativos
- CC<sub>50</sub> – concentração citotóxica à 50%
- CE<sub>50</sub> - concentração de extrato necessária para reduzir em 50% o DPPH da reação
- CFM - concentração fungicida mínima
- CI<sub>50</sub> - concentração referente à inibição de 50%
- CIM - concentração inibitória mínima
- CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
- CN - controle negativo
- CP - controle positivo
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazila
- $E_{max}$  – efeito máximo
- EAG - equivalentes de ácido gálico
- ESC - extração supercrítica
- $k$  – constante cinética
- $L$  – comprimento da coluna
- $m_{C.B.j}^{MOD}$  – massa calculada dos compostos bioativos extraídos
- $m_{C.B.j}^{nexp}$  – massa dos compostos bioativos obtida experimentalmente
- MEV – microscopia eletrônica de varredura
- $n_{exp}$  – número de dados experimentais da curva cinética
- P - pressão
- P<sub>c</sub> - pressão crítica



$q$  – concentração de compostos bioativos na matriz sólida

$q_0$  – quantidade de compostos bioativos inicial na matriz sólida pós pressurização do extrator

$Q_f$  – fluxo volumétrico do solvente

RMN – ressonância magnética nuclear

RT - tempo de retenção da substância na coluna cromatográfica

$t$  – tempo de extração

$t_r$  - tempo de residência

T- temperatura

$T_c$  - temperatura crítica

$u$  - velocidade

$z$  - coordenada na direção axial do leito

## LETRAS GREGAS

$\varepsilon$  – porosidade do leito

$\rho_{CO_2}$  - densidade do fluido supercrítico

$\rho_{leito}$  - densidade no leito

$\delta_H$  – deslocamento químico para a ressonância magnética nuclear de hidrogênio

$\delta_C$  – deslocamento químico para a ressonância magnética nuclear de carbono

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ordens de magnitude de parâmetros físicos para gases, fluidos supercríticos e líquidos.....	3
Tabela 2. Atividade antimicrobiana apresentadas por <i>Piper regnellii</i> sobre diferentes patógenos. ....	12
Tabela 3. Modelos matemáticos baseados na transferência de massa para ESC de produtos naturais.....	14
Tabela 4. Parâmetros operacionais de ESC utilizados nos experimentos. ....	20
Tabela 5. Sistemas eluentes para as cromatografias em coluna de adsorção. ....	22
Tabela 6. Rendimento das extrações usando solventes orgânicos.....	33
Tabela 7. Propriedades dos solventes.....	33
Tabela 8. Comparação de rendimentos da extração supercrítica das folhas de <i>Piper regnellii</i> . ....	34
Tabela 9. Rendimentos e parâmetros da extração supercrítica.....	35
Tabela 10. Dados de RMN- <sup>1</sup> H (300MHz) em CDCl <sub>3</sub> para o eupomatenóide-3 descritos na literatura.....	37
Tabela 11. Dados de RMN- <sup>13</sup> C (75MHz) em CDCl <sub>3</sub> para o eupomatenóide-3 descritos na literatura.....	37
Tabela 12. Dados de RMN- <sup>1</sup> H (300 mHz) e RMN- <sup>13</sup> C (75 mHz) em CDCl <sub>3</sub> para os extratos de <i>Piper regnellii</i> referente ao grupo característico do eupomatenóide-3. ....	38
Tabela 13. Dados de RMN- <sup>1</sup> H (300 mHz) em CDCl <sub>3</sub> para o eupomatenóide-5 descritos na literatura.....	40
Tabela 14. Dados de RMN- <sup>13</sup> C (75 mHz) em CDCl <sub>3</sub> para o eupomatenóide-5 descritos na literatura.....	40
Tabela 15. Dados de RMN- <sup>1</sup> H (300 mHz) e RMN- <sup>13</sup> C (75 mHz) em CDCl <sub>3</sub> para os extratos de <i>Piper regnellii</i> referente ao grupo característico do eupomatenóide-5. ....	40
Tabela 16. Dados de RMN- <sup>1</sup> H (300 mHz) em CDCl <sub>3</sub> para o eupomatenóide-6 descritos na literatura.....	42
Tabela 17. Dados de RMN- <sup>13</sup> C (75 mHz) em CDCl <sub>3</sub> para o eupomatenóide-6 descritos na literatura.....	42
Tabela 18. Dados de RMN- <sup>1</sup> H (300 mHz) e RMN- <sup>13</sup> C (75 mHz) em CDCl <sub>3</sub> para os extratos de <i>Piper regnellii</i> referente ao grupo característico do eupomatenóide-6. ....	43
Tabela 19. Dados de RMN- <sup>1</sup> H (300 mHz) em CDCl <sub>3</sub> para o conocarpano descritos na literatura.....	44
Tabela 20. Dados de RMN- <sup>13</sup> C (75 mHz) em CDCl <sub>3</sub> para o conocarpano descritos na literatura.....	44

Tabela 21. Dados de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz) e RMN- <sup>13</sup> C (75 MHz) em CDCl <sub>3</sub> para os extratos de <i>Piper regnellii</i> referente ao grupo característico do conocarpano.....	45
Tabela 22. Concentração dos compostos conocarpano e eupomatenóide-5 nos extratos de <i>Piper regnellii</i> .....	47
Tabela 23. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) dos testes <i>in vitro</i> em fungos utilizando os extratos obtidos.....	51
Tabela 24. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) dos testes <i>in vitro</i> com bactérias gram-negativa e gram-positiva utilizando os extratos obtidos de <i>Piper regnellii</i> . .....	53
Tabela 25. Resultados de concentração citotóxica (CC <sub>50</sub> ) de extratos obtidos por extração supercrítica. ....	55
Tabela 26. Resultados do índice de seletividade para os extratos testados. ....	55
Tabela 27. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de <i>Piper regnellii</i> usando o método DPPH.....	56
Tabela 28. Teores de compostos fenólicos dos extratos de <i>Piper regnellii</i> expressos em gEAG/100g de extrato. ....	59
Tabela 29. Condições experimentais e parâmetros do modelo de transferência de massa proposto para os dados experimentais .....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama pressão x temperatura para um componente puro. <i>Fonte:</i> Cardozo-Filho (1999).....	4
Figura 2. Esquema representativo de um extrator de leito fixo e dos mecanismos de transporte de massa proposto pelo modelo de difusão em sólido homogêneo. <i>Fonte:</i> Cardozo-Filho (1999).....	6
Figura 3. Folhas de <i>Piper regnellii</i> . ....	8
Figura 4. Estruturas químicas das neolignananas presentes em <i>Piper regnellii</i> . ....	9
Figura 5. Aparelho Soxhlet.....	18
Figura 6. Aparato experimental utilizado para a extração com CO <sub>2</sub> supercrítico: C – Cilindro de CO <sub>2</sub> ; A, B – Bomba do tipo seringa; CB1, CB2 – Controlador da bomba; IP – Indicador de pressão; IT – Indicador de temperatura; Vg – Válvula globo; Va – Válvula agulha; Vm – Válvula micrométrica; R1 – Reservatório de coleta; BT1, BT2 – Banho termostaticado. ....	19
Figura 7. Dependência da densidade do CO <sub>2</sub> da pressão e temperatura e condições usuais para a extração de compostos fenólicos. <i>Fonte:</i> Cardozo-Filho (1999).....	20
Figura 8. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na frequência de 300,060 MHz para o composto eupomatenóide-5 em solvente CDCl <sub>3</sub> .....	23
Figura 9. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na frequência de 300,060 MHz para o composto conocarpano em solvente CDCl <sub>3</sub> . ....	24
Figura 10. Esquema para determinação da CIM para leveduras em microplacas.....	25
Figura 11. Esquema para CFM.....	26
Figura 12. Esquema para determinação da CIM em micro placas. ....	28
Figura 13. Curva de extração supercrítica para as folhas de <i>Piper regnellii</i> . (X) P = 109,2 bar/40 °C; (–) P = 150,0 bar/40 °C; (◆) P = 176,7 bar/60 °C; (■) P = 244,1 bar/60 °C; (●) P = 250,0 bar/40 °C. ....	36
Figura 14. Curva de extração supercrítica para os caules de <i>Piper regnellii</i> . (X) P = 109,2 bar/40 °C; (–) P = 150,0 bar/40 °C; (◆) P = 176,7 bar/60 °C; (■) P = 244,1 bar/60 °C; (●) P = 250,0 bar/40 °C. ....	36
Figura 15. Estrutura química do eupomatenóide-3. ....	37
Figura 16. Estrutura química da molécula do eupomatenóide-5.....	39
Figura 17. Estrutura química da molécula do eupomatenóide-6.....	42
Figura 18. Estrutura química da molécula do conocarpano.....	44
Figura 19. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 350 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial. ....	46

Figura 20. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomatenóide-5 na concentração de 620 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	46
Figura 21. Curva de calibração para o padrão conocarpano. ....	47
Figura 22. Curva de calibração para o padrão eupomatenóide-5.....	47
Figura 23. Matriz sólida das folhas de <i>Piper regnellii</i> : (a) Antes da extração; (b) Extraída a 109,2 bar/40°C; (c) Extraída a 244,1 bar/60°C; (d) Extraída a 250,0 bar/40°C; (e) Extraída em soxhlet com hexano; (f) Extraída em soxhlet com diclorometano;.....	49
Figura 24. Matriz sólida dos caules de <i>Piper regnellii</i> : (a) Antes da extração; (b) Extraída a 109,2 bar/40°C; (c) Extraída a 244,1 bar/60°C; (d) Extraída a 250,0 bar/40°C; (e) Extraída em soxhlet com hexano; (f) Extraída em soxhlet com diclorometano;.....	50
Figura 25. Valores de CE <sub>50</sub> (µg/mL) para os extratos das folhas de <i>Piper regnellii</i> . ....	57
Figura 26. Valores de CE <sub>50</sub> (µg/mL) para os extratos dos caules de <i>Piper regnellii</i> .....	57
Figura 27. Curva padrão de ácido gálico. ....	59
Figura 28. Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais para as folhas de <i>Piper regnellii</i> . ....	60
Figura 29. Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais para os caules de <i>Piper regnellii</i> . ....	60
Figura 30. Gráficos representando os modelos matemáticos de segunda ordem para as diferentes curvas cinéticas experimentais de extração de compostos bioativos das folhas de <i>Piper regnellii</i> usando CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	62
Figura 31. Gráficos representando os modelos matemáticos de segunda ordem para as diferentes curvas cinéticas experimentais de extração de compostos bioativos dos caules de <i>Piper regnellii</i> usando CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	63
Figura 32. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 10,90 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial. ....	73
Figura 33. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 21,80 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial. ....	73
Figura 34. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 43,70 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial. ....	73
Figura 35. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 175 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial. ....	74

Figura 36. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomatenóide-5 na concentração de 19,40 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	74
Figura 37. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomatenóide-5 na concentração de 38,80 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	74
Figura 38. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomatenóide-5 na concentração de 77,60 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	75
Figura 39. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomatenóide-5 na concentração de 310 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	75
Figura 40. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 109,2 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	75
Figura 41. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 150 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	76
Figura 42. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 176,7 bar e 60 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	76
Figura 43. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 244,1 bar e 60 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	76
Figura 44. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 250 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	77
Figura 45. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 109,2 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	77
Figura 46. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 150 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	77
Figura 47. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 176,7 bar e 60 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	78

Figura 48. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 244,1 bar e 60 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	78
Figura 49. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 250 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	78
Figura 50. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por soxhlet com hexano em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial. ....	79
Figura 51. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por soxhlet com diclorometano em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	79
Figura 52. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por soxhlet com hexano em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial. ....	79
Figura 53. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por soxhlet com diclorometano em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.....	80
Figura 54. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 109,2 bar e 40°C. ....	80
Figura 55. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 109,2 bar e 40°C. ....	80
Figura 56. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 150,0 bar e 40°C. ....	81
Figura 57. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 150,0 bar e 40°C. ....	81
Figura 58. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 176,7 bar e 60°C. ....	81
Figura 59. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 176,7 bar e 60°C. ....	82
Figura 60. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 244,1 bar e 60°C. ....	82
Figura 61. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 244,1 bar e 60°C. ....	82
Figura 62. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 250,0 bar e 40°C. ....	83

Figura 63. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido a 250,0 bar e 40°C. ....	83
Figura 64. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido em soxhlet com diclorometano.....	83
Figura 65. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido em soxhlet com diclorometano.....	84
Figura 66. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido em soxhlet com hexano.....	84
Figura 67. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato das folhas obtido em soxhlet com hexano.....	84
Figura 68. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 109,2 bar e 40°C.....	85
Figura 69. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 109,2 bar e 40°C.....	85
Figura 70. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 150,0 bar e 40°C.....	86
Figura 71. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 150,0 bar e 40°C.....	86
Figura 72. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 176,7 bar e 60°C.....	86
Figura 73. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 176,7 bar e 60°C.....	87
Figura 74. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 244,1 bar e 60°C.....	87
Figura 75. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 244,1 bar e 60°C.....	87
Figura 76. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 250,0 bar e 40°C.....	88
Figura 77. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido a 250,0 bar e 40°C.....	88
Figura 78. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido em soxhlet com diclorometano.....	88
Figura 79. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido em soxhlet com diclorometano.....	89
Figura 80. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl <sub>3</sub> .para o extrato dos caules obtido em soxhlet com hexano.....	89



Figura 81. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na frequência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>. para o extrato dos caules obtido em soxhlet com hexano..... 89

## SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS.....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	3
2.1 A EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA .....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 <i>Piper regnellii</i> var. <i>pallescens</i> .....	7
3.1.1 Características agronômicas da espécie .....	7
3.1.2 Compostos bioativos.....	8
3.1.3 Potencial medicinal .....	10
3.2 MODELAGEM MATEMÁTICA DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	13
3.3. ESTADO DA ARTE .....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
4.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL .....	17
4.2 EXTRAÇÃO.....	17
4.2.1 Solvente Orgânico (Soxhlet) .....	17
4.2.2 Extração Solvente Pressurizado .....	18
4.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS .....	21
4.3.1 Identificação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	21
4.3.2 Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	22
4.3.2.1 Purificação dos compostos .....	22
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	24
4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	24
4.5.1 Atividade Contra Fungos Leveduriformes .....	24
4.5.2 Atividade Contra Fungos Filamentosos.....	26
4.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	27
4.7 CITOTOXICIDADE.....	28
4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	29
4.8.1 Método de Redução do radical Estável DPPH• .....	29
4.8.2 Compostos Fenólicos Totais.....	30
4.9 MODELAGEM MATEMÁTICA .....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1 EXTRAÇÕES.....	33
5.1.1 Extração com solventes orgânicos .....	33

5.1.2 Extração com CO <sub>2</sub> Pressurizado.....	34
5.1.3.1 Avaliação da influência do tamanho das partículas .....	34
5.1.3.2 Extração supercrítica dos extratos de folhas e caules de <i>Piper regnellii</i> .....	35
5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	36
5.2.1 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	37
5.2.1.1 Eupomatenóide-3 .....	37
5.2.1.2 Eupomatenóide-5 .....	39
5.2.1.3 Eupomatenóide-6 .....	41
5.2.1.4 Conocarpano .....	43
5.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	45
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	48
5.4 TESTE <i>IN VITRO</i> : ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	51
5.5 TESTE <i>IN VITRO</i> : ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	53
5.6 CITOTOXICIDADE.....	55
5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	56
5.7.1 Método de redução do DPPH* .....	56
5.7.2 Compostos fenólicos totais .....	58
5.7.3 Relação entre a atividade antioxidante (DPPH*) e os compostos fenólicos totais .....	59
5.8 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO.....	60
6 CONCLUSÃO.....	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXO .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados na medicina desde os tempos antigos para o tratamento de diversas doenças e, mesmo com o desenvolvimento da química farmacêutica e da síntese de novas moléculas, as plantas ainda são a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (DUARTE et al., 2007). Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas (CRAGG et al., 1997).

O uso de extratos de plantas também é possível para se obter princípios ativos quimicamente definidos e, para isso, a atividade biológica deve estar definida, assim como os compostos responsáveis por essa ação. Em alguns casos, o efeito terapêutico pode resultar da ação de vários princípios ativos (HOSTTETMANN et al., 2003).

Inúmeras espécies vegetais já são aceitas como fontes de compostos bioativos. A atividade da espécie pode ser explicada pela presença de compostos específicos, ou também pela existência de sinergismo entre os compostos (GUTIERREZ et al, 2009; PESSINI et al., 2003a).

A obtenção de compostos com propriedades, nutricionais e/ou terapêuticas exige muito das técnicas de separação, especialmente a de purificação, devido à rigorosa especificação dos produtos comuns nos setores alimentício, farmacêutico e cosmético (BATISTELA e WOLF-MACIEL, 1996). Na extração com o uso de solventes orgânicos, sua remoção despense muita energia e um alto custo, além disso, os solventes podem provocar efeitos tóxicos nos consumidores. Ou seja, o solvente residual pode ser indesejável devido à sua toxicidade, à sua capacidade reagente ou mesmo pela interferência no sabor e no aroma do extrato (MAUL, 1999). A extração com fluídos supercríticos nos ajuda a solucionar este tipo de problema ocorrente nos processos tradicionais.

Estudos revelaram que extratos obtidos por extração com fluido pressurizado mantêm ou excedem a atividade biológica dos extratos obtidos por técnicas convencionais. A razão para isso é a especificidade dos processos supercríticos que geram extratos ricos em compostos desejáveis e livre de solventes (PEREIRA e MEIRELES, 2010)

A extração com fluido supercrítico é uma operação unitária, onde são utilizados solventes acima de seus pontos críticos para extraírem componentes solúveis de uma mistura (PAVIANI et al., 2010). Esta operação tem despertado grande interesse de pesquisa devido as suas vantagens na qualidade dos produtos extraídos quando comparados com aqueles extraídos por técnicas tradicionais (JUSTO, et al. 2008).

Várias substâncias fisiologicamente ativas presentes na família Piperaceae podem ser destacadas, tais como: as amidas, os alcalóides, as lignanas, as neolignanas, os terpenos, os esteróides, as chalconas, e os flavonóides (SANTOS, et al. 2001).

Substâncias obtidas de diferentes espécies de *Piper* têm incitado interesse, dos pesquisadores, devido às atividades biológicas. Neolignanas presentes no extrato em acetato de etila das raízes de *Piper regnellii* já foram isoladas, dentre as quais o conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6 (BENEVIDES et al., 1999).

A *Piper regnellii* var. *pallescens* é conhecida popularmente como pariparoba, caapeba e capeba. Na medicina popular, suas raízes são utilizadas no tratamento das obstruções do fígado e do baço, para cicatrização de feridas, redução de inchaços e irritações na pele (PESSINI et al., 2005; KOROISHI et al. 2008).

Esta espécie apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana (bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos leveduriformes) (HOLETZ et al., 2002). Demonstrou-se que extratos brutos de folhas de *P. regnellii* (Miq.) var. *regnellii* apresentam atividade antileishmania e antitripanossoma (LUIZE et al., 2005).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral a extração de compostos bioativos de folhas e caules de *Piper regnellii* utilizando fluido pressurizado e solvente orgânico. Para alcançar a meta do objetivo geral foi necessário o desenvolvimento das seguintes etapas:

- Determinar experimentalmente o rendimento global da extração de compostos bioativos utilizando solventes orgânicos e dióxido de carbono em condições supercríticas;
- Medir experimentalmente as cinéticas de extração de compostos bioativos via o dióxido de carbono em meio supercrítico;
- Obter as eletromicrografias do material vegetal antes e após o processo de extração;
- Identificar e quantificar os compostos Eupomatenóide-3, Eupomatenóide-5, Eupomatenóide-6 e Conocarpano nos extratos via ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica e citotóxica dos extratos contendo os compostos bioativos de *Piper regnellii*.
- Propor um modelo matemático para as cinéticas de extração de compostos bioativos;

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O Capítulo 2 apresenta uma fundamentação teórica da tecnologia supercrítica como método de extração de compostos bioativos, evidenciando os principais trabalhos sobre o assunto.

### 2.1 A EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

A Extração supercrítica (ESC) considera os mesmos parâmetros operacionais de transferência de massa (propriedades físico-químicas do solvente/soluto, substâncias, regime de fluxo, efeito de mistura, solubilidade, afinidade química, etc) que um processo de extração convencional. No entanto, devido às características intrínsecas o fluido supercrítico adquire uma densidade similar à de um líquido e simultaneamente uma compressibilidade próxima a de um gás. Adicionalmente, o fluido em condições supercríticas possui um maior poder de solvatação que ocasiona uma alta permeação do fluido na amostra, aumentando a probabilidade de uma extração completa (SKOOG, 1995; STUART et al., 1996). A elevada taxa de transferência de massa dos solutos no fluido no estado 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 (SIHVONEN et al, 1999; RAVENTÓS, DUARTE e ALARCÓN,2002).

Na Tabela 1 encontram-se evidenciadas as propriedades físico-químicas do fluido supercrítico comparado com as propriedades de líquidos e gases.

Tabela 1. Ordens de magnitude de parâmetros físicos para gases, fluidos supercríticos e líquidos.

Estado do fluido	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Difusividade (cm <sup>2</sup> /s)	Viscosidade (g/cm.s)
<b>Gás</b> P = 0,1013 MPa, T = 15 – 30°C	(0,6 – 2,0) x 10 <sup>-3</sup>	0,1 – 0,4	(0,6 – 2,0) x 10 <sup>-4</sup>
<b>Líquido</b> P = 0,1013 MPa, T = 15 – 30°C	0,6 – 1,6	(0,2 – 2,0) x 10 <sup>-5</sup>	(0,2 – 3,0) x 10 <sup>-2</sup>
<b>Fluido supercrítico</b> P = P <sub>c</sub> , T ≈ T <sub>c</sub>	0,2 – 0,5	0,7 x 10 <sup>-3</sup>	(1 – 3) x 10 <sup>-4</sup>
P = P <sub>c</sub> , T ≈ T <sub>c</sub>	0,4 – 0,9	0,2 x 10 <sup>-3</sup>	(3 – 9) x 10 <sup>-4</sup>

Fonte: Brunner, 2005

Na Figura 1 encontram-se representado o comportamento molecular dos estados de agregação da matéria em um diagrama de fases para uma substância pura.

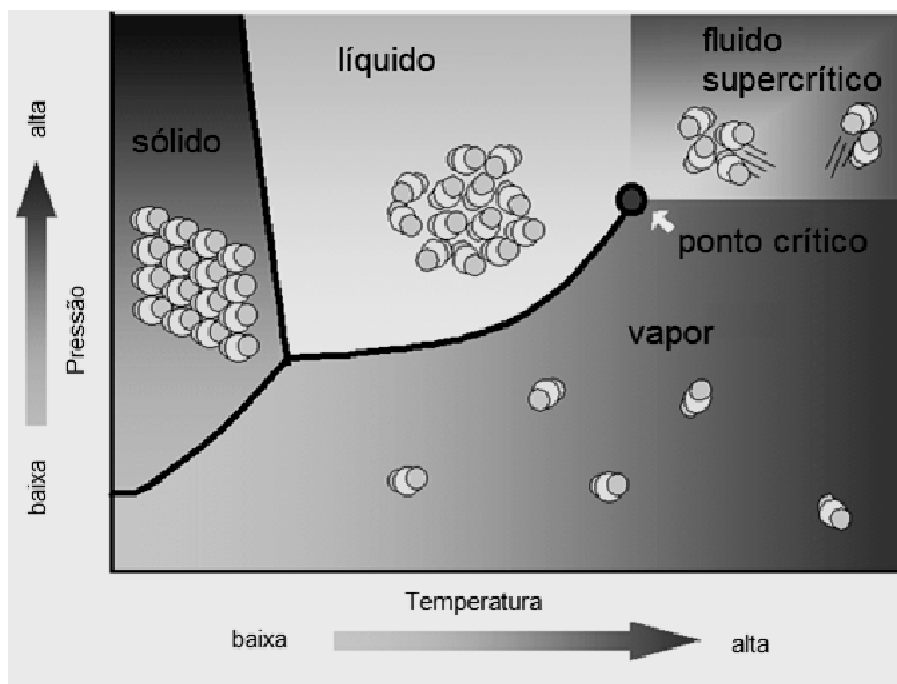


Figura 1 Diagrama pressão x temperatura para um componente puro. Fonte: Cardozo-Filho, 1999.

As motivações para o desenvolvimento da tecnologia de extração supercrítica residem nos seguintes fatos: (1) um aumento acentuado no custo de energia, o qual elevou os custos das técnicas tradicionais de separação; (2) maior controle e regulamentação governamental dos solventes industriais comuns, a utilização do  $\text{CO}_2$  supercrítico é aceitável ambientalmente e é muito atrativo como alternativa do solvente industrial; (3) legislações de controle de poluição mais severas; e (4) aumento das exigências do desempenho dos processos de separação.

Uma vantagem da extração com fluido supercrítico é a possibilidade de fácil recuperação do solvente supercrítico após o processo de extração, apenas pelo ajuste da pressão e/ou temperatura, podendo o mesmo ser continuamente reciclado. Isto elimina uma das etapas mais dispendiosas dos processos de extração convencionais que é a separação do produto extraído do solvente orgânico.

O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é o fluido supercrítico mais utilizado como solvente na obtenção de extratos de produtos naturais, principalmente para as indústrias de alimentos e farmacêutica. Ele é inerte, seu custo é relativamente baixo, está facilmente disponível em alta pureza, é inodoro, atóxico, não inflamável e pode ser facilmente removido do produto final, sem deixar resíduos. Além disso, apresenta temperatura e pressão críticas relativamente baixas ( $T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $P_c = 73,8 \text{ bar}$ ) (Mc HUGH e KRUKONIS, 1986).

A facilidade de extração de compostos com CO<sub>2</sub> supercrítico depende da presença de grupos funcionais individuais nesses compostos, do seu peso molecular e de sua polaridade. Hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos com polaridade relativamente baixa, como por exemplo, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas e lactonas são extraídos com CO<sub>2</sub> supercrítico a baixas pressões, em torno de 75 e 100 bar, onde substâncias moderadamente polares, como derivados de benzeno com um grupo carboxílico e dois grupos hidroxilas, são moderadamente solúveis. Compostos altamente polares, com um grupo carboxílico e três ou mais grupos hidroxilas são pouco solúveis (Mc HUGH e KRUKONIS, 1986).

A extração supercrítica é realizada pelo contato contínuo do substrato sólido com o solvente supercrítico. Na maioria dos casos o substrato sólido forma um leito fixo. O fluido supercrítico atravessa o leito fixo e extrai os componentes do produto com os quais tem mais afinidade até o esgotamento do substrato. A extração a gás de sólidos consiste de duas etapas de processo: 1) a extração; 2) a separação do extrato do solvente (vide Figura 2). Na extração supercrítica o solvente supercrítico flui através de um leito fixo de partículas sólidas e dissolve os componentes extraíveis do sólido. O solvente é alimentado no extrator e distribuído uniformemente na entrada do leito fixo. O solvente carregado de soluto é removido do extrator e é levado ao separador (separação). A concentração dos compostos extraídos aumenta na direção do fluxo no fluido supercrítico e no material sólido. Na figura 2 encontra-se um gráfico que representa a forma da curva de concentração em função do tempo de extração. O formato da curva depende de parâmetros da cinética de extração do sólido e do poder de solvatação do solvente, que por sua vez depende das condições de operação. Tanto para o sólido quanto para o solvente, a extração é um processo não-estacionário (BRUNNER, 1994).



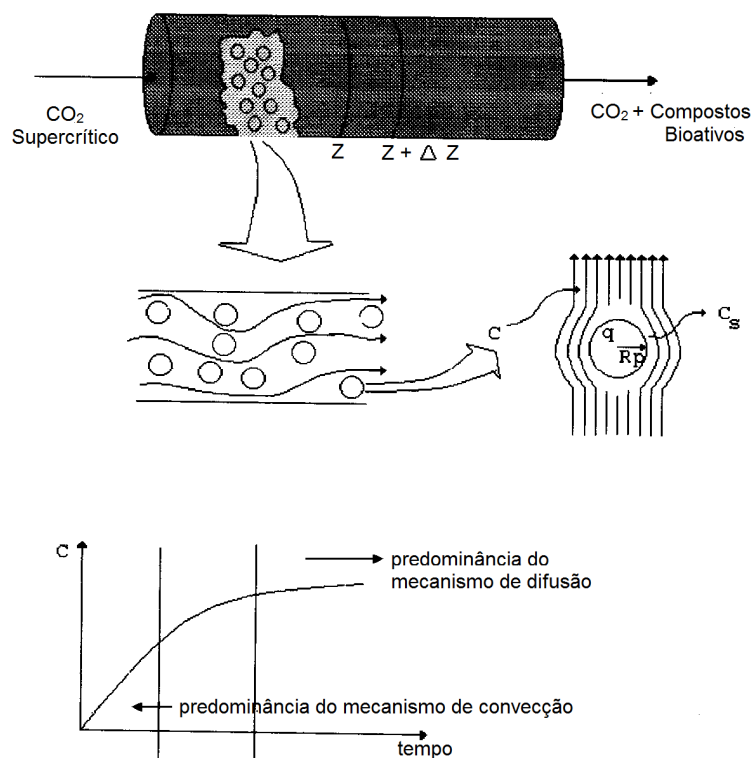


Figura 2. Esquema representativo de um extrator de leito fixo e dos mecanismos de transporte de massa proposto pelo modelo de difusão em sólido homogêneo. Fonte: Cardozo-Filho, 1999.

Já se encontram em fase de estudo ou experimentação aplicações industriais do fluido supercrítico, nas mais diversas áreas. No setor de produtos naturais podemos citar a descafeinação de café e chá; redução do teor de nicotina do tabaco; extração de compostos bioativos de sementes vegetais e oleaginosas; desodorização e redução de acidez de compostos bioativos comestíveis; extração de aromas de flores, folhas e frutas; impregnação de conservantes naturais em alimentos; obtenção do extrato de lúpulo para fabricação de cerveja e redução do teor de colesterol de alimentos (MAUL, 1999).

No setor de produtos químicos, a extração supercrítica é utilizada para regeneração do carvão ativo; extração e purificação de carvão mineral; extração dos compostos bioativos de xisto e purificação de polímeros.

A extração de compostos bioativos de *Piper regnellii* até o momento não tinha sido realizada empregando tecnologia supercrítica. Sendo assim, baseado nas afinidades químicas entre as neolignanas procuradas e as moléculas de baixa polaridade, o dióxido de carbono foi escolhido como solvente para ser utilizado em condições pressurizadas. Vale ressaltar que a substituição de solventes orgânicos poluidores (usados em trabalhos anteriores) pelos solventes supercríticos é o grande passo em termos de evolução de gerenciamento ambiental, já que estes não geram resíduos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica propõe-se uma apresentação de trabalhos relevantes disponíveis na literatura específica sobre *Piper regnellii* considerando os aspectos agrônômicos, características químicas e potencial medicinal, além de uma breve revisão sobre os modelos matemáticos empregados para descrever a extração supercrítica de produtos naturais.

#### 3.1 *Piper regnellii* var. *pallescens*

##### 3.1.1 Características agrônômicas da espécie

A família Piperaceae, da qual pertence a *Piper regnellii* é pantropical, faz parte da classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae, subordem Nymphaeiflorae e ordem Piperales (SANTOS et al., 2001). É formada por cerca de 10 gêneros e cerca de 1400 espécies com boa representatividade na América Latina, ocorrendo de Norte a Sul do Brasil (JOLY, 1975; FIGUEIREDO et al., 2000). Nesta família encontram-se plantas de porte arbustivo e herbáceo. Cerca de 700 espécies pertencentes ao gênero *Piper* estão distribuídas nos dois hemisférios, tanto em regiões tropicais como em subtropicais (PARMAR et al., 1997).

*Piper regnellii* var. *pallescens*, é um arbusto de aproximadamente 1,5 m de altura, de caules perfilados, cilíndricos, de aspecto liso, nodoso, de coloração verde a verde claro, com regiões mais jovens pubescentes e apresentando ramificação simpodial. As folhas são alternas, pecioladas, cordiformes, inteiras, de base simétrica, medindo, quando adultas, de 12,0 a 14,0 cm de largura e de 10,0 a 12,0 cm de comprimento. Pecíolos longos, com até 8,0 cm de comprimento, levemente sulcados próximo à base do limbo (PESSINI et al., 2003b). As folhas desta espécie são apresentadas na Figura 3.



Figura 3. Folhas de *Piper regnellii*.

Segundo Joly (1975), é típico da família Piperaceae folhas inteiras com disposição alterna e presença de estípulas, conforme observado para a espécie estudada. De formato cordiforme, as folhas de *P. regnellii* apresentam ápice mucronado, base simétrica e margem inteira. O sistema radical é constituído por raiz subterrânea que se desenvolve paralelamente ao solo e da qual partem raízes secundárias bem desenvolvidas e ramificadas assemelhando-se as raízes de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., exceto pela ausência de raízes adventícias originadas na base do caule. As raízes, em estrutura primária, apresentam epiderme com células de formato irregular e paredes suberificadas, córtex constituído por células parenquimáticas isodiamétricas, entre as quais se destacam idioblastos contendo material lipofílico. Em estrutura secundária observa-se periderme, originada pela atividade do felogênio. No tecido vascular o xilema encontra-se bem desenvolvido, apresentando raios parenquimáticos largos. Idioblastos contendo material lipofílico e células contendo grãos de amido são encontrados em grande quantidade em todo córtex (FIGUEIREDO et al., 2000; PESSINI et al., 2003).

### 3.1.2 Compostos bioativos

Inúmeras espécies vegetais já são usadas como fontes de compostos bioativos. Em alguns casos, a atividade da espécie pode ser explicada pela presença de compostos específicos etambém pela existência de sinergismo entre estes (GUTIERREZ et al., 2009).

Várias substâncias fisiologicamente ativas têm sido isoladas de espécies de Piperaceae podendo ser destacadas as amidas, os alcalóides, as lignanas, as

neolignan, os terpenos, os esteróides, as chalconas, e os flavonóides (SANTOS et al., 2001).

Uma característica marcante das Piperaceas é a presença de estruturas de conteúdo oleífero. Segundo Maia et al.(1987), o material extraído de *Piper hispidinervium* apresenta um teor de 98,12% de safrol, enquanto o extrato de *Piper callosum* possui 64% de safrol. Mais tarde, Martins et al.(1998) revelaram a presença dos compostos  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno,  $\varepsilon$ -nerolidol, linalol e limoneno no óleo essencial de *Piper umbellatum* L.

Substâncias isoladas de diferentes espécies de *Piper*têm incitado interessedos pesquisadores, devido às atividades biológicas. Benevides et al. (1999) isolaram diferentes neolignanas presentes no extrato em acetato de etila das raízes de *Piper regnellii*, dentre as quais o conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6, apresentados na Figura 4.

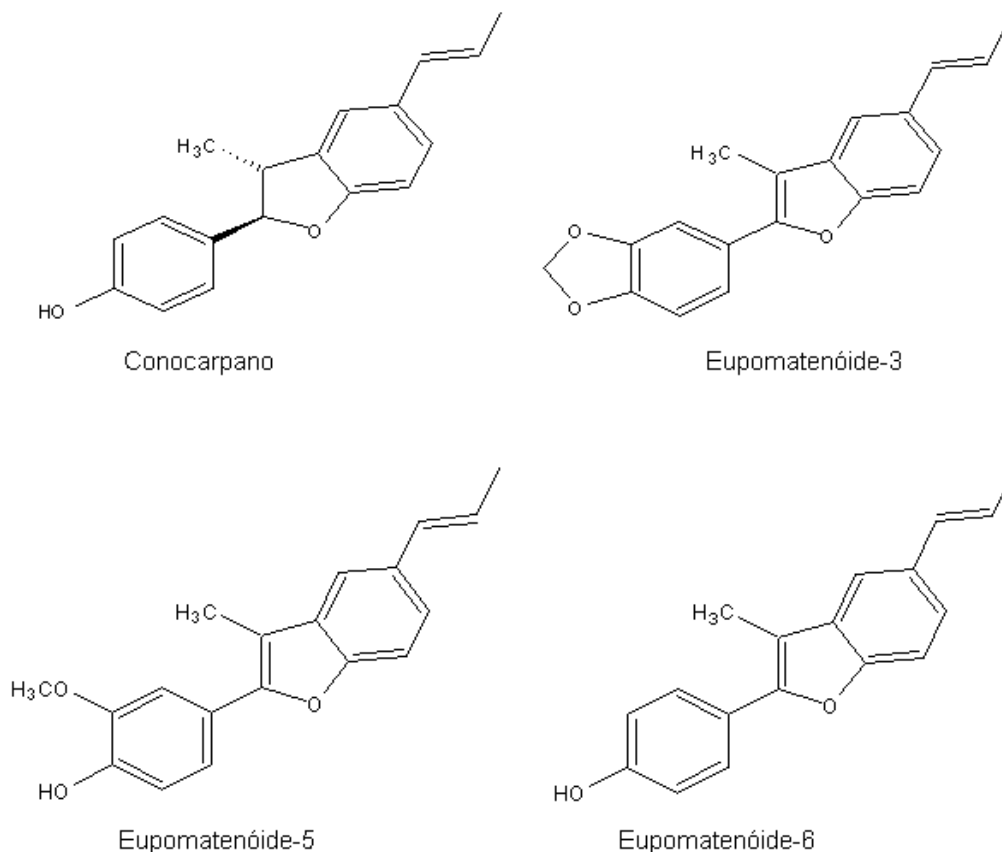


Figura 4. Estruturas químicas das neolignanas presentes em *Piper regnellii*.

Estudos fitoquímicos da raiz de *Piper regnellii* mostraram que esta espécie apresenta um acúmulo de vários fenilpropanóides e neolignanas dihidrobenzofuranicas incluindo o conocarpano como composto majoritário (PESSINI et al., 2005). Os

constituintes químicos do óleo essencial foram identificados e sua concentração relativa estabelecida por análise espectral de cromatografia gasosa. A substância majoritária do óleo foi o mirceno (52,6 %), seguido pelo linalol (15,9 %), cariofileno (8,5 %), (*E*)-nerolidol (4,2 %) e limoneno (4,1 %) (CONSTANTIN et al., 2001).

As neolignanas são lignóides cujo esqueleto é formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub>, sendo n restrito a poucas unidades. Mais de 500 lignóides estão descritos na literatura, sendo que 90% pertence ao grupo das lignanas e neolignanas. As neolignanas são dímeros fenilpropanoídicos que predominam em arbustos e que se diferenciam das lignanas principalmente por não apresentarem o carbono gama (C-γ) do resíduo n-propilbenzênico oxigenado. São produtos do metabolismo secundário havendo evidências que esse grupo de substâncias esteja envolvido em interações de plantas com fungos, insetos ou com outras plantas (BARBOSA FILHO, 2001). Já as neolignanas benzofurânicas representam uma subclasse com uma variedade de atividades biológicas incluindo antifúngica e atividade inseticida.

### 3.1.3 Potencial medicinal

As plantas podem produzir milhares de substâncias químicas diferentes, onde apenas uma ou algumas são responsáveis pela atividade terapêutica ou tóxica (HAMBURGUER et al., 1991). Sendo assim, é necessário dispor de testes biológicos ou farmacológicos que identifiquem a atividade investigada no extrato da planta. Estes testes devem ser altamente sensíveis, pois alguns compostos estão presentes em pequena concentração e devem ser também, específicos para um determinado alvo biológico.

Os alvos para os testes podem ser bactérias, fungos, células de origem animal entre outros.

O potencial medicinal de espécies do gênero *Piper*, pode ser representado pela kava- kava, *Piper methysticum*, amplamente utilizada nos distúrbios do sistema nervoso central, como depressão e insônia.

Na Jamaica, de 11 espécies estudadas *P. aduncum* e *P. hispidum* foram listadas na medicina popular para tratar dores no estômago e como repelente de insetos. Já a *P. amalago*, nativa do México, é usada para aliviar dores no estômago e como antiinflamatório e a *P. marginatum*, nativo do Brasil mostrou atividade antiinflamatória (FALCÃO et al., 2005).

Dentre as espécies empregadas para fins terapêuticos, destaca-se a *Piper regnellii* var. *pallescens* que apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana (bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes) (HOLETZ et al., 2002).

Os extratos em acetato de etila das folhas de pariparoba foram testados contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, obtendo como concentração inibitória mínima (CIM) 15,62 µg/mL. As neolignanas isoladas deste extrato, como eupamotenóides-6 e eupomatenóide-5, mostraram boa atividade sobre *S. aureus* com CIM de 1,56 µg/mL e 3,12 µg/mL, respectivamente. Ambas as substâncias apresentaram atividade frente a *B. subtilis* com CIM de 3,12 µg/mL. O conocarpano foi ativo sobre *S. aureus* e *B. subtilis* com CIM de 6,25 µg/mL. Já para as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, este extrato não apresentou atividade antibacteriana (CIM > 1000 µg/mL) (PESSINI et al., 2003a).

Estudos acerca da atividade antiespasmódica *in vitro* do extrato hidroetanólico de *Piper regnellii*, mostraram que este extrato inibiu de forma concentração-dependente o efeito da acetilcolina (ACh) e do cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>), mostrando antagonismo não-repetitivo, reduzindo o efeito máximo (E<sub>máx</sub>) das curvas concentração-efeito obtidas para ACh e BaCl<sub>2</sub>, com maior atividade contra ACh. O extrato apresentou atividade espasmolítica, justificando o emprego popular da espécie no tratamento de distúrbios gastrintestinais. (PEREIRA et al., 2004).

Segundo Pessini et al. (2005) o extrato em acetato de etila de pariparoba apresentou boa atividade contra as leveduras *Candida albicans* com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/mL, moderada atividade contra *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* (CIM de 500 µg/mL) e foi inativo contra *Candida tropicalis* (CIM > 1000 µg/mL). Os compostos eupomatenóide-5, eupomatenóide-6, eupomatenóide-3 e conocarpano deste extrato foram isolados e o único que se apresentou satisfatório na inibição de leveduras foi o conocarpano, com CIMs variando de 6,3 a 25 µg/mL.

Em 2006, Nakamura et al. demonstraram que extratos brutos de folhas dessa espécie apresentam atividade antileishmania. Este estudo incluiu o processo de extração e o fracionamento biomonitorado pelo método de cromatografia de adsorção. Um aumento progressivo no efeito antileishmania foi observado durante o processo de purificação. O extrato hidroalcoólico solúvel em água apresentou concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) igual a 167 µg/mL enquanto o extrato hidroalcoólico solúvel em acetato de etila mostrou um IC<sub>50</sub> de 30 µg/mL sobre o crescimento de formas promastigotas. A fração hexano apresentou uma atividade antileishmania maior ainda com IC<sub>50</sub> de 21,5 µg/mL. Análises de citotoxicidade indicaram que as concentrações tóxicas dos extratos e das frações foram maiores para macrófagos J774G8 do que para os protozoários.

Em estudos posteriores, Koroishi et al. (2008) constataram que o extrato hidroalcoólico de *Piper regnellii* apresentou uma forte atividade contra os fungos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* com CIMs de 15.62, 15.62, 15.62 e 62.5 µg/mL, respectivamente.

Os compostos isolados eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5 apresentaram forte atividade contra *T. rubrum* com CIM de 6,2 à 50 µg/mL, respectivamente.

Pesquisas sobre constituintes voláteis relataram atividade antimicrobiana óleo essencial das folhas de *P. regnellii* (Miq.) C. DC. sobre o *S. aureus* e *C. albicans*.

Recentemente, Marçal et al. (2010) relataram uma boa atividade do extrato em acetato de etila sobre *S. aureus* resistente (MRSA), com uma CIM de 16 µg/mL. Baseado nestes resultados os autores separaram o extrato bruto em 9 frações, e a única fração que se mostrou ativa contra o microrganismo testado foi a que apresentava o composto purificado eupomatenóide-5 exibindo uma CIM de 4 µg/mL.

Na Tabela 2 encontra-se um resumo das atividades biológicas de extratos brutos e das substâncias isoladas de *Piper regnellii* já relatadas por outros autores, com relação à ação antimicrobiana.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana apresentadas por *Piper regnellii* sobre diferentes patógenos.

Droga	Alvo biológico	CIM (µg/mL)	Alvo biológico	CIM (µg/mL)	Referência	
Extrato das folhas em acetato de etila	<i>S. aureus</i>	15,62	<i>P. aeruginosa</i>	1000	PESSINI et al. (2003)	
	<i>B. subtilis</i>	15,62	<i>E. coli</i>	1000		
	Eupomatenóide-5	3,12	<i>B. subtilis</i>	3,12		
	Eupomatenóide-6	1,56	<i>B. subtilis</i>	3,12		
Extrato das folhas em acetato de etila	<i>C. albicans</i>	125	<i>C. parapsilosis</i>	500	PESSINI et al. (2005)	
	<i>C. krusei</i>	500	<i>C. tropicalis</i>	>1000		
	Eupomatenóide-3	<i>C. albicans</i>	>100	<i>C. parapsilosis</i>		>100
		<i>C. krusei</i>	>100	<i>C. tropicalis</i>		>100
Eupomatenóide-5	<i>C. albicans</i>	>100	<i>C. parapsilosis</i>	>100		
	<i>C. krusei</i>	>100	<i>C. tropicalis</i>	>100		
Eupomatenóide-6	<i>C. albicans</i>	>100	<i>C. parapsilosis</i>	>100		
	<i>C. krusei</i>	>100	<i>C. tropicalis</i>	>100		
Conocarpano	<i>C. albicans</i>	6,3	<i>C. parapsilosis</i>	25		
	<i>C. krusei</i>	12,5	<i>C. tropicalis</i>	6,3		
Extrato hidroalcoólico das folhas	<i>T. mentagrophytes</i>	15,62	<i>M. canis</i>	15,62	KOROISHI et al. (2008)	
	<i>T. rubrum</i>	15,62	<i>M. gypseum</i>	62,5		
	Eupomatenóide-3	50				
Eupomatenóide-5	<i>T. rubrum</i>	6,2				
Extrato das folhas	MRSA	16			MARÇAL et al. (2010)	
Eupomatenóide-5	MRSA	4				

### 3.2 MODELAGEM MATEMÁTICA DA EXTRAÇÃO SUPERCRTICA

A extração com fluido supercrítico é uma promissora alternativa para a extração de produtos com alto valor agregado. Diferentes tipos de matrizes têm sido estudadas como sementes, folhas, cascas e raízes para obter óleos, esteroides, terpenos, ácidos graxos livres, vitaminas, corantes entre outros.

Do ponto de vista da engenharia, é necessário o conhecimento dos parâmetros relevantes do processo, como cinética e equilíbrio de transferência de massa, e a otimização das condições de operação para realizar o scale-up dos processos de extração supercrítica para escala industrial. Estes parâmetros podem ser obtidos usando descrições matemáticas cuidadosas do processo de extração e os dados experimentais de laboratório.

A modelagem matemática da extração com fluido supercrítico de produto com alto valor agregado de matrizes vegetais como ervas, sementes, folhas ou cascas é difícil devido à existência de estruturas diferentes no material. O material vegetal é geralmente triturado, antes do processo de extração, para aumentar a área de contato com o solvente supercrítico e também para aumentar a acessibilidade ao soluto presente no interior da estrutura celular, aumentando assim a cinética de transferência de massa. Isto permite descrever as partículas resultantes utilizando geometrias básicas como cilindro ou esfera. Algumas simplificações acerca de como o soluto está distribuído no interior do sólido (adsorvido na rede de poros, amarrado dentro das estruturas celulares ou homoganeamente distribuído no interior da partícula) e sobre o mecanismo envolvido na cinética de transferência de massa (resistência interna de transferência de massa, resistência externa de transferência de massa ou a combinação de várias resistências), são necessárias para reduzir a complexidade do modelo matemático (OLIVEIRA et al., 2011).

Há vários modelos empregados para descrever a extração supercrítica (ESC) de óleos ou outros componentes de materiais vegetais. Todos eles consideram que as partículas estão empacotadas dentro da coluna do extrator. As simplificações empregadas pela maioria dos autores são que a operação é isotérmica, a queda de pressão no interior do extrator é desprezível, e a porosidade do leito e a densidade do sólido são constantes durante a extração. Além disso, é usual assumir que a densidade e a velocidade do fluido e a dispersão axial permanecem quase constantes, pois o escoamento do soluto no fluido supercrítico é baixo, entretanto vários autores têm considerado a dispersão axial negligenciável. Essas suposições reduzem o número de equações necessárias usadas no balanço de massa, relações de equilíbrio e leis cinéticas para descrever o processo de extração (Mc HUGH e KRUKONIS, 1986).



O balanço de massa para a fase sólida dentro do extrator é condicionado pelas simplificações assumidas por cada autor, levando em conta a composição da matriz sólida e a cinética de extração.

Na literatura podemos encontrar a descrição de alguns modelos usados para descrever as cinéticas de ESC. Modelos como os de Crank (1975), Tan e Liou (1989), Goto et al. (1993), Sovová (1994), Esquivel et al. (1999a) e Martinez et al. (2003) entre outros são geralmente utilizados. Na Tabela 3 podemos encontrar as considerações acerca de alguns modelos matemáticos baseados na transferência de massa.

Tabela 3. Modelos matemáticos baseados na transferência de massa para ESC de produtos naturais.

Referência	Modelo	Considerações
Glueckauf e Coates, (1947)	Força motriz linear, considerando partícula sólida esférica.	Fluxo de transferência de massa é proporcional a diferença entre a média da concentração do soluto na partícula e a concentração do soluto em equilíbrio com a fase fluida.
Crank (1975)	Modelo de difusão	Modelo de transferência de massa desenvolvido como uma analogia da transferência de calor em partícula esférica. A segunda lei de Fick foi aplicada para a difusão na modelagem.
Recasens et al. (1989)	Força motriz linear, considerando partícula sólida porosa.	Fluxo de transferência de massa, onde duas aproximações da força motriz linear são empregadas, uma entre a fase fluida e o fluido nos poros do sólido, e a outra entre a fase fluida nos poros e a fase sólida.
Tan e Liou (1989)	Modelo empírico	Transferência de massa definida com a cinética de extração de primeira ordem, negligenciando a dispersão axial e a difusão intrapartícula.
Goto et al. (1993)	Placa simples e porosa	A extração ocorre com o efeito da dessorção e diferenciação da concentração do soluto no interior da partícula a partir da concentração nos poros.
Sovová (1994)	Células intactas e células quebradas	O pré-tratamento resulta em partículas com células intactas e quebradas. A cinética de extração de células quebradas é mais rápida do que de células intactas. O mecanismo de transferência de massa em células quebradas é a convecção, enquanto que para células intactas é a difusão molecular.
Goto et al. (1996)	Modelo de encolhimento de núcleo.	Existência de uma nítida fronteira entre as partes extraídas e não extraídas da partícula. Todo o soluto deixa a partícula por convecção. Toma a difusividade efetiva como parâmetro.
Reverchon e Marrone (1997)	Modelo de difusão	O fenômeno de transferência de massa é proposto para ser similar aquele descrito com um único pseudocomponente. Não há resistência interna. Relação de equilíbrio linear. A dispersão axial e a resistência externa foram

Perrut et al. (1997)	Partículas porosas		avaliadas. O fenômeno de transferência de massa é proposto para ser similar aquele descrito com um único pseudocomponente. O fenômeno de difusão dentro da partícula e o mecanismo de fluido-dinâmica de transferência de massa fora da partícula são considerados.
Esquível et al. (1999 a, b)	O modelo empírico		Caracterizado para ser um modelo muito simples, com somente um parâmetro ajustável.
Reverchon e Marrone (2001)	Células intactas e células quebradas	e	Mecanismo de resistência em paralelo, no qual tanto as células quebradas quanto as células intactas transferem soluto para o fluido com uma cinética diferente.
Martinez et al. (2003)	Modelo logístico		O extrato é uma mistura de compostos ou grupo de compostos com estrutura química similar. Neste modelo, o termo de transferência de massa interfacial foi descrito como uma função logística com dependência com a composição do extrato durante o processo.
Sovová (2005)	Células intactas e células quebradas	e	O soluto de células quebradas difunde-se diretamente para a fase fluida, enquanto o soluto de células intactas difunde-se apenas para as células quebradas, o que configura um modelo de resistência em série, portanto são desenvolvidos dois balanços materiais.
Fiori et al. (2009)	Células intactas e células quebradas e encolhimento do núcleo	e	O decréscimo do pseudocoefficiente de transferência de massa é proporcional à distância da superfície das partículas. Três abordagens são propostas para calcular o valor do pseudocoefficiente de transferência de massa: (a) empregar uma função contínua em todas as partículas para calcular a dependência do coeficiente com o raio do núcleo – modelo contínuo; (b) usar um pseudocoefficiente constante até que a primeira camada esteja esgotada, e então usar uma função contínua do raio do núcleo – modelo semi-contínuo; (c) usar uma valo constante do coeficiente para cada camada – modelo discreto.

Os modelos difusivos requerem que sejam conhecidas a geometria da fase sólida e a porosidade da matriz sólida. Além disso, para estes modelos o esforço computacional para a resolução das equações é grande, em virtude da necessidade de se determinar o perfil de concentração do composto a ser extraído na partícula.

Outros autores têm preferido usar modelos empíricos, os quais se tornam possíveis após várias simplificações, e apresentam solução analítica. Dentre eles destacam-se Tan e Liou (1989), que considera a cinética de extração como sendo de primeira ordem em relação às concentrações do óleo no sólido. Souza et al. (2008),

considera a cinética de extração como sendo de segunda ordem e os compostos bioativos a serem extraídos como pseudocomponentes.

Os modelos empíricos de cinética de extração não consideram a variação da concentração do composto no interior da partícula (modelos de parâmetros concentrados), portanto, o esforço computacional é reduzido, pois a concentração desta substância na matriz sólida depende apenas da posição das partículas no interior do leito e do tempo.

Considerando a grande importância que tem sido atribuída aos processos de extração com fluidos supercríticos, optou-se em determinar os parâmetros de transferência de massa mais relevantes via modelagem matemática empírica de segunda ordem do processo na extração de compostos bioativos de *Piper regnellii*.

### 3.3. ESTADO DA ARTE

Durante o período de desenvolvimento do presente trabalho não foi encontrado, nos bancos de dados de literatura específica pesquisados, estudos relacionados a extração de compostos bioativos de *Piper regnellii* utilizando fluido pressurizado. No entanto, devido ao grande potencial medicinal dos compostos bioativos presentes no gênero *Piper*, já são relatados alguns estudos que envolvem a extração supercrítica de espécies deste gênero (ASHRAF-KHORASSANI et al., 1999; BILIA et al., 2004; FERREIRA et al., 1999; FERREIRA e MEIRELES, 2002; HUSSAIN et al., 2010; KUMORO et al., 2010). Como foi mostrado anteriormente existem trabalhos relacionando atividades biológicas dos compostos ativos presentes na *Piper regnellii* usando solventes orgânicos, mas não há estudos relacionados com as atividades biológicas e antioxidantes a partir de extratos obtidos via ESC. Além disso, em nosso estudo, a ESC possibilitou a extração mais seletiva de neolignanas, diferentemente dos métodos convencionais de extração. O modelo matemático proposto para representar as curvas cinéticas de ESC tem como hipóteses, assim como a maioria dos modelos matemáticos propostos para a modelagem matemática de ESC, a temperatura constante, queda de pressão desprezível, densidade e porosidade constante ao longo do extrator. No entanto, uma das vantagens do método matemático proposto é o cálculo de um único parâmetro de transferência de massa a constante cinética,  $k$ , para representar as curvas cinéticas de ESC experimentais.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão apresentadas as metodologias utilizadas para extração, identificação e quantificação dos compostos bioativos, eletromicrografias, atividades biológicas e antioxidantes e finalmente a modelagem das curvas cinéticas da ESC.

### 4.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e os caules da *Piper regnellii* foram coletados de espécimes do “Horto Didático de Plantas Medicinais Prof<sup>a</sup> Irenice Silva” no campus da Universidade Estadual de Maringá em Setembro de 2010. A exsicata da espécie estudada encontra-se depositada como material testemunho no Herbário da Universidade Estadual de Maringá, sob número de registro HUM 8392.

O material botânico foi seco em estufa de ar circulante (MARCONI, MA035/5) a temperatura de 40°C. Após 72 horas de secagem separaram-se as folhas dos caules para que fossem moídas em moinho de facas.

Peneiras do tipo Tyler foram utilizadas para a classificação das amostras, segundo sua granulometria. As folhas que ficaram retidas entre as malhas 20-30 (#20=0,850mm e #30=0,600mm) e 30-50 (#50=0,300mm) mesh foram escolhidas para as extrações, uma vez que possuem um tamanho que favorece a extração sem entupir o equipamento supercrítico. Utilizaram-se também os caules que ficaram retidos entre as malhas 20-30.

### 4.2 EXTRAÇÃO

#### 4.2.1 Solvente Orgânico (Soxhlet)

A extração de compostos bioativos por solvente orgânico foi realizada segundo Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz(2004). Na extração com solvente orgânico utilizou-se um aparelho Soxhlet de 500 mL, ilustrado na Figura5 Adicionaram-se separadamente cerca de 3,0 g das folhas e dos caules em cartuchos de papel filtro amarrados com fios previamente desengordurados e 300 mL de cada um dos solventes, sendo eles diclorometano(MERCK, 99,6 % de pureza) e hexano (MERCK, 99,6 % de pureza). Os solventes orgânicos utilizados nas extrações foram escolhidos devido às diferenças de suas polaridades e constantes dielétricas. O hexano é um solvente apolar e o diclorometano é um solvente polar e suas constantes dielétricas são iguais a 1,88 e 8,93, respectivamente.

O sistema foi mantido em refluxo durante 8 horas. Evaporou-se o excesso de solvente em rota evaporador (IKA, RV10) e o material remanescente foi acondicionado em estufa (NOVA ÉTICA 400/4ND) até peso constante ( $\pm 0,01\text{g}$ ) sendo a  $40^\circ\text{C}$  quando realizada a extração com diclorometano e a  $70^\circ\text{C}$  na extração com hexano, e colocou-se no dessecador até que atingisse a temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em relação à massa da amostra inicial.

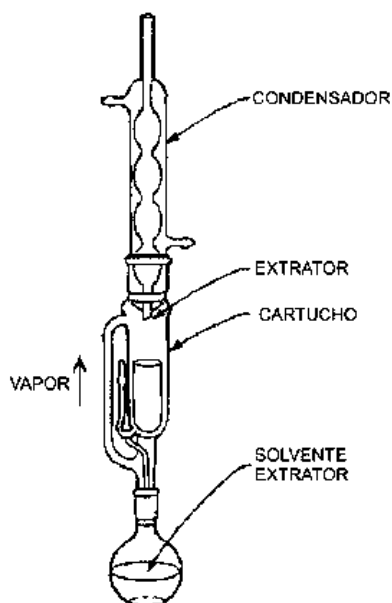


Figura 5. Aparelho Soxhlet.

#### 4.2.2 Extração Solvente Pressurizado

Os experimentos foram realizados em uma unidade de escala laboratorial, que consiste basicamente de um cilindro de  $\text{CO}_2$  (AIR LIQUIDE, com 95% de pureza), dois banhos termostatizados, uma bomba seringa (ISCO, Modelo 500D) e um extrator com volume interno de aproximadamente 170 mL (diâmetro do leito é de 2,85 cm e altura do leito é 26,1 cm), conforme mostra a Figura 6.

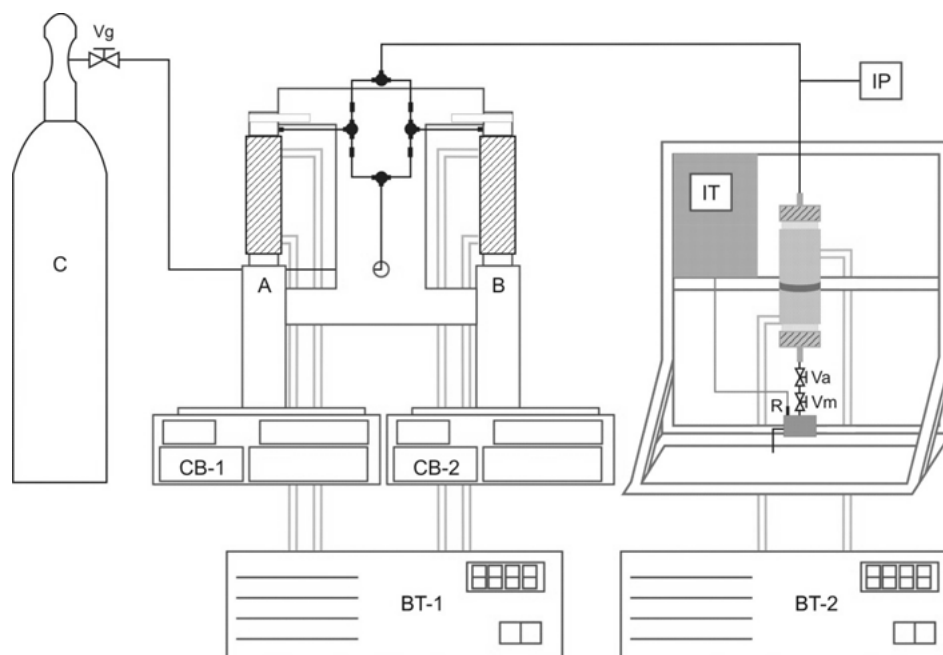


Figura 6. Aparato experimental utilizado para a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico: C – Cilindro de CO<sub>2</sub>; A, B – Bomba do tipo seringa; CB1, CB2 – Controlador da bomba; IP – Indicador de pressão; IT – Indicador de temperatura; Vg – Válvula globo; Va – Válvula agulha; Vm – Válvula micrométrica; R1 – Reservatório de coleta; BT1, BT2 – Banho termostático.

Materiais vegetais possuem uma natureza complexa, e a extração de seus compostos é influenciada pelas condições do processo como temperatura, pressão, solvente utilizado, vazão do solvente e solubilização do composto de interesse. Quando o soluto é uma matriz sólida a cinética de extração é dependente de condições experimentais. Temperatura e pressão afetam a cinética e controlam a densidade e o poder de solvatação do solvente.

Segundo Meireles (2009) pressões entre 150 e 400 bar e temperaturas de 40 à 60 °C são comumente utilizadas para a extração de compostos fenólicos, terpenóides e substâncias ativas biologicamente. A área destacada na Figura 7 mostra a região indicada para a extração destes compostos.

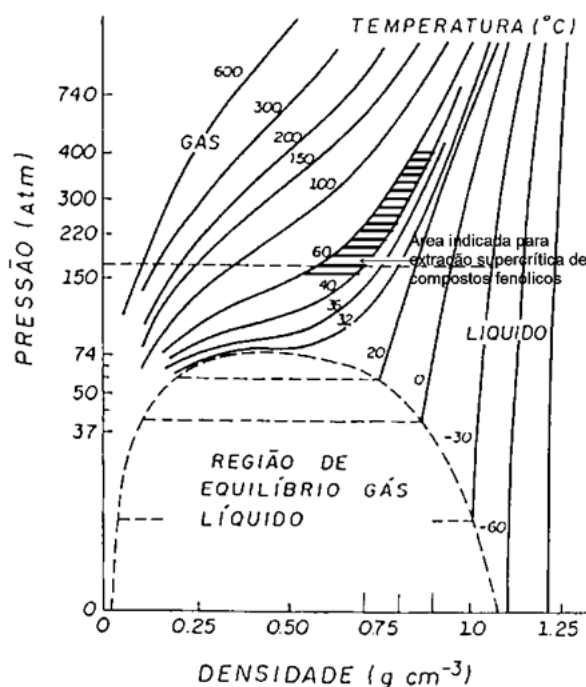


Figura 7. Dependência da densidade do CO<sub>2</sub> da pressão e temperatura e condições usuais para a extração de compostos fenólicos. *Fonte: Cardozo-Filho, 1999.*

Sendo assim, utilizaram-se 5 combinações destes parâmetros para a extração de cada granulometria escolhida das amostras, apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros operacionais de ESC utilizados nos experimentos.

<b>Pressão (bar)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Vazão (mL/min)</b>
109,2	40	0,681	3
150,0	40	0,781	3
176,7	60	0,681	3
244,1	60	0,781	3
250,0	40	0,880	3

Os níveis de variação dos parâmetros operacionais da ESC foram definidos com base na região da Figura 7 proposta para a extração de compostos fenólicos, terpenóides e substâncias ativas biologicamente.

Primeiramente foi feito um teste preliminar com as folhas a fim de comparar a influência do tamanho das partículas no rendimento final da extração. Na intenção de que o volume preenchido com as folhas dentro do extrator fosse o mesmo, os testes preliminares foram realizados com amostras de peso em torno de 20 g e 35 g para as

amostras de mesh 30 e mesh 50, respectivamente. Uma vez que as folhas de menores tamanhos ficam mais compactadas dentro do extrator.

Na seqüência realizaram-se separadamente extrações com 20 g das folhas e 30 g dos caules de mesh 30 em tempo de 280 e 260 minutos, respectivamente.

Para a formação do leito, o material vegetal triturado foi acomodado uniformemente na parte inferior do extrator, o restante da célula de extração foi preenchida com esferas de vidro (leito inerte). Dessa maneira, o dióxido de carbono, alimentado ao extrator, passava inicialmente pelo leito inerte e posteriormente pela matriz vegetal.

A seqüência dos procedimentos experimentais é descrita a seguir:

- 1) Inseriu-se a amostra no extrator;
- 2) Ajustou-se a Temperatura do banho termostatizado;
- 3) Ligou-se o banho de refrigeração na temperatura de 0°C;
- 4) Atingida a temperatura operacional, ligou-se a bomba de alta pressão. A pressurização se deu simultaneamente na bomba e no extrator;
- 5) Alcançada a pressão operacional, aguardou-se um tempo, estipulado previamente em 30 min, para que os gradientes de temperatura e de pressão fossem quase eliminados;
- 6) Após a vazão volumétrica indicada pela bomba tipo seringa estivesse zerada, anotava-se o volume de solvente remanescente na bomba e iniciava-se a extração;
- 7) O frasco coletor era pesado a cada 10 minutos durante a primeira hora, e a cada 20 minutos nas demais horas. A cada pesagem de frasco anotava-se também o volume de CO<sub>2</sub> remanescente na bomba. A extração era finalizada até a retirada total dos solutos de interesse, ou seja, até que a massa instantânea ( $\text{massa}_{\text{extraída}}/\text{tempo}$ ) não mais alterasse;
- 8) As amostras foram fechadas, lacradas e mantidas ao abrigo da luz.

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS

#### 4.3.1 Identificação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro Varian (VARIAN, MERCURY PLUS 300BB) na frequência de 300,060 e 75,458 MHz para hidrogênio e carbono, respectivamente, para identificação dos constituintes químicos. Foram utilizados 800 µL do solvente clorofórmio Deuterado-CDCl<sub>3</sub>(CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, 99,8% de pureza) para 20 mg de cada extrato. Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna.



## 4.3.2 Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação dos compostos bioativos foi baseada em metodologia descrita por Felipe et al. (2006) e realizada através de análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em equipamento Varian modelo 920LC com detector ultravioleta-visível, equipado com bomba quaternária e injetor automático, controlado pelo software Galaxie. Utilizou-se para as curvas de calibração soluções de conocarpano e eupomatenóide-5 isolados de extrato supercrítico (176,7 bar e 60°C), segundo metodologia que segue no tópico 4.3.2.1, em concentrações que variam de 10 à 310 µg/mL em metanol (J. T. BAKER, 99,8% de pureza).

Soluções dos extratos de pariparoba foram preparadas em metanol a uma concentração de 1000 µg/mL e filtradas em uma membrana filtro de 0,45 µm (MILIPORE). Foi utilizada a coluna Metasil ODS, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm, mantida a 30 °C. A separação foi realizada em um sistema isocrático, usando como fase móvel acetonitrila (J. T. BAKER, 99,99% de pureza):água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial (MERCK, 100% de pureza), com fluxo de 1 mL/min. A detecção ocorreu a 280 nm e o tempo de corrida foi de 20 min. O volume de amostra injetada era de 20 µL. As análises foram realizadas em duplicata.

## 4.3.2.1 Purificação dos compostos

Para a cromatografia em coluna de adsorção foi utilizado 645 mg de extrato bruto obtido por via supercrítica a 176,7 bar e 70 °C, coluna de vidro com 1,5 cm de diâmetro e 25,0 cm de comprimento, preparada segundo os procedimentos descritos por Collins et al. (1997). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (MERCK, 70-230 mesh) e como fase móvel foram desenvolvidos vários sistemas eluentes, com solventes puros ou misturas de dois solventes. As frações foram eluídas pelos solventes em ordem crescente de polaridade e coletadas em tubos de ensaio, como segue na Tabela 5.

Tabela 5. Sistemas eluentes para as cromatografias em coluna de adsorção.

Sistema Eluente	Proporção	Quantidade utilizada (mL)	Fração
Hexano	–	200	1-14
Hexano:Clorofórmio	98:2	50	15-18
Hexano:Clorofórmio	90:10	50	19-22
Hexano:Clorofórmio	50:50	80	23-28
Clorofórmio	–	180	29-47

Acetato de Etila	–	50	48-52
Metanol	–	30	53-54

Para realização da cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas placas de vidro de 5,0 x 10,0 cm preparadas com 0,25 mm de sílica gel GF<sub>254</sub> (MERCK), ativadas à 105-110 °C por 30 min. de acordo com Collins et al. (1997), ou cromatoplasas pré-fabricadas de alumínio Kieslgel 60 F<sub>254</sub> (MERCK), 20,0 x 20,0 cm com 0,2 mm de espessura. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de hexano:acetato de etila (90:10).

A visualização das substâncias nas placas de CCD foi realizada após revelação em vanilina sulfúrica (2%). Os eluentes utilizados para cromatografia em coluna e camada delgada foram de grau p.a. (NUCLEAR).

Após a visualização da CCD, as frações de interesse: F31, F32, F33, F34 e F35 foram reunidas de acordo com o comportamento cromatográfico e denominadas de F31-35; F-45, F-46 e F-47 foram também reunidas e nomeadas F-45-47. Essas frações foram analisadas por RMN-<sup>1</sup>H em clorofórmio deuterado onde se comprovou, com a ajuda de dados espectrais já obtidos por Pessini et al. (2005), a existência das substâncias eupomatenóide-5 e conocarpano com alta pureza, respectivamente, que foram usados como padrões na análise de CLAE. Os espectros da ressonância magnética nuclear de hidrogênio dessas frações podem ser observados nas Figuras 8 e 9.

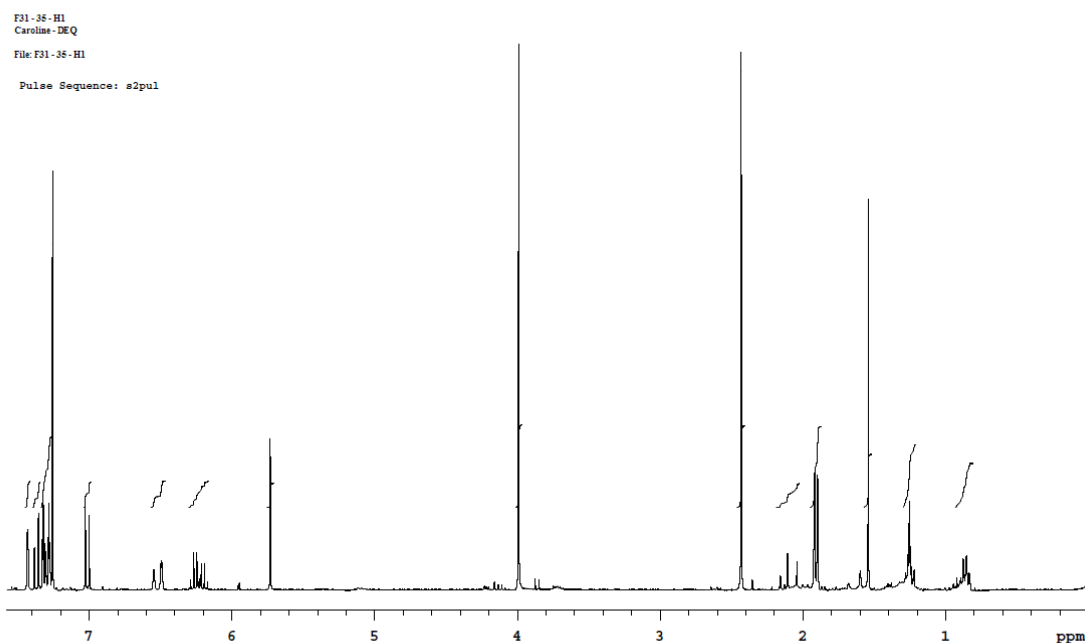


Figura 8. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz para o composto eupomatenóide-5 em solvente CDCl<sub>3</sub>.

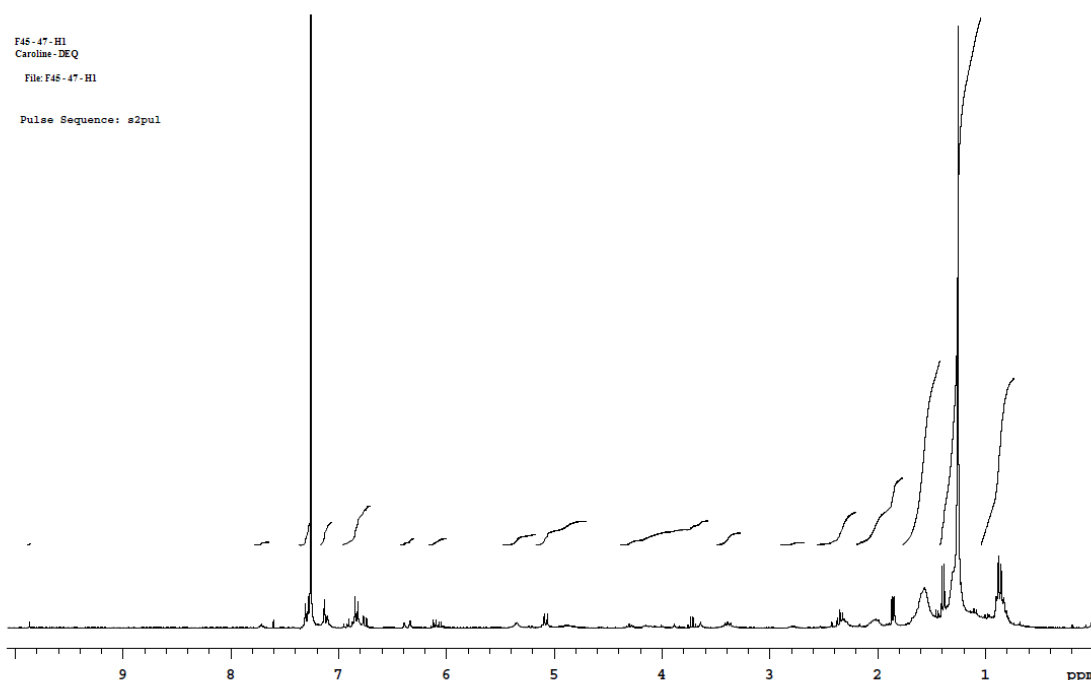


Figura 9. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz para o composto conocarpano em solvente CDCl<sub>3</sub>.

#### 4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A caracterização microestrutural das folhas e caules de *Piper regnellii* pré e pós extração foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio Shimadzu modelo SuperScan SS-550 no laboratório de microscopia do GMPC-UEM, operado em 10 KeV. Todas as micrografias foram obtidas das superfícies das amostras recobertas com ouro.

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

##### 4.5.1 Atividade Contra Fungos Leveduriformes

Foram testadas as atividades fungicidas e fungistáticas de alguns extratos de *Piper regnellii*.

Para todos os extratos analisados, foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), determinadas pela metodologia de microdiluição em caldo, segundo o documento M27-A3 de 2011 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011). Como droga padrão, usou-se Fluconazol (SIGMA ALDRICH).

Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (AMRESCO, 99,9% de pureza) para uma concentração de 20 mg/mL, seguido de diluição com água destilada estéril até uma concentração de 500 µg/mL. As concentrações testadas dos extratos vegetais foram 0,49 a 250µg/mL.

Para o preparo do inóculo, as leveduras crescidas em Sauboraud foram suspensas em solução salina e a concentração ajustada em espectrofotômetro (QUIMIS, MODELO Q7980RM) para obter a concentração final de 0,5 a 2,5 x 10<sup>3</sup> células/mL. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (NUCLON) com meio de cultura RPMI (GIBCO), onde os extratos foram testados com as suspensões com leveduras, e incubadas a 35°C por 48 h. Como controle foi utilizado *C. parapsilosis* ATCC 22019, a fim de verificar a exatidão das diluições da droga e a validação dos resultados.

Foram utilizadas para os testes cepas de *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. albicans* (ATCC 90028) e *C. glabrata* (ATCC 90030).

ACIM foi definida no primeiro poço com uma redução significativa no crescimento, em comparação com a do controle positivo (microrganismos + meio de cultura) e o esquema deste ensaio está apresentado na Figura 10. A Figura 11 representa a CFM (Concentração fúngica mínima), que foi definida como a menor concentração resultando em subculturas negativas.

	250	125	62.5	31.25	15.625	7.81	3.906	1.953	0.977	0.49		
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

CP CN  
 ↑ ↑

Figura 10. Esquema para determinação da CIM para leveduras em microplacas.

A leitura é realizada após 48h, observando o crescimento nas diluições, o CP (controle positivo) deve apresentar crescimento e o CN (controle negativo: extratos + meio de cultura) nenhum.

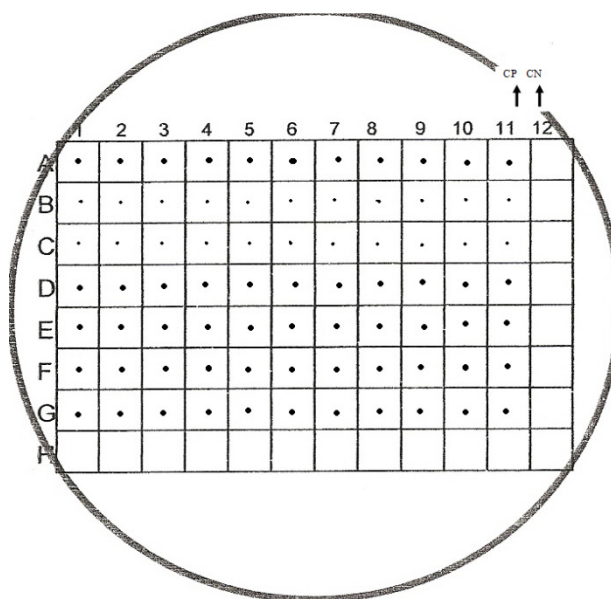


Figura 11. Esquema para CFM.

#### 4.5.2 Atividade Contra Fungos Filamentosos

Para os extratos analisados, foram determinadas as Concentrações Inibitória Mínima (CIMs), determinadas pela metodologia de microdiluição em caldo, segundo o documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Como droga padrão, usou-se Terbinafina (NOVARTIS).

Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (AMRESCO, 99,9% de pureza) para uma concentração de 20 mg/mL, seguido de diluição com água destilada estéril para uma concentração final de 500 µg/mL. As concentrações testadas dos extratos vegetais foram de 0,98 a 500 µg/mL.

A cepa de *T. rubrum* (ATCC 28189) foi testada e, como controle, *T. mentagrophytes* (ATCC 11481).

Para o preparo do inóculo, os fungos foram suspensos em solução salina e a quantificação foi feita pela contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, essas suspensões foram diluídas em meio RPMI1640 (GIBCO), acrescido de 2% de glicose, para obtenção de  $2 \times 10^3$  até  $6 \times 10^3$  UFC/mL.

O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (NUCLON), onde os extratos foram testados frente aos fungos em questão, e incubadas a 35 °C por 4 à 7 dias.

ACIM foi definida no primeiro poço com uma redução significativa no crescimento, em comparação com a do controle positivo (microrganismos + meio de cultura).

#### 4.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As análises da atividade antibacteriana foram realizadas com alguns dos extratos obtidos por extração supercrítica e pelos extratos obtidos com os solventes orgânicos, segundo metodologia que segue.

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram testadas as cepas de *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* resistente (ATCC 43300) e *E. coli* (ATCC 25922). Os antibióticos empregados para o controle de qualidade do teste foram Vancomicina, Oxacilina e Ciprofloxacino (SIGMA ALDRICH).

As cepas ATCC em 3ª geração (3º repique) foram inoculadas em caldo Tripicaseína Soja (DIFCO) e mantidas a 37 °C por 6 horas. Depois de semeadas em placas de petri contendo esse mesmo caldo as bactérias foram mantidas por 16 a 20 horas em estufa a 37 °C.

A concentração inibitória mínima (CIM) de todos os extratos vegetais e dos antibióticos de referência foi determinada através da técnica de micro diluição em caldo Mueller-Hinton (DIFCO) cations ajustados (CAMHB), conforme recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Para a determinação da CIM utilizou-se microplacas de 96 poços (INLAB), conforme esquema apresentado na Figura 13. A interpretação do controle de qualidade com os antibióticos padrões foi realizada segundo critérios do CLSI (2011).

Os extratos vegetais foram preparados na concentração de 1000 µg/mL, utilizando 100 µL de dimetil-sulfóxido DMSO (AMRESCO, 99,9% de pureza) e 900 µL do meio CAMHB. Os antibióticos padrões foram diluídos nas placas em concentrações variando de 0,15 à 300 µg/mL para Vancomicina e Oxacilina, e 0,03 à 64 µg/mL para Ciprofloxacino, respectivamente. As concentrações testadas dos extratos vegetais foram 0,98 a 500 µg/mL.

Os inóculos bacterianos foram preparados em CAMHB e ajustados pela escala de Mc Farland de modo a fornecer um inóculo de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

A CIM foi definida como a menor concentração dos extratos e antibióticos padrões em que os microorganismos testados não demonstram crescimento visível.

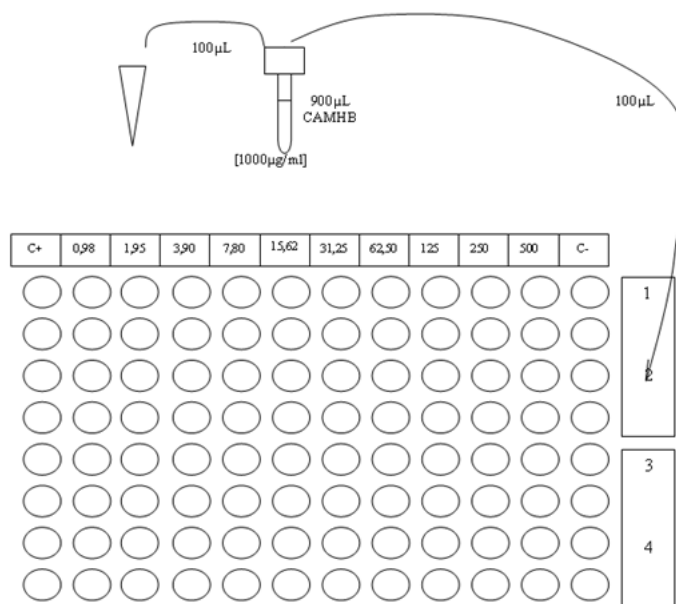


Figura 12. Esquema para determinação da CIM em micro placas.

#### 4.7 CITOTOXICIDADE

As análises da citotoxicidade foram realizadas com alguns dos extratos obtidos por extração supercrítica, segundo metodologia de Skehan et al., 1990.

Preparou-se uma suspensão de células LLC-MK<sub>2</sub> (originária do rim de *Macaca mulatta*) contendo  $2,5 \times 10^5$  células/mL em meio de cultura DMEM (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), e antibiótico gentamicina (HIPOLABOR), distribuiu-se 100 µL por poço da suspensão em microplacas de 96 poços deixando-se poços sem células para o branco, a placa foi mantida a 37 °C em estufa úmida com tensão de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Preparou-se uma solução estoque de cada extrato na concentração de 1000 µg/mL, após a formação da monocamada, o meio foi retirado e as células foram tratadas com 100 µL das concentrações (100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL) e ainda adicionou-se 100 µL de DMEM com gentamicina, o ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração de droga. Os poços foram identificados, deixando-se alguns para o controle de células (células sem tratamento) e após incubou-se por 72 horas nas condições citadas anteriormente. Nos controles de células adicionou-se 200 µL de DMEM com gentamicina.

Em seguida, retirou-se o meio de todos os poços e lavaram-se as células com 100 µL/poço com PBS. As células foram fixadas com 50 µL/poço de ácido tricloracético 10% (SYNTH). Levou-se a microplaca para geladeira por 1 hora ao abrigo da luz, verteu-se o

ácido tricloroacético, lavou-se com água corrente 3 vezes, por último com água destilada. Deixou-se a microplaca a temperatura ambiente para secagem.

Para a revelação e leitura adicionou-se 50 µL/poço de sulforodamina B (0,4 % p/V em 1 % de ácido acético, SIGMA) na placa seca. Levou-se a microplaca a geladeira por 30 minutos (ao abrigo da luz). Em seguida, removeu-se o corante lavando-se 4 vezes com ácido acético 1% (FMAIA). Adicionou-se 150 µL/poço de Tris-base 10 mM (GIBCO), para dissolver o corante ligado as células viáveis. Agitou-se a microplaca e realizou-se a leitura da absorbância em leitor de ELISA (BIO-TEK, MODELO POWER WAVE XSA) em 530 nm.

## 4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.8.1 Método de Redução do radical Estável DPPH•

O método é baseado na metodologia de Brand-Williams et al. (1995), utilizando o radical estável DPPH• que sofre redução pelos antioxidantes com mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra.

Preparou-se uma solução estoque com 0,024 g do reagente DPPH• (SIGMA ALDRICH) diluídas em 100ml de metanol (FMAIA, com 99,8% de pureza) que foi mantida a -20°C, até sua utilização. Retirou-se 10ml da solução estoque e adicionou-se 45ml de metanol para preparar a solução trabalho que foi utilizada para a reação do DPPH• com os extratos. Leu-se a absorbância desta solução a 515 nm no espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1203 (a absorbância deve ser próxima de 1,1).

Os extratos foram diluídos em metanol em concentrações que variaram de 0,33 à 5 mg/mL a fim de que após a adição da solução trabalho as concentrações finais fossem de 17 µg/mL à 250 µg/mL.

A cada teste 2850 µL da solução trabalho eram adicionados a 150 µL da amostra (volume final de 3,0 ml). Para o controle negativo substituiu-se o volume das amostras pela mesma quantidade de água destilada, e para o controle positivo por BHT (SIGMA ALDRICH) 0,02 % (preparado a solução em etanol p.a).

O cálculo do percentual de atividade antioxidante (AA) foi realizado como segue:

$$AA \% = (1 - \text{Abs. amostra} / \text{Abs. controle negativo}) \times 100$$

Foi construída uma curva para cada extrato, onde no eixo x tinha-se a concentração final de extrato em (µg/mL) e no eixo y os valores da atividade antioxidante.



Encontrou-se o  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) que refere-se à concentração de extrato ( $\mu\text{g/mL}$ ) necessária para reduzir 50% do radical DPPH\*.

#### 4.8.2 Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais, o método descrito por Meda et al. (2005) com modificações foi empregado, porém utilizando-se o reagente de Folin-Denis (SIGMA ALDRICH, 100% de pureza) ao invés do reagente de Folin-Ciocalteu.

O reagente de Folin-Denis, embora não específico para uma determinada classe de metabólitos, detecta todos os fenóis, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos presentes em uma matriz. Desta forma pode-se utilizar esta metodologia para quantificação do total de fenóis, uma vez que ocorre a oxidação de qualquer fenol presente pela reação com o ácido fosfomolibdico e tungístico do reagente de Folin-Denis (Ferreira et al., 2004).

Soluções dos extratos em metanol (FMAIA, 99,8% de pureza) na concentração de 0,5mg/mL foram preparadas. A uma alíquota de 0,5 mL dessa solução adicionou-se 2,5 mL de solução contendo o reagente de Folin-Denis 10% (10 mL em 100 mL de água ultrapura), após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 14% (14 g em 100 mL de água ultrapura) (NUCLEAR, com 99,99% de pureza). Manteve-se a mistura incubada no escuro por 2 horas, onde a coloração da solução passou de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a medida de sua absorbância a 760 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU, MODELO UV-1203), utilizando-se como branco a mesma mistura de soluções preparadas para análise dos extratos, porém com metanol puro no lugar de solução dos extratos. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico da marca Vetec, em concentrações finais de 0,8 a 7  $\mu\text{g/mL}$  e expressos como g de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100 g de extrato.

#### 4.9 MODELAGEM MATEMÁTICA

A modelagem matemática proposta tem com objetivo geral calcular os parâmetros de transferência de massa relevante ao processo de extração supercrítica conduzida em escala laboratorial. Considerando que esses parâmetros (densidade aparente do leite, quantidade de material vegetal, solubilidade, constante cinética, e etc) determinam o processo de extração supercrítica e são altamente correlacionáveis em pequena e grande escala (MEIRELES, 2009).

As curvas cinéticas de extração usando CO<sub>2</sub> supercrítico dos compostos bioativos de pariparoba foram modeladas utilizando um modelo empírico de segunda ordem que não requer conhecimento do perfil axial de concentração da espécie química desejada ao longo de todo o leito de extração. Investigações prévias demonstram sucesso na modelagem da cinética de extração supercrítica utilizando esse tipo de modelo (SOUZA et al., 2008).

O modelo matemático assume as seguintes hipóteses:

- I. O processo é isotérmico e isobárico;
- II. A dispersão axial dentro do extrator é negligenciável;
- III. No início do processo o sistema está em equilíbrio;
- IV. Os compostos bioativos são tratados como pseudocomponente;
- V. O modelo é unidimensional e somente a coordenada do escoamento é considerada.

A equação do balanço de massa para os compostos bioativos (C.B.) na fase fluida resulta na seguinte equação diferencial:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{\rho_{leito}}{\varepsilon} \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (1)$$

Na qual  $C$  é a concentração dos compostos bioativos no solvente (g/cm<sup>3</sup>),  $q$  é a concentração dos compostos bioativos na matriz sólida (g<sub>C.B.</sub>/g<sub>sólido</sub>)  $\rho_{leito}$  é a densidade no leito (g/cm<sup>3</sup>),  $u$  é a velocidade (cm/min),  $t$  é o tempo de extração (min),  $\varepsilon$  é a porosidade do leito e  $z$  é a coordenada na direção axial do leito (cm). A equação (2) assume que a taxa de extração é proporcional ao produto da capacidade de extração da fase fluida ( $C_{eq} - C$ ) e a concentração dos compostos bioativos na matriz sólida  $q$ .

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -kq (C_{eq} - C) \quad (2)$$

Na qual  $k$  é a constante cinética (cm<sup>3</sup>/g min);  $C_{eq}$  é a concentração de equilíbrio dos compostos bioativos no solvente (g<sub>C.B.</sub>/cm<sup>3</sup>). As condições iniciais e de contorno são expressas pelas equações (3) e (4), respectivamente:

$$C(0, z) = C_{eq} \quad (3)$$

$$q(0, z) = q_0$$

$$C(t, 0) = \begin{cases} C_{eq} & t = 0 \\ 0 & t > 0 \end{cases} \quad (4)$$

Em que  $q_0$  (g de C.B. extraídos/g de sólido inerte) é a quantidade dos compostos bioativos inicial concentrado na matriz sólida depois da pressurização do extrator.

A equação (5) representa a solução analítica para o modelo.

$$\frac{C}{C_{eq}} = \begin{cases} 1 & t < t_r \\ 1 - \frac{1}{(e^A + e^{-B} - 1)} & t > t_r \end{cases} \quad (5)$$

Em que  $t_r = \left(\frac{L}{u}\right)$  é o tempo de residência,  $L$  é o comprimento da coluna (m) e  $u$

é a velocidade (m/min),  $A = \left(\frac{z}{u}\right)\beta$ ,  $B = \left(\frac{-tu + z}{\alpha u}\right)\beta$ ,  $\beta = kC_{eq}\alpha$  e  $\alpha = \left(\frac{\rho_{leito}q_0}{\varepsilon C_{eq}}\right)$ .

A massa dos compostos bioativos (C. B.) extraída como função do tempo foi calculada pela equação (6):

$$M_{C.B.} = \int_0^{t_e} C Q_f dt$$

$$= \begin{cases} C_{eq} Q_f t & t < t_r \\ C_{eq} t Q_f - \frac{C_{eq} Q_f \alpha}{\beta} \ln \left( e^{\frac{z\beta}{u}} + e^{\frac{-(tv+z)\beta}{\alpha u}} \right) & t > t_r \end{cases} \quad (6)$$

Sendo que,  $Q_f$  é o fluxo volumétrico de solvente e  $C$  é a concentração dos compostos bioativos na fase fluida na saída do extrator. A constante  $k$  foi determinada correlacionando os dados experimentais das extrações supercríticas conduzidas neste trabalho. Utilizou-se a função objetivo definida pela equação (7) no procedimento de ajuste da constante  $k$ .

$$F = \sum_{j=1}^{n_{exp}} \left( m_{B.C.j}^{MOD} - m_{B.C.j}^{n_{exp}} \right)^2 \quad (7)$$

Nesta equação  $m_{B.C.j}^{MOD}$  é massa calculada dos compostos bioativos extraídos utilizando o modelo de transferência de massa;  $m_{B.C.j}^{n_{exp}}$  é a massa dos compostos bioativos obtida experimentalmente, e  $n_{exp}$  é o número de dados experimentais da curva cinética. No cálculo do parâmetro do modelo foi utilizado o método numérico de otimização univariável da secção áurea que foi implementado num programa computacional em Linguagem FORTRAN.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão apresentados os resultados e as discussões sobre a extração, identificação e quantificação dos compostos bioativos, eletromicrografias, atividades biológicas e antioxidantes e finalmente a modelagem das curvas cinéticas da ESC.

### 5.1 EXTRAÇÕES

#### 5.1.1 Extração com solventes orgânicos

Os dados de rendimento de cada extração estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Rendimento das extrações usando solventes orgânicos.

Solvente	Rendimento (%)	
	Folhas	Caules
Hexano	4,5	3,7
Diclorometano	7,5	5,7

\*Rendimento (%) = (massa extraída/massa de amostra seca)\*100

Na Tabela7 são apresentadas algumas propriedades dos solventes utilizados nas extrações como viscosidade, temperatura de ebulição, constante dielétrica, energia de coesão e tensão superficial, que podem auxiliar no entendimento da influência destes parâmetros no rendimento de extração.

Tabela 7. Propriedades dos solventes.

	Viscosidade (mPa)	Temperatura de ebulição (°C)	Constante dielétrica	Energia de coesão (Jmol/mL)	Tensão superficial (cal/mol A <sup>2</sup> )
Hexano	0,3	69	1,9	200,8	25,8
Diclorometano	0,4	40	8,9	400,2	39,1

Na extração soxhlet o solvente é utilizado na temperatura de ebulição, e nesta condição, a tensão superficial e viscosidade do solvente são grandemente reduzidas quando comparadas com uma temperatura mais baixa, portanto o solvente pode alcançar os sítios ativos dentro da matriz com maior facilidade solubilizando os solutos (MORRISON e BOYD, 1981).

O efeito da temperatura mostrou-se significativo, mas não foi determinante na extração do soluto. A comparação entre os solventes mostrou que a extração é atribuída mais significativamente a polaridade do solvente do que a temperatura de processo.

### 5.1.2 Extração com CO<sub>2</sub> Presssurizado

#### 5.1.3.1 Avaliação da influência do tamanho das partículas

A Tabela 8 mostra os valores obtidos na análise de rendimento global para as duas granulometrias de folhas, selecionadas pelo critério de maior quantidade de material obtido no peneiramento, para os testes preliminares.

Tabela 8. Comparação de rendimentos da extração supercrítica das folhas de *Piper regnelli*.

Pressão(bar)	Temperatura(°C)	Rendimento (%)	
		Mesh 30	Mesh 50
109,2	40	0,6	0,7
150,0	40	1,3	1,6
176,7	60	1,6	1,5
244,1	60	2,4	2,4
250,0	40	2,0	2,0

\*Rendimento (%) = (massa extraída/massa de amostra seca)\*100

A fim de que o volume preenchido com as folhas dentro do extrator fosse o mesmo, os testes preliminares foram realizados com amostras de peso em torno de 20 g e 35 g para as amostras de mesh 30 e mesh 50, respectivamente. Uma vez que as folhas de menores tamanhos ficam mais compactadas dentro do extrator.

Os testes preliminares foram realizados objetivando o rendimento global para experimentos realizados nas mesmas condições operacionais, variando apenas o tamanho das partículas contidas no leito de extração. Observou-se que foi obtido praticamente o mesmo rendimento global para as mesmas condições de extração provavelmente devido à variação no tamanho da matriz sólida não ser significativa para as condições operacionais selecionadas. Assim, foi escolhida a granulometria de mesh 30 para os testes com os caules da matriz vegetal, uma vez que, esta condição proporcionará uma economia de matéria-prima bem como de recursos energéticos.

5.1.3.2 Extração supercrítica dos extratos de folhas e caules de *Piper regnellii*

Os resultados de rendimento global em base seca obtidos nos ensaios e os parâmetros de extração: pressão, temperatura, densidade e vazão para cada teste estão apresentados na Tabela 9, a seguir.

Tabela 9. Rendimentos e parâmetros da extração supercrítica.

Pressão(bar)	Temperatura(°C)	Densidade(g/cm <sup>3</sup> )	Vazão(mL/min)	Rendimento (%)*	
				Folhas	Caules
109,2	40	0,681	3	0,6	0,8
150,0	40	0,781	3	1,3	1,0
176,7	60	0,681	3	1,6	1,4
244,1	60	0,781	3	2,4	1,8
250,0	40	0,880	3	2,0	1,8

\*Rendimento (%) = (massa de compostos bioativos extraída/massa de amostra seca)\*100

Podemos observar uma grande quantidade de material extraído tanto nas folhas como nos caules de pariparoba. Durante a condução dos experimentos ficou evidente a diferença de coloração entre as amostras dos extratos obtidos em diferentes pressões. Os extratos obtidos a pressões mais baixas apresentaram uma coloração amarelada. Já os extratos obtidos nas pressões de 244,1 e 250 bar ofereceram uma coloração mais escura, variando de alaranjado à verde escuro. Muitas vezes um aumento na pressão pode resultar em um decréscimo da seletividade, como resultado da coextração de compostos que reduzem a pureza e conferem cor ao produto (GOTO et al., 1993).

Com o aumento de densidade a uma temperatura constante, o rendimento de extração e a solubilidade do composto aumentam, conseqüentemente uma maior variedade de compostos é extraída.

Nas Figuras 13 e 14 encontram-se as curvas cinéticas de extração para os ensaios das folhas e dos caules, respectivamente. Elas descrevem o comportamento da massa acumulada de extrato obtida em base seca para cada um dos experimentos.

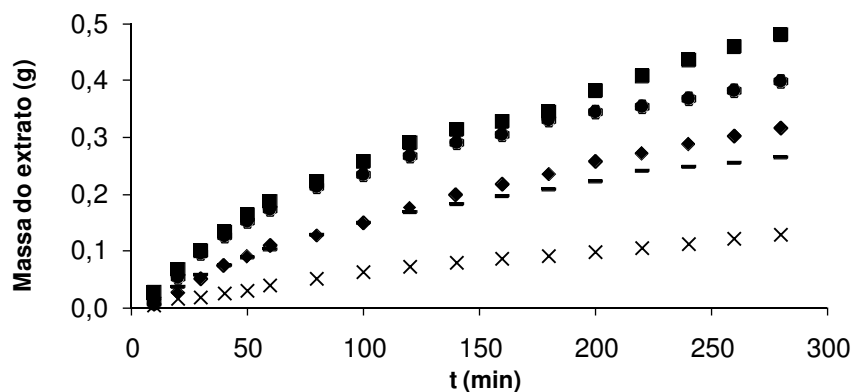


Figura 13. Curva de extração supercrítica para as folhas de *Piper regnellii*. (X) P = 109,2 bar/40 °C; (-) P = 150,0 bar/40 °C; (◆) P = 176,7 bar/60 °C; (■) P = 244,1 bar/60 °C; (●) P = 250,0 bar/40 °C.

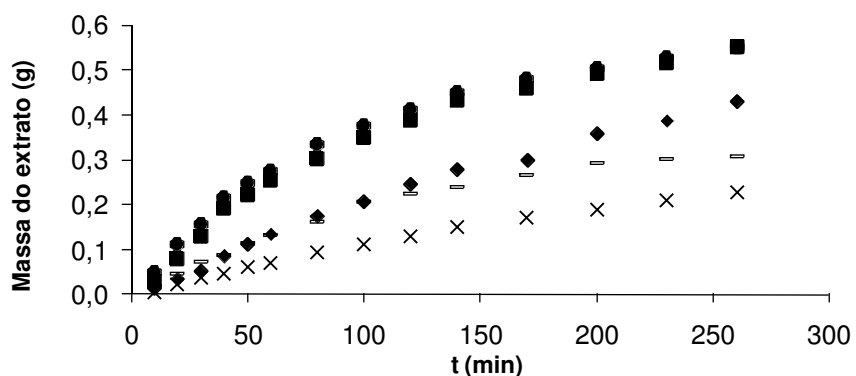


Figura 14. Curva de extração supercrítica para os caules de *Piper regnellii*. (X) P = 109,2 bar/40 °C; (-) P = 150,0 bar/40 °C; (◆) P = 176,7 bar/60 °C; (■) P = 244,1 bar/60 °C; (●) P = 250,0 bar/40 °C.

Ao se comparar os resultados obtidos na ESC com CO<sub>2</sub> (Tabela9) com os da extração por soxhlet (Tabela 6), pode-se observar um maior rendimento na extração com solventes orgânicos. Esse comportamento pode ser atribuído ao tempo de extração prolongado o contínuo contato solvente/soluto empregados na técnica convencional.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

## 5.2.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os extratos das folhas e dos caules de *Piper regnellii* obtidos por extração supercrítica e soxhlet foram submetidos a RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , com o objetivo de verificar a presença das substâncias Eupomatenóide-3, Eupomatenóide-5, Eupomatenóide-6 e Conocarpano no extrato.

## 5.2.1.1 Eupomatenóide-3

A fórmula estrutural  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_3$  para o Eupomatenóide-3 está demonstrada na Figura 15.

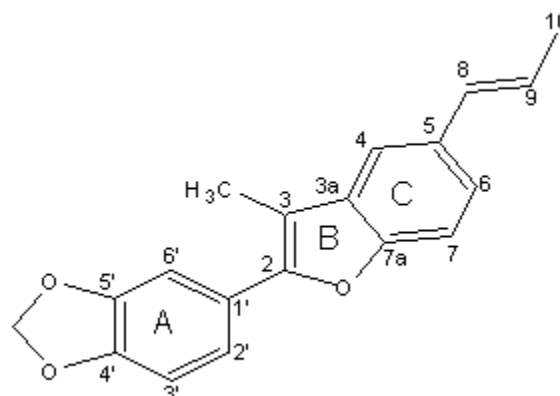


Figura 15. Estrutura química do eupomatenóide-3.

Os valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  encontrados na literatura para a substância acima são apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente, conforme a ordem de numeração (PESSINI et al., 2003b).

Tabela 10. Dados de RMN- $^1\text{H}$  (300MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para o eupomatenóide-3 descritos na literatura.

H	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)										
	4	6	7	8	9	2'	3'	6'	CH <sub>3</sub> -3	CH <sub>3</sub> -10	-OCH <sub>2</sub> O-
Eupomatenóide-3	7,41	7,27	7,35	6,51	6,21	7,28	6,90	7,26	2,40	1,90	6,00
	(d)	(dd)	(d)	(dq)	(dq)	(dd)	(d)	(s)	(s)	(dd)	(s)

Tabela 11. Dados de RMN- $^{13}\text{C}$  (75MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para o eupomatenóide-3 descritos na literatura.

$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
C	Eupomatenóide-3



1'	125,59
2	151,09
3	110,20
3 <sup>a</sup>	131,52
4'	147,48
5	132,78
5'	148,04
7 <sup>a</sup>	153,00
<b>CH</b>	
2'	120,94
3'	108,59
4	116,22
6	122,41
6'	107,19
7	110,71
8	131,35
9	124,31
<b>CH<sub>3</sub></b>	
10	18,37
CH <sub>3</sub> -3	9,31
<b>O-CH<sub>2</sub>-O</b>	101,28

Pode-se observar que o grupo caracterizador da molécula é o  $-\text{OCH}_2\text{O}-$  que tem um sinal típico de singlete em torno de 6,00 ppm e outro sinal em 101,28 ppm para os espectros de hidrogênio e carbono, respectivamente. Assim foram comparados os deslocamento químicos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos extratos segundo esse grupo, conforme Tabela 12.

Tabela 12. Dados de RMN- $^1\text{H}$  (300MHz) e RMN- $^{13}\text{C}$  (75MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para os extratos de *Piper regnellii* referente ao grupo característico do eupomatenoíde-3.

Extratos	$\delta$ do grupo $-\text{OCH}_2\text{O}-$ (ppm)			
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules
<b>ESC</b>				
P=109,2 bar/T=40 °C	6,019	6,016	*	*
P=150,0 bar/T=40 °C	6,012	6,014	*	*
P=176,7 bar/T=60 °C	6,012	6,015	*	*
P=244,1 bar/T=60 °C	6,018	6,016	*	*
P=250,0 bar/T=60 °C	6,018	6,022	*	*
<b>Soxhlet</b>				

Hexano	6,020	6,020	*	*
Diclorometano	6,019	6,018	*	*

\* A quantidade deste composto na amostra deve ser muito pequena sendo seu pico de difícil identificação.

Baseado na interpretação dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  assim como nos dados obtidos com a literatura (PESSINI et al., 2003b), pode-se sugerir que a neolignana diidrobzofurânica denominada de 2-(4',5'-metilendioxfenil)-3-metil-5-(E)-propenilbenzofurano ou eupomatenóide-3, encontra-se presente em todos os extratos analisados.

Esta substância já havia sido isolada por Maxwell et al. (1999) a partir do extrato cetônico das partes aéreas de *P. aequale*, tendo os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  sido relatados pela primeira vez neste estudo. Benevides et al. (1999) e Sartorelli et al. (2001), isolaram esta neolignana do extrato em acetato de etila da raiz e das folhas de *P. regnellii* var. *regnellii*. Posteriormente, Pessini et al. (2003b) comprovaram a presença desta neolignana em extratos hidroetanólicos de *Piper regnellii* var. *pallescens*.

#### 5.2.1.2 Eupomatenóide-5

A fórmula estrutural  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$  para o Eupomatenóide-5 está demonstrada na Figura 16.

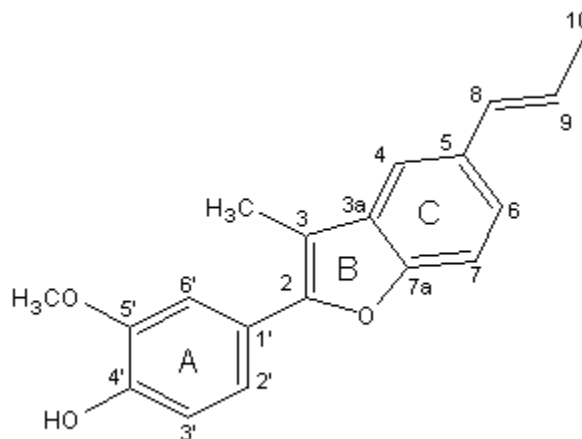


Figura 16. Estrutura química da molécula do eupomatenóide-5.

Os valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  encontrados na literatura para a substância acima são apresentados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente, conforme a ordem de numeração (PESSINI, 2003b).

Tabela 13. Dados de RMN-<sup>1</sup>H (300MHz) em CDCl<sub>3</sub> para o eupomatenóide-5 descritos na literatura.

$\delta_H$ (ppm)												
H	2'	3'	4	6	6'	7	8	9	CH <sub>3</sub> -3	CH <sub>3</sub> -10	CH <sub>3</sub> O-5'	OH
Eupomatenóide-5	7,29	7,03	7,43	7,27	7,32	7,37	6,52	6,23	2,43	1,90	3,98	5,75
	(dd)	(d)	(d)	(dd)	(d)	(d)	(dd)	(dq)	(s)	(dd)	(s)	(s)

Tabela 14. Dados de RMN-<sup>13</sup>C (75MHz) em CDCl<sub>3</sub> para o eupomatenóide-5 descritos na literatura.

$\delta_C$ (ppm)	
C	Eupomatenóide-5
1'	123,94
2	151,39
3	109,87
3 <sup>a</sup>	131,65
4'	146,78
5	132,77
5'	145,81
7 <sup>a</sup>	153,02
<b>CH</b>	
2'	120,49
3'	114,60
4	116,17
6	122,28
6'	109,28
7	110,66
8	131,36
9	124,30
<b>CH<sub>3</sub></b>	
10	18,37
CH <sub>3</sub> -3	9,13
<b>CH<sub>3</sub>O</b>	55,99

Observa-se que o grupo caracterizador da molécula é o -OCH<sub>3</sub> que tem um sinal típico de singlete em torno de 3,98 ppm e outro sinal em 55,99 ppm para os espectros de hidrogênio e carbono, respectivamente. Os deslocamentos químicos dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos extratos desse grupo foram comparados conforme consta na Tabela 15.

Tabela 15. Dados de RMN-<sup>1</sup>H (300MHz) e RMN-<sup>13</sup>C (75MHz) em CDCl<sub>3</sub> para os extratos de *Piper regnellii* referente ao grupo característico do eupomatenóide-5.

Extratos	$\delta$ do grupo $-\text{OCH}_3$ (ppm)			
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules
<b>ESC</b>				
P=109,2 bar/T=40 °C	3,988	3,985	56,248	56,244
P=150,0 bar/T=40 °C	3,983	3,983	56,259	56,259
P=176,7 bar/T=60 °C	3,984	3,983	56,259	56,251
P=244,1 bar/T=60 °C	3,987	3,984	56,251	56,244
P=250,0 bar/T=60 °C	3,987	3,992	56,244	56,244
<b>Soxhlet</b>				
Hexano	3,990	3,989	56,248	56,248
Diclorometano	3,987	3,987	56,244	56,244

A interpretação dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  assim como nos dados obtidos com a literatura (PESSINI et al., 2003b), pode-se sugerir que a neolignana diidrobenezofurânica denominada de 2-(4'-hidroxi-5'-metoxifenil)-3-metil-5-(E)-propenilbenzofurano ou eupomatenóide-5, encontra-se presente em todos os extratos analisados.

Esta substância foi isolada do extrato cetônico das partes aéreas de *P. aequale* (MAXWELL et al., 1999) e posteriormente do extrato em acetato de etila da raiz e folha de *P. regnellii* var. *regnellii* (BENEVIDES et al., 1999; SARTORELLI, et al., 2001). Dois anos depois Pessini et al. (2003b) comprovaram a presença desta substância em extrato hidroetanólico de *Piper regnellii* var. *pallescens*.

### 5.2.1.3 Eupomatenóide-6

A fórmula estrutural  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_2$  para o Eupomatenóide-6 está demonstrada na Figura 17.

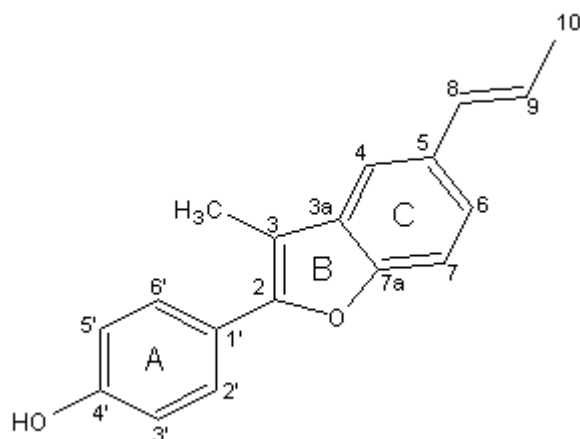


Figura 17. Estrutura química da molécula do eupomatenóide-6.

Os valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  encontrados na literatura para a substância acima encontram-se nas Tabelas 16 e 17, respectivamente, conforme a ordem de numeração (PESSINI, 2003b).

Tabela 16. Dados de RMN- $^1\text{H}$  (300MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para o eupomatenóide-6 descritos na literatura.

H	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)											
	2'	3'	4	5'	6	6'	7	8	9	CH <sub>3</sub> -3	CH <sub>3</sub> -10	OH
Eupomatenóide-6	7,68	6,94	7,43	6,94	7,27	7,68	6,36	6,52	6,25	2,42	1,90	5,06
	(d)	(d)	(d)	(d)	(dd)	(d)	(d)	(dd)	(dq)	(s)	(dd)	(s)

Tabela 17. Dados de RMN- $^{13}\text{C}$  (75MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para o eupomatenóide-6 descritos na literatura.

$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
C	Eupomatenóide-6
1'	124,46
2	151,24
3	109,81
3 <sup>a</sup>	131,61
4'	155,49
5	132,73
7 <sup>a</sup>	153,07
<b>CH</b>	
2'	128,40
3'	115,64
4	116,16

5'	115,64
6	122,26
6'	128,40
7	110,69
8	131,36
9	124,28
<b>CH<sub>3</sub></b>	
10	18,36
CH <sub>3</sub> -3	9,22

O grupo caracterizador da molécula é o –CH-5' que tem um sinal típico de dublete em 6,94 ppm e outro sinal em 115,64 ppm para os espectros de hidrogênio e carbono, respectivamente. Na Tabela 18. encontram-se os deslocamento químicos dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos extratos segundo esse grupo.

Tabela 18. Dados de RMN-<sup>1</sup>H (300MHz) e RMN-<sup>13</sup>C (75MHz) em CDCl<sub>3</sub> para os extratos de *Piper regnellii* referente ao grupo característico do eupomatenóide-6.

Extratos	<b>δ do grupo –CH<sub>3</sub>-3 (ppm)</b>			
	<b>δ<sub>H</sub> (ppm)</b>		<b>δ<sub>C</sub> (ppm)</b>	
	<b>Folhas</b>	<b>Caules</b>	<b>Folhas</b>	<b>Caules</b>
<b>ESC</b>				
P=109,2 bar/T=40 °C	6,943	6,952	116,010	116,015
P=150,0 bar/T=40 °C	6,925	6,933	115,956	115,964
P=176,7 bar/T=60 °C	6,953	6,941	116,023	115,998
P=244,1 bar/T=60 °C	6,946	6,950	115,120	115,020
P=250,0 bar/T=60 °C	6,955	6,952	114,968	114,985
<b>Soxhlet</b>				
Hexano	6,938	6,939	115,854	116,010
Diclorometano	6,941	9,940	116,056	116,045

#### 5.2.1.4 Conocarpano

A fórmula estrutural C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub> para o Conocarpano está demonstrada na Figura 18.

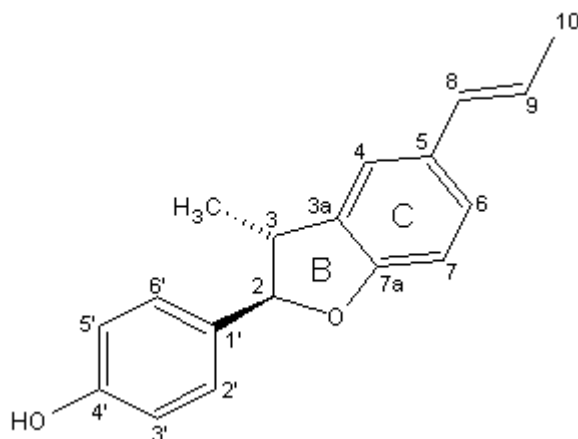


Figura 18. Estrutura química da molécula do conocarpano.

Os valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  encontrados na literatura para a substância acima são apresentados nas Tabelas 19 e 20, respectivamente, conforme a ordem de numeração (PESSINI et al., 2003b).

Tabela 19. Dados de RMN- $^1\text{H}$  (300MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para o conocarpano descritos na literatura.

H	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)														
	2	2'	3	3'	4	5'	6	6'	7	8	9	CH <sub>3</sub> -3	CH <sub>3</sub> -10	OH	
Conocarpano	5,08	7,30	3,39	6,83	7,10	6,83	7,12	7,30	6,76	6,36	6,11	1,39	1,86	4,98	
	(d)	(d)	(dq)	(d)	(s)	(d)	(d)	(d)	(d)	(dd)	(dq)	(d)	(dd)	(s)	

Tabela 20. Dados de RMN- $^{13}\text{C}$  (75MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para o conocarpano descritos na literatura.

$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
C	Conocarpano
1'	132,43
3 <sup>a</sup>	132,96
4'	155,75
5	131,35
7 <sup>a</sup>	158,39
<b>CH</b>	
2	92,62
2'	127,93
3	45,14
3'	115,48
4	120,78
5'	115,48

6	126,37
6'	127,93
7	109,31
8	130,81
9	123,11
<b>CH<sub>3</sub></b>	
10	18,28
CH <sub>3</sub> -3	17,69

O grupo –CH<sub>3</sub>-3 caracteriza a molécula e tem um sinal típico de dublete em torno de 1,39 ppm e outro sinal em 17,69 ppm para os espectros de hidrogênio e carbono, respectivamente. Compararou-se os deslocamento químicos dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos extratos de acordo com esse grupo, conforme Tabela 21.

Tabela 21. Dados de RMN-<sup>1</sup>H (300MHz) e RMN-<sup>13</sup>C (75MHz) em CDCl<sub>3</sub> para os extratos de *Piper regnellii* referente ao grupo característico do conocarpano

Extratos	δ do grupo –CH <sub>3</sub> -3 (ppm)			
	δ <sub>H</sub> (ppm)		δ <sub>C</sub> (ppm)	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules
<b>ESC</b>				
P=109,2 bar/T=40 °C	1,387	1,389	18,002	17,987
P=150,0 bar/T=40 °C	1,387	1,386	18,031	18,031
P=176,7 bar/T=60 °C	1,387	1,387	18,039	18,024
P=244,1 bar/T=60 °C	1,387	1,384	18,002	17,987
P=250,0 bar/T=60 °C	1,387	1,391	17,995	18,002
<b>Soxhlet</b>				
Hexano	1,388	1,387	17,998	17,998
Diclorometano	1,385	1,386	17,995	17,987

### 5.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As Figuras 19 e 20 apresentam os cromatogramas para as soluções de conocarpano e eupomatenóide-5 que foram utilizadas como padrões nas concentrações de 350 e 620 µg/mL, respectivamente.



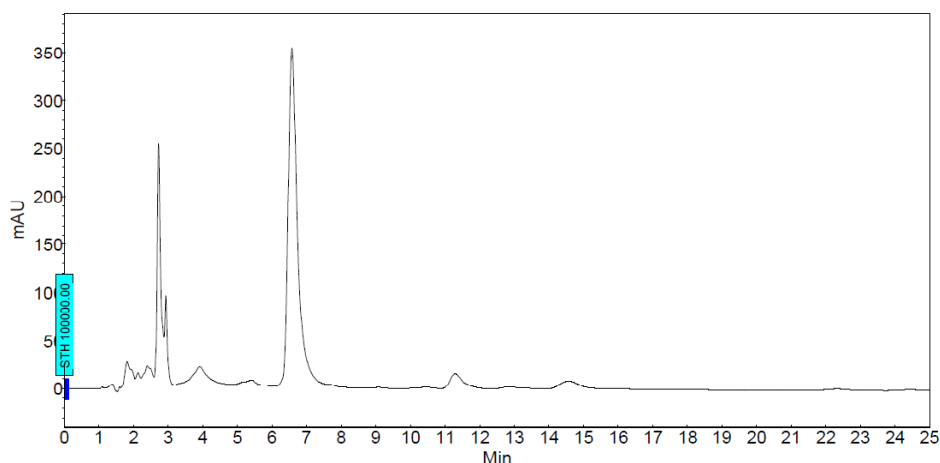


Figura 19. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 350 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

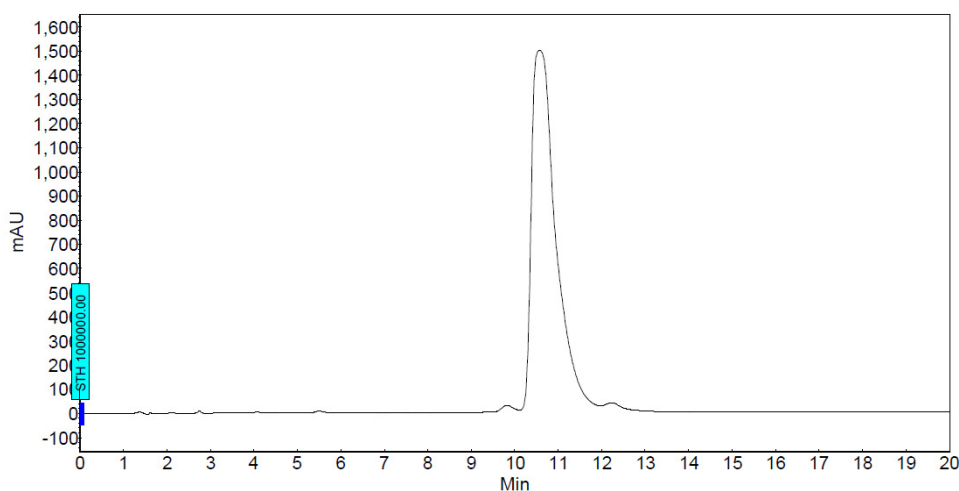


Figura 20. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomatenóide-5 na concentração de 620 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

Os tempos de retenção para os compostos conocarpano e eupomatenóide-5 foram 6,7 e 10,8 minutos, respectivamente. A partir dos cromatogramas para as diversas diluições de cada composto padrão foram construídas curvas para obtenção da equação da reta, sendo posteriormente calculados os teores desses compostos nos extratos de *Piper regnellii*. As curvas de calibração desses compostos estão ilustradas nas Figuras 21 e 22.

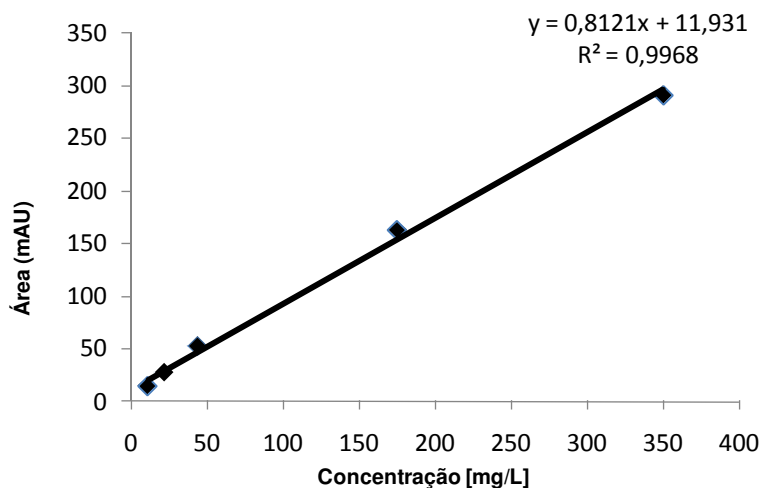


Figura 21. Curva de calibração para o padrão conocarpano.

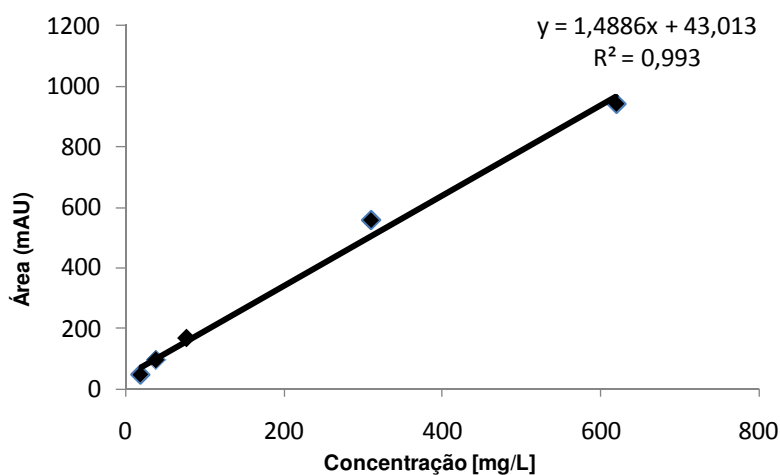


Figura 22. Curva de calibração para o padrão eupomatenóide-5.

A Tabela 22 mostra os teores de conocarpano e eupomatenóide-5 nos extratos de pariparoba.

Tabela 22. Concentração dos compostos conocarpano e eupomatenóide-5 nos extratos de *Piper regnellii*.

Extratos	Conocarpano (%)		Eupomatenóide-5 (%)	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules
<b>ESC</b>				
P=109,2 bar/T=40 °C	19,2 ± 0,2	24,5 ± 0,4	19,2 ± 0,1	15,9 ± 0,5
P=150,0 bar/T=40 °C	24,8 ± 0,4	38,5 ± 0,1	40,8 ± 0,5	35,9 ± 0,3
P=176,7 bar/T=60 °C	23,9 ± 0,2	34,6 ± 0,4	43,4 ± 0,5	25,5 ± 0,4
P=244,1 bar/T=60 °C	19,9 ± 0,3	28,1 ± 0,05	39,3 ± 0,6	23,2 ± 0,3
P=250,0 bar/T=40 °C	25,3 ± 0,4	37,8 ± 0,2	36,1 ± 0,4	18,2 ± 0,5

<b>Soxhlet</b>				
Hexano	8,7 ± 0,2	18,8 ± 0,4	18,7 ± 0,2	17,6 ± 0,5
Diclorometano	17,0 ± 0,3	30,0 ± 0,06	27,5 ± 0,09	17,1 ± 0,4

Pode-se observar diferença considerável dos teores destes compostos entre extratos de folhas e caules obtidos em todas as condições de extração. Extratos obtidos dos caules apresentam maior concentração de conocarpano, já os extratos obtidos das folhas apresentam maior concentração de eupomatenóide-5.

Os resultados das extrações com dióxido de carbono foram mais eficiente, já que as neolignanas são mais solúveis em solventes apolares (FELIPE et al., 2006).

Além disso, verificou-se que as neolignanas estudadas são estáveis ao aquecimento empregado na extração por Soxhlet, pois os teores encontrados quando utilizada esta técnica foram compatíveis com os valores encontrados na ESC.

Na escolha do líquido extrator deve-se levar em consideração não só as propriedades extrativas, mas também sua adequação tecnológica e a toxicidade. A adequação tecnológica está relacionada à facilidade de eliminar o líquido da solução extrativa ou produto final.

Segundo os resultados de extração, o dióxido de carbono, em condições supercríticas, se mostrou o solvente mais adequado para a obtenção das neolignanas conocarpano e eupomatenóide-5.

### 5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Nas Figuras 23 e 24 encontram-se as micrografias eletrônicas do material vegetal pré e pós-extração.

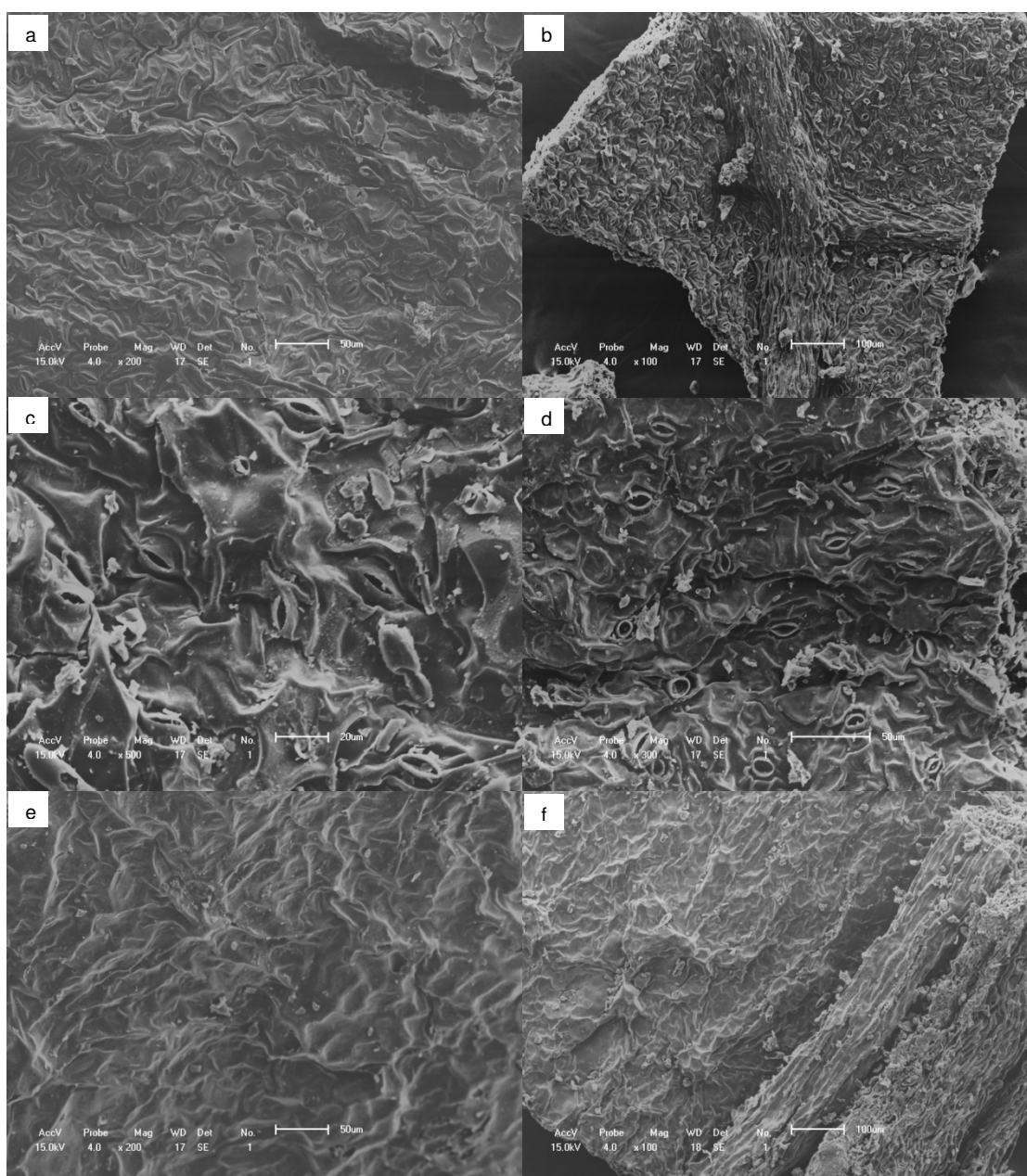


Figura 23. Matriz sólida das folhas de *Piper regnellii*: (a) Antes da extração; (b) Extraída a 109,2 bar/40°C; (c) Extraída a 244,1 bar/60°C; (d) Extraída a 250,0 bar/40°C; (e) Extraída em soxhlet com hexano; (f) Extraída em soxhlet com diclorometano;

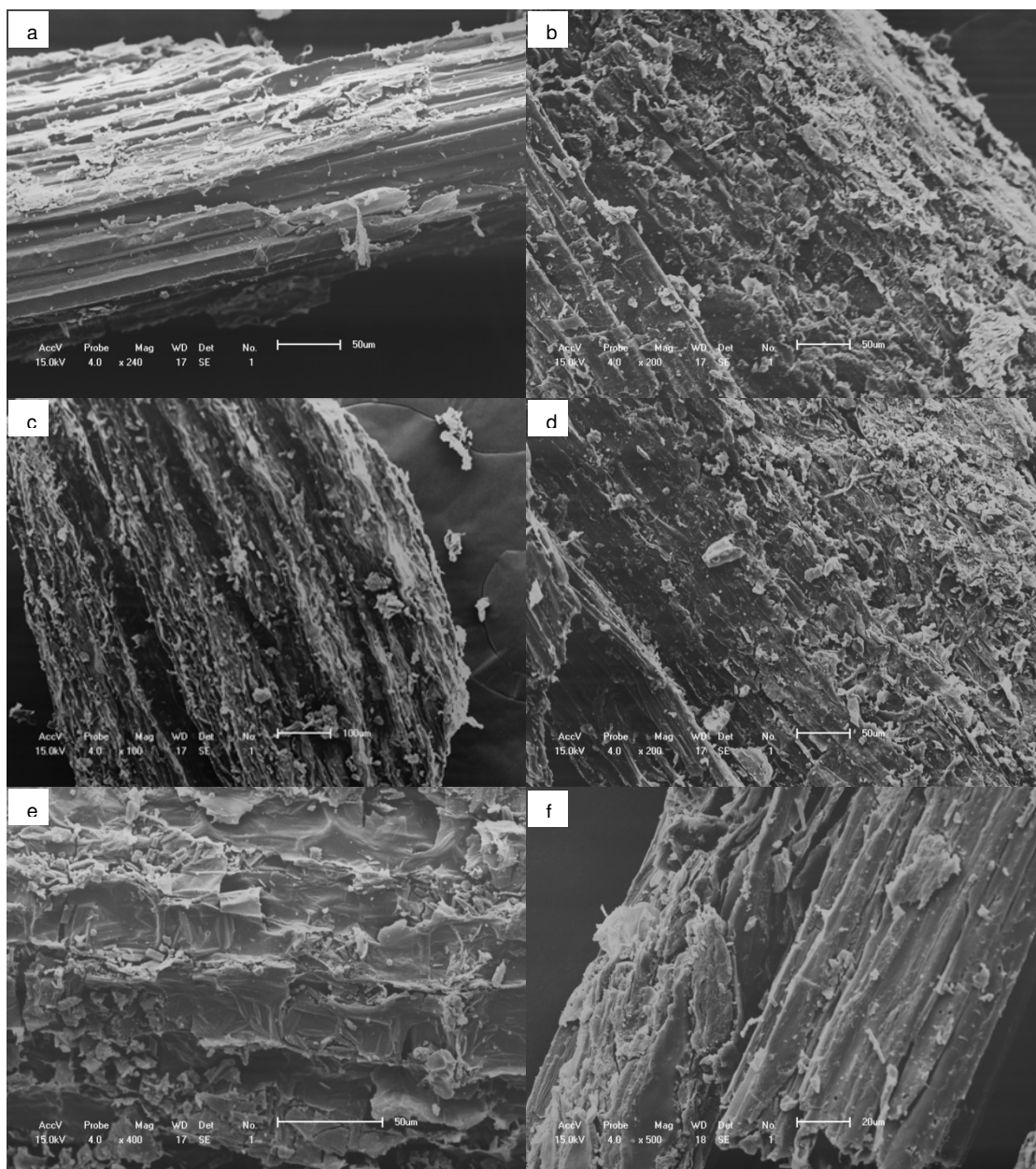


Figura 24. Matriz sólida dos caules de *Piper regnellii*: (a) Antes da extração; (b) Extraída a 109,2 bar/40°C; (c) Extraída a 244,1 bar/60°C; (d) Extraída a 250,0 bar/40°C; (e) Extraída em soxhlet com hexano; (f) Extraída em soxhlet com diclorometano;

Ao comparar a matriz vegetal pré-extração com a matriz submetida a extração supercrítica pode-se observar que as bolsas que continham o material extraível ficaram praticamente vazias, e quase em sua totalidade foi rompida. Já no material submetido a extração convencional (soxhlet), as bolsas ficaram com aspecto intacto. Isso nos sugere que apesar dos altos rendimentos obtidos na técnica de soxhlet, outros compostos celulósicos foram arrastados, principalmente as substâncias presentes na superfície da célula.

5.4 TESTE *IN VITRO*: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

De maneira geral não há um acordo no nível aceitável de inibição por substâncias obtidas de plantas quando comparado com padrões, embora, de acordo com Duarte et al. (2007), seja possível classificar os materiais, como agentes antimicrobianos baseando-se no valor de CIM. Nos testes frente à leveduras foi considerado que se o extrato bruto apresentou CIM  $\leq 100$   $\mu\text{g/mL}$  a atividade antifúngica era forte; se a CIM era de 100 à 500  $\mu\text{g/mL}$  a atividade era moderada; para CIM entre 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  a atividade era fraca e para CIM  $> 1000$   $\mu\text{g/mL}$  o extrato era inativo contra o fungo testado (HOLETZ et al., 2002). Já nos testes frente à fungos filamentosos foi considerada a seguinte classificação: os extratos que apresentaram um CIM menor que 75  $\mu\text{g/mL}$  a atividade antifúngica foi considerada forte; CIM entre 75 a 150  $\mu\text{g/mL}$  os extratos possuem atividade moderada; CIM entre 150 a 250  $\mu\text{g/mL}$  atividade fraca; e CIM maior que 250  $\mu\text{g/mL}$  o extrato é inativo (SCORZONI et al., 2007).

Os resultados da atividade antifúngica usando os extratos supercríticos selecionados (P=109,2 bar, P=244,1 bar e P=250 bar) e os extratos de solventes orgânicos das folhas e dos caules estão sumarizados na Tabela 23.

Tabela 23. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) dos testes *in vitro* em fungos utilizando os extratos obtidos.

Antimicrobianos		CIM (CFM) ( $\mu\text{g/mL}$ )					
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. Parapsilosis</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
40°C/109,2bar	Folhas	31,25 (31,25)	125,00 (500)	125 (125)	15,62 (15,62)	15,62 (15,62)	15,62 (15,62)
	Caules	15,62 (15,62)	31,25 (62,50)	62,50 (62,50)	15,62 (15,62)	7,81 (7,81)	15,62 (15,62)
60°C/244,1bar	Folhas	15,62 (31,25)	62,50 (62,50)	62,50 (250)	15,62 (31,25)	15,62 (15,62)	7,81 (7,81)
	Caules	15,62 (31,25)	31,25 (31,25)	62,50 (62,50)	15,62 (15,62)	7,81 (7,81)	7,81 (7,81)
40°C/250,0bar	Folhas	15,62 (15,62)	31,25 (250,00)	62,50 (-)	15,62 (15,62)	7,81 (7,81)	7,81 (7,81)
	Caules	15,62 (15,62)	125,00 (125,00)	62,50 (62,50)	15,62 (15,62)	7,81 (7,81)	15,62 (15,62)
Hexano	Folhas	62,50 (62,50)	125,00 (125,00)	500,00 (500)	62,50 (62,50)	15,62 (7,81)	15,62 (15,62)
	Caules	15,62 (15,62)	31,25 (62,50)	62,50 (125,00)	31,25 (62,50)	7,81 (7,81)	7,81 (7,81)
Diclorometano	Folhas	62,50 (250,00)	62,50 (125,00)	250,00 (500,00)	62,50 (125,00)	7,81 (7,81)	7,81 (7,81)

	Caules	31,25 (31,25)	31,25 (62,50)	62,50 (125,00)	31,25 (62,50)	7,81 (7,81)	7,81 (7,81)
Fluconazol		0,12	16,00	0,50	2,00		
Terbinafina						0,008	0,004

Todos os extratos apresentaram forte atividade contra todos os microrganismos testados sendo considerados também fungicidas.

Observa-se que para a grande maioria dos extratos supercríticos os valores de CIMs se mostraram menores do que aqueles apresentados para os extratos obtidos com solventes orgânicos. O que era esperado, pois apesar de os 10 extratos testados apresentarem as 4 neolignanas de interesse, os extratos obtidos via ESC continham maiores teores de conocarpano (vide Tabela 22). Além disso, os extratos dos caules demonstram, no geral, melhor atividade antifúngica devido ao seu alto teor de conocarpano.

Em 2005 Pessini et al. testaram o extrato de Pariparoba em acetato de etila contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* e obtiveram uma CIM de 125 µg/mL, 500 µg/mL e >1000 µg/mL, respectivamente. Depois de isoladas, testaram também as 4 neolignanas. Somente o conocarpano apresentou atividade contra as leveduras: CIM de 6,3 µg/mL contra *C. albicans* e *C. tropicalis* e de 25 µg/mL contra *C. parapsilosis*.

Os resultados obtidos para leveduras são relevantes, pois *C. albicans* e *C. tropicalis* são as espécies do gênero *Candida* mais patogênicas da cavidade oral, estando presentes em mais de 70% dos isolamentos das infecções fúngicas desta área (ALVES et al., 2006).

Koroishi et al. (2008) constataram a forte atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos contra os fungos filamentosos *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* apresentando CIMs de 15,62 µg/mL. Também testaram os compostos puros eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5 em *T. rubrum* resultando em CIMs de 50 e 6,2 µg/mL, respectivamente. Já nos extratos supercríticos aplicados a este mesmo fungo observa-se valores pouco acima do obtido para o composto isolado (CIM de 7,81 µg/mL).

Os resultados obtidos para o *T. rubrum* tem interesse particular, pois é a espécie de fungo dermatófito mais comumente encontrada, representando cerca de 90% das infecções crônicas e recorrentes (TORRES-RODRIGUES et al., 1998). Além disso, esta espécie mostra resistência aos antifúngicos utilizados para o tratamento de dermatofitose (ZAIAS e GERBERT-REBELL, 1996).

Os principais agentes antifúngicos atualmente em uso devem sua atividade à interação direta com ergosterol (principal esteroide das leveduras, e muitos outros fungos) ou inibição de sua biossíntese (ZACCHINO, 2001).

A purificação de uma determinada substância está relacionada com muito empenho, baixo rendimento e resíduo de solventes. Já com a extração supercrítica obtém-se um material livre de qualquer contaminação, inclusive microbiológica. Sendo assim, ainda que a substância isolada apresente um melhor valor de CIM se faz necessário pensar em custo-benefício.

Drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica não satisfazem completamente as necessidades médicas devido a problemas como potência, segurança e propriedades farmacológicas dos agentes disponíveis. Considerando o aumento nas incidências de infecções sistêmicas e, conseqüente aumento na mortalidade, uma escolha apropriada na terapia antifúngica se faz necessária, além do desenvolvimento de drogas que aumentam a resposta em indivíduos imunocomprometidos. Hoje em dia, há um aumento no interesse por novos compostos antifúngicos que funcionam como tóxicos seletivos e de baixa toxicidade.

Sendo assim, a busca por novos agentes antifúngicos para uma terapia alternativa é de grande importância. E os resultados obtidos para os extratos supercríticos de pariparoba mostram-se promissores para o desenvolvimento de medicamentos a base de produtos naturais.

### 5.5 TESTE *IN VITRO*: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os resultados da atividade antibacteriana usando os extratos supercríticos selecionados (P=109,2 bar, P=244,1 bar e P=250 bar) e os extratos de solventes orgânicos das folhas e dos caules de *Piper regnellii* estão sumarizados na Tabela 24.

Nos testes frente à bactérias foi considerado que se o extrato bruto apresentou CIM  $\leq$  100  $\mu\text{g/mL}$  a atividade antifúngica era forte; se a CIM era de 100 à 500  $\mu\text{g/mL}$  a atividade era moderada; para CIM entre 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  a atividade era fraca e para CIM  $>$  1000  $\mu\text{g/mL}$  o extrato era inativo contra o fungo testado (HOLETZ et al., 2002).

Tabela 24. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) dos testes *in vitro* com bactérias gram-negativa e gram-positiva utilizando os extratos obtidos de *Piper regnellii*.

Extratos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i> <i>resistente</i>	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules
ESC (P=109,2 bar/40 °C)	7,81	7,81	>500	>500	7,81	7,81
ESC (P=244,1 bar/60 °C)	1,95	7,81	>500	>500	0,98	7,81
ESC (P=250,0 bar/40 °C)	3,90	7,81	>500	>500	7,81	7,81
Hexano	15,62	15,62	>500	>500	NT*	NT*



Diclorometano	15,62	31,25	>500	>500	NT*	NT*
Oxacilina						9,37
Vancomicina		1,17				
Ciprofloxacino				0,06		

\*NT = Não testada.

Diferentes resultados foram obtidos para os extratos testados contra as bactérias gram-positivas *S. aureus* amostra sensível à metilina (MRSA) e contra a bactéria gram-negativa *E. coli*. Todos os extratos demonstraram forte atividade antibacteriana em cepas gram-positivas. Entretanto, observar-se que os extratos obtidos via ESC são mais ativos que os extratos obtidos por método convencional, pois de acordo com a Tabela 22 os extratos obtidos via ESC apresentam, no geral, maior quantidade do composto eupomatenóide-5, o qual é apontado por Pessini et al. (2003a) como o principal responsável pela atividade antibacteriana, seguido do eupomatenóide-6.

Os valores das CIMs apresentadas pelos extratos brutos obtidos via ESC são muito próximos aos valores obtidos por Pessini et al. (2003a) para os compostos eupomatenóide-5 (1,56 µg/mL) e eupomatenóide-6 (3,12 µg/mL) isolados, contra a mesma cepa de *S. aureus*.

Marçal et al. (2010) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato em acetato de etila em MRSA e obtiveram CIM de 16 µg/mL. Também testaram contra a mesma cepa o composto eupomatenóide-5 obtendo CIM de 4 µg/mL. Já nos resultados com os extratos brutos obtidos via ESC os valores de CIM são muito próximos ou até menores.

Esses resultados podem ser explicados pela sinergia que ocorre entre os compostos, sugerindo que um composto pode potencializar a ação do outro.

A hidroxila fenólica presente na estrutura das neolignan conocarpano, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6 é imprescindível para a atividade em *S. aureus*. Segundo Barreiro e Fraga (2001), as ligações de hidrogênio são as mais importantes interações não-covalentes existentes nos sistemas biológicos, podendo ser responsáveis pela manutenção das conformações bioativas de macromoléculas.

Já contra a bactéria gram-negativa testada todos os extratos se mostraram fracamente ativos. Provavelmente, se deve a membrana externa desse tipo de bactéria, que representa um obstáculo à penetração de inúmeras moléculas antibióticas. Além disso, o espaço periplásmico contém enzimas que são capazes de destruir moléculas estranhas (TAVARES, 1999).

A análise antimicrobiana dos extratos de pariparoba demonstrou que os extratos supercríticos foram mais eficientes contra o crescimento de bactérias gram-positivas, se comparados aos extratos obtidos à baixa pressão.

Os baixos valores de CIM apresentados indicam a extração supercrítica como o melhor método para obtenção de extratos de *Piper regnellii* com forte poder inibidor, de acordo com a classificação apresentada previamente (forte inibidor CIM  $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ ). A redução da densidade do fluido supercrítico aumentou o valor da CIM contra o *S. aureus*. Este comportamento indica que maior poder solvente é necessário pra a obtenção de compostos com potencial antimicrobiano.

## 5.6 CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade é a primeira etapa para avaliar a toxicidade de fármacos e materiais vegetais. No teste de citotoxicidade *in vitro* os materiais têm contato direto com as culturas celulares com intuito de analisar o efeito direto nas células.

Os ensaios de citotoxicidade de seis extratos supercríticos (folhas e caules) obtidos por extração com  $\text{CO}_2$  pressurizado à diferentes densidades foram realizados segundo a metodologia de SKEHAN et al., 1990. Os resultados estão apresentados na Tabela25.

Tabela 25. Resultados de concentração citotóxica ( $\text{CC}_{50}$ ) de extratos obtidos por extração supercrítica.

Extrato	$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Folhas	Caules
ESC (P=109,2 bar/40 °C)	34,50 $\pm$ 2,0	18,00 $\pm$ 0,7
ESC (P=244,1 bar/60 °C)	20,03 $\pm$ 3,6	34,67 $\pm$ 1,2
ESC (P=250,0 bar/40 °C)	34,77 $\pm$ 1,4	18,10 $\pm$ 0,3

A citotoxicidade para as células LLC-MK<sub>2</sub> (originária do rim de *Macaca mulatta*) e para as bactérias e fungos testados foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS). Este índice relaciona a citotoxicidade e a atividade biológica do extrato no modelo avaliado, representando o potencial efetivo do extrato sobre o microrganismo, consiste na razão entre a Concentração Citotóxica 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) para as células e a CIM para fungos e bactérias testados. Os resultados de IS estão apresentados na Tabela26.

Tabela 26. Resultados do índice de seletividade para os extratos testados.

Microrganismos	Extratos					
	(P=109,2bar/40°C)		(P=244,1bar/60°C)		(P=250,0bar/40°C)	
Bactérias	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules
<i>S. aureus</i>	4,42	2,30	10,27	4,44	8,91	2,32

<i>S. aureus</i> resistente	4,42	2,30	20,44	4,44	4,45	2,32
<b>Fungos</b>						
<i>C. albicans</i>	1,10	1,15	1,28	2,22	2,23	1,16
<i>C. glabrata</i>	0,28	0,58	0,32	1,11	1,11	0,14
<i>C. tropicalis</i>	0,28	0,29	0,32	0,55	0,56	0,30
<i>C. parapsilosis</i>	2,21	1,15	1,28	2,22	2,23	1,16
<i>T. mentagrophytes</i>	2,21	2,30	1,28	4,44	4,45	2,32
<i>T. rubrum</i>	2,21	1,15	2,56	4,44	4,45	1,16

Os resultados do índice de seletividade apresentados mostram que os extratos são mais tóxicos para os microrganismos do que para as células de LLC-MK<sub>2</sub>, com exceção dos testes em *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

Resultados interessantes foram obtidos na análise de seletividade em bactérias gram-positivas, na qual os extratos são de 4,42 à 20,44 vezes mais nocivos para os microrganismos do que para a célula animal.

## 5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 5.7.1 Método de redução do DPPH\*

Na Tabela 27 e nas Figuras 25 e 26 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante dos extratos de pariparoba obtidos por Soxhlet extração supercrítica (ESC) sob diferentes condições de processo. A atividade antioxidante apresentada (AA%) é referente à maior concentração final de extrato testada que foi de 250 µg/mL. A análise estatística ANOVA foi aplicada ao nível de 5 % de significância.

Tabela 27. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *Piper regnellii* usando o método DPPH.

Extratos	AA (%)		CE <sub>50</sub> (µg/mL)	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules
<b>Soxhlet</b>				
Hexano	82,62	82,90	68,64 <sup>b</sup>	63,01 <sup>b</sup>
Diclorometano	76,38	86,48	85,41 <sup>c</sup>	55,38 <sup>b</sup>
<b>ESC</b>				
P=109,2 bar/40 °C	84,50	87,07	41,23 <sup>a</sup>	43,14 <sup>a</sup>
P=244,1 bar/60 °C	84,58	84,59	40,89 <sup>a</sup>	58,20 <sup>b</sup>
P=250,0 bar/40 °C	85,03	84,54	46,86 <sup>a</sup>	45,66 <sup>a</sup>

\* Para cada método de extração, os valores médios de CE<sub>50</sub> seguidos por letras diferentes (mesma coluna) são significativamente diferentes à 5% pelo teste de Tukey.

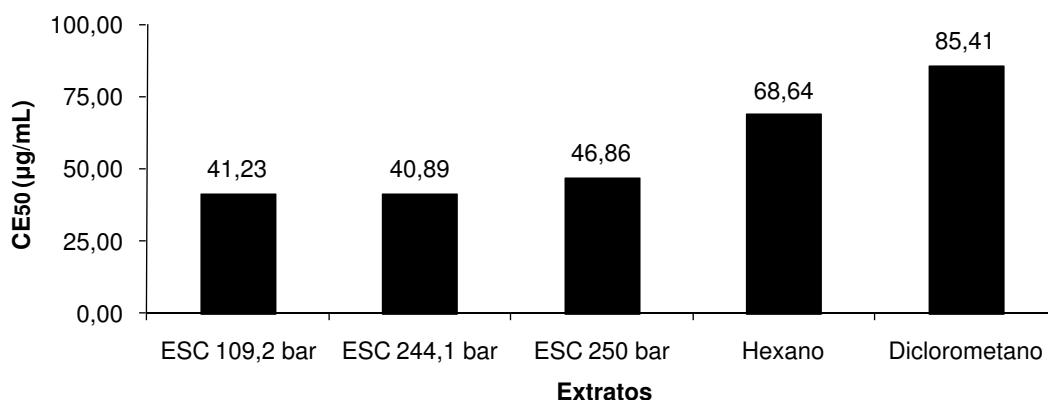


Figura 25. Valores de CE<sub>50</sub> (µg/mL) para os extratos das folhas de *Piper regnellii*.

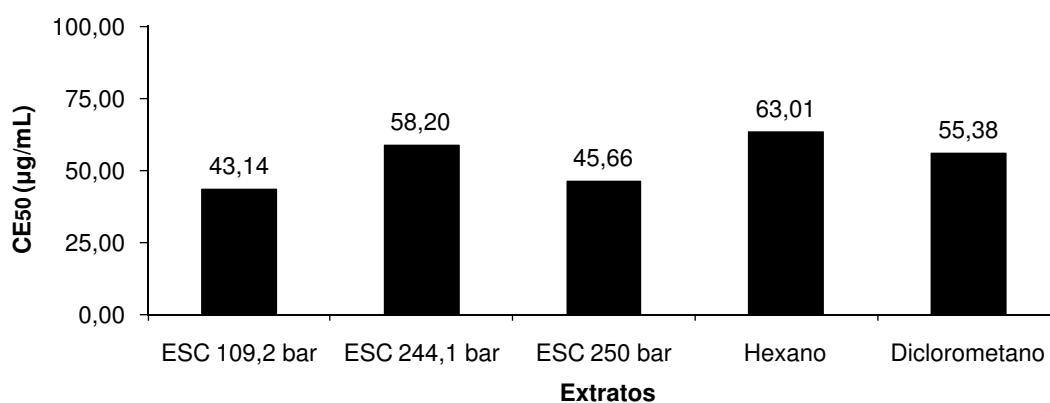


Figura 26. Valores de CE<sub>50</sub> (µg/mL) para os extratos dos caules de *Piper regnellii*.

É esperado que extratos obtidos por solventes polares apresentem um maior potencial antioxidante por concentrarem grande número de moléculas fenólicas (MENSOR et al., 2001). Porém esse efeito não se confirmou na extração por soxhlet, já que os extratos obtidos das folhas com o solvente hexano apresentaram melhores valores de concentração eficaz com CE<sub>50</sub> de 68,64 µg/mL, quando comparados aos extratos de diclorometano.

A pressão apresentou um efeito pronunciado sobre os resultados de AA e CE<sub>50</sub>. A Tabela 27 mostra que o aumento da pressão à temperatura constante aumentou os valores de CE<sub>50</sub>. Este resultado indica que o aumento da pressão e, conseqüentemente da densidade do fluido supercrítico, diminuiu a concentração dos compostos extraídos com atividade antioxidante presentes nos extratos supercríticos.

Os resultados de AA obtidos com o solvente supercrítico CO<sub>2</sub> e hexano foram, em geral, melhores que aquele obtido com o emprego de diclorometano. Esses dados nos sugerem que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante presentes nas folhas e nos caules de *Piper regnellii* possuem mais afinidade por solventes apolares, resultando na extração de componentes apolares. Resultados que contrariam os estudos já realizados, que afirmam que compostos apolares possuem baixa atividade antioxidante.

Pode-se concluir que existem outras famílias de substâncias presentes nos extratos de interesse além dos compostos fenólicos (polares) que contribuem para a eliminação de radicais livres, tais como terpenóides, carotenóides, tocoferóis, entre outros, que estão influenciando nos resultados de atividade antioxidante. Além disso, a atividade antioxidante detectada por sistemas complexos, tais como materiais vegetais, pode ser causada por várias classes de componentes, e também pelo sinergismo e interações entre eles a partir de uma mistura complexa, resultando em uma atividade antioxidante dependente da composição do extrato (ITO et al., 2002).

Os bons resultados apresentados pelos extratos das folhas de *Piper regnellii* parece começar a ter explicação pelos trabalhos da ação das neolignanas desenvolvidos por pesquisadores chineses e japoneses. Foi demonstrada uma extraordinária atividade antioxidante sobre a lipoperoxidação das neolignanas – magnolol e honoquiol – isoladas de planta do gênero Magnólia, da mesma primitiva subclasse Magnoliidae. O efeito antiperoxidante das lignanas nestes ensaios chega a ser 1000 vezes superior à do  $\alpha$ -tocoferol, que é uma antioxidante padrão (LO et al., 1994).

#### 5.7.2 Compostos fenólicos totais

Os extratos obtidos por extração supercrítica e soxhlet foram analisados utilizando o reagente Folin-Denis. A quantidade total de fenóis nos extratos foi quantificada por meio de uma curva de calibração preparada com ácido gálico como ilustra a Figura 27.

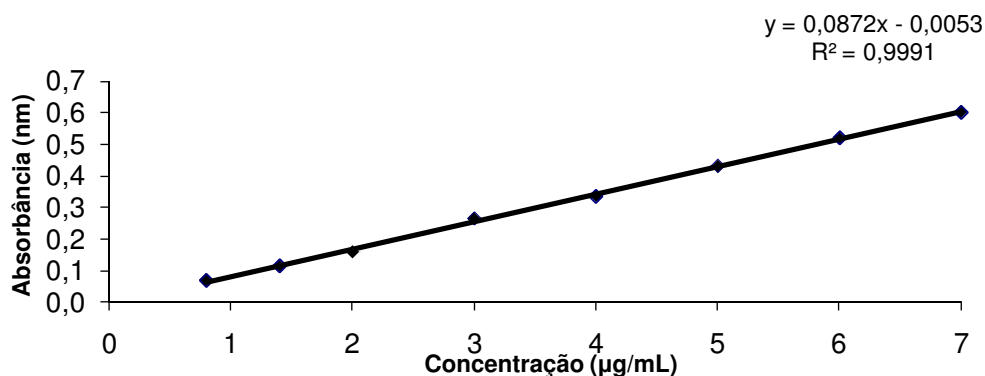


Figura 27. Curva padrão de ácido gálico.

A Tabela 28 mostra os valores médios dos teores de compostos fenólicos expressos em g EAG/100g de extrato.

Tabela 28. Teores de compostos fenólicos dos extratos de *Piper regnellii* expressos em gEAG/100g de extrato.

Extratos	Concentrações (gEAG/100g de extrato)	
	Folhas	Caules
<b>Supercríticos</b>		
T = 40 °C/P = 109,2 bar	1.09 ± 0.13 <sup>a,b</sup>	1.39 ± 0.14 <sup>a</sup>
T = 60 °C/P = 244,1 bar	1.18 ± 0.10 <sup>a,b</sup>	1.48 ± 0.18 <sup>a</sup>
T = 40 °C/P = 250,0 bar	1.30 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.15 <sup>a,b</sup>
<b>Soxhlet</b>		
Hexano	1.03 ± 0.31 <sup>a,b</sup>	1.12 ± 0.12 <sup>a,b</sup>
Diclorometano	0.73 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.11 <sup>a,b</sup>

Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% de significância.

A quantidade de compostos fenólicos obtida nos extratos por extração supercrítica não apresentou tendência com a temperatura e a pressão, variando de 1,07 a 1,5 (g ácido gálico /100 g de extrato). Os extratos supercríticos mostraram teores de fenólicos similares aos extratos obtidos por soxhlet.

### 5.7.3 Relação entre a atividade antioxidante (DPPH\*) e os compostos fenólicos totais

Os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante quantificada pela técnica de DPPH são apresentados nas Figuras 28 e 29 para folhas e caules, respectivamente.

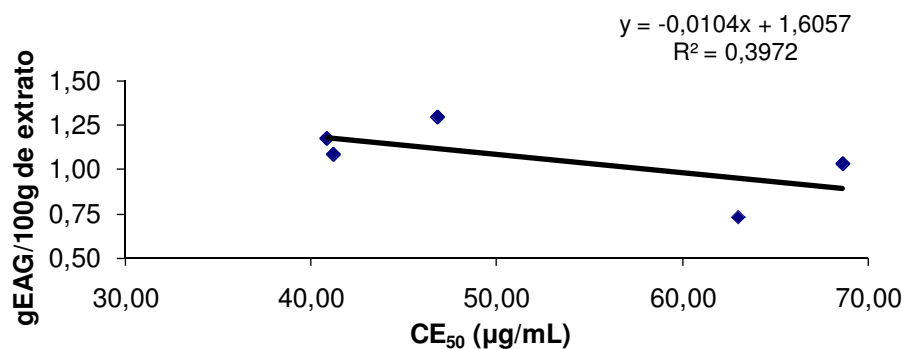


Figura 28. Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais para as folhas de *Piper regnellii*.

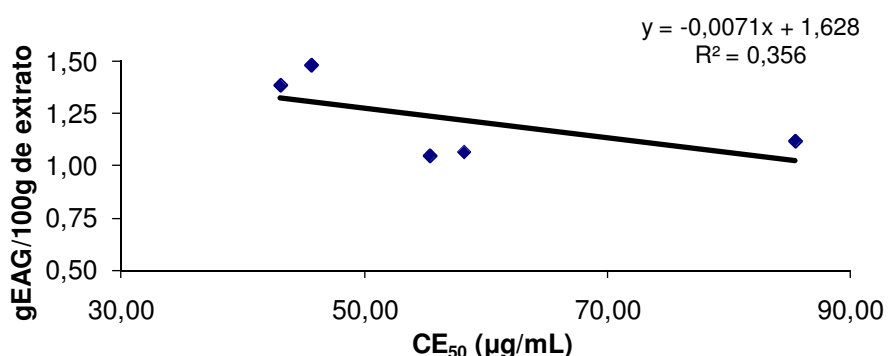


Figura 29. Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais para os caules de *Piper regnellii*.

Observou-se que as diferentes técnicas para mensurar a atividade antioxidante apresentaram baixo valor de correlação ( $R^2=0,40$  e  $R^2=0,36$ ). Isso nos sugere que existem outras substâncias presentes nos extratos de pariparoba que contribuem mais efetivamente para a ação sequestradora de radicais livres do que a fração de compostos fenólicos.

A relação entre atividade antioxidante e fenólicos totais mostra que estes não são os únicos responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos. A diversidade e complexidade das misturas nos extratos de plantas dificultam a caracterização dos compostos e a determinação da sua atividade antioxidante.

Os métodos para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* representam indicadores das potenciais atividades biológicas. Maiores avaliações são necessárias para verificar a contribuição de cada composto individual na ação antioxidante total.

## 5.8 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO

Os valores estimados da constante cinética  $k$  são apresentados na Tabela 29 juntamente com outros valores de parâmetros do modelo de transferência de massa utilizado neste trabalho.

Nesta tabela  $M$  é a massa de material vegetal (g),  $Q_f$  é a vazão de extração (mL/min),  $\varepsilon$  é a porosidade do leito,  $u$  é a velocidade (cm/min),  $\rho_{CO_2}$  é a densidade do dióxido de carbono ( $g/cm^3$ ),  $\rho_{leito}$  é a densidade no leito ( $g/cm^3$ ),  $C_{eq}$  é a concentração de equilíbrio dos compostos bioativos no solvente ( $g_{C.B.}/cm^3$ ) e  $k$  é a constante cinética ( $cm^3/kgmin$ ).

Tabela 29. Condições experimentais e parâmetros do modelo de transferência de massa proposto para os dados experimentais

Parâmetros	Condições de Extração									
	40°C/109,2bar		40°C/150,0bar		60°C/176,7bar		60°C/244,1bar		40°C/250,0bar	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules
$M_{C.B.}$ (g)	20,06	30,10	20,01	30,00	20,17	30,17	20,10	30,00	20,02	30,07
$Q_f$ (mL/min)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$\varepsilon$	0,87	0,84	0,87	0,84	0,87	0,84	0,87	0,84	0,87	0,84
$u$ (cm/min)	0,54	0,56	0,54	0,56	0,54	0,56	0,53	0,56	0,54	0,56
$\rho_{CO_2}$ ( $g/cm^3$ )	0,68	0,68	0,78	0,78	0,68	0,68	0,78	0,78	0,88	0,88
$\rho_{leito}$ ( $g/cm^3$ )	0,12	0,18	0,12	0,18	0,12	0,18	0,12	0,18	0,12	0,18
$C_{eq}(x 10^{-4})(g/cm^3)$	2,21	3,91	6,16	7,77	5,65	7,34	11,00	14,60	9,98	17,14
$k$ ( $cm^3/gmin$ )	5,19	6,27	5,27	3,47	9,45	7,35	8,05	4,19	6,46	3,21

A partir dos parâmetros apresentados na Tabela 28 as curvas cinéticas de extração foram simuladas para o modelo de segunda ordem. As cinéticas de extração experimentais e as cinéticas simuladas das folhas e dos caules são apresentadas nas Figuras 30 e 31, respectivamente, para todas as condições experimentais com  $CO_2$ .



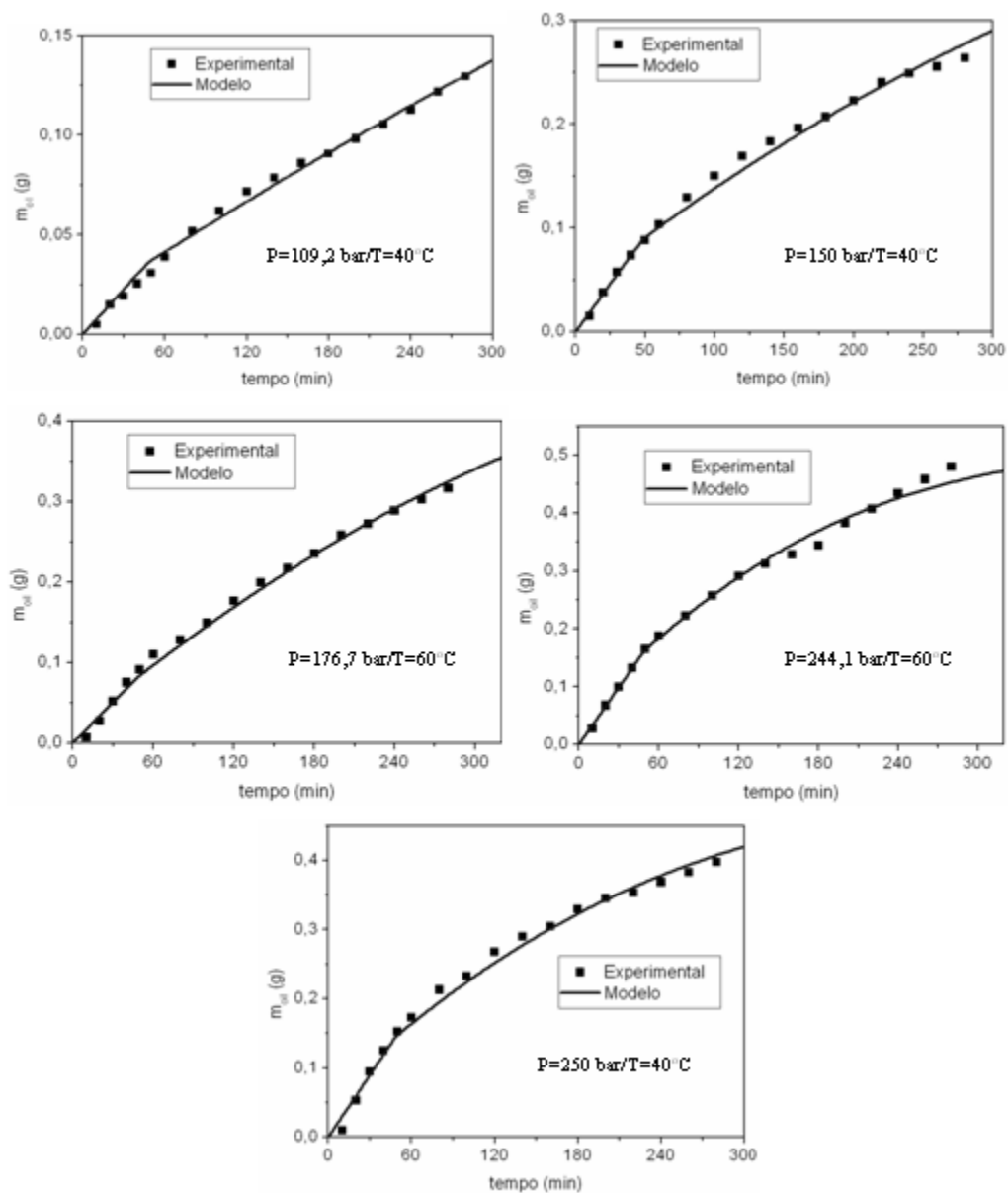


Figura 30. Gráficos representando os modelos matemáticos de segunda ordem para as diferentes curvas cinéticas experimentais de extração de compostos bioativos das folhas de *Piper regnellii* usando  $\text{CO}_2$  supercrítico.

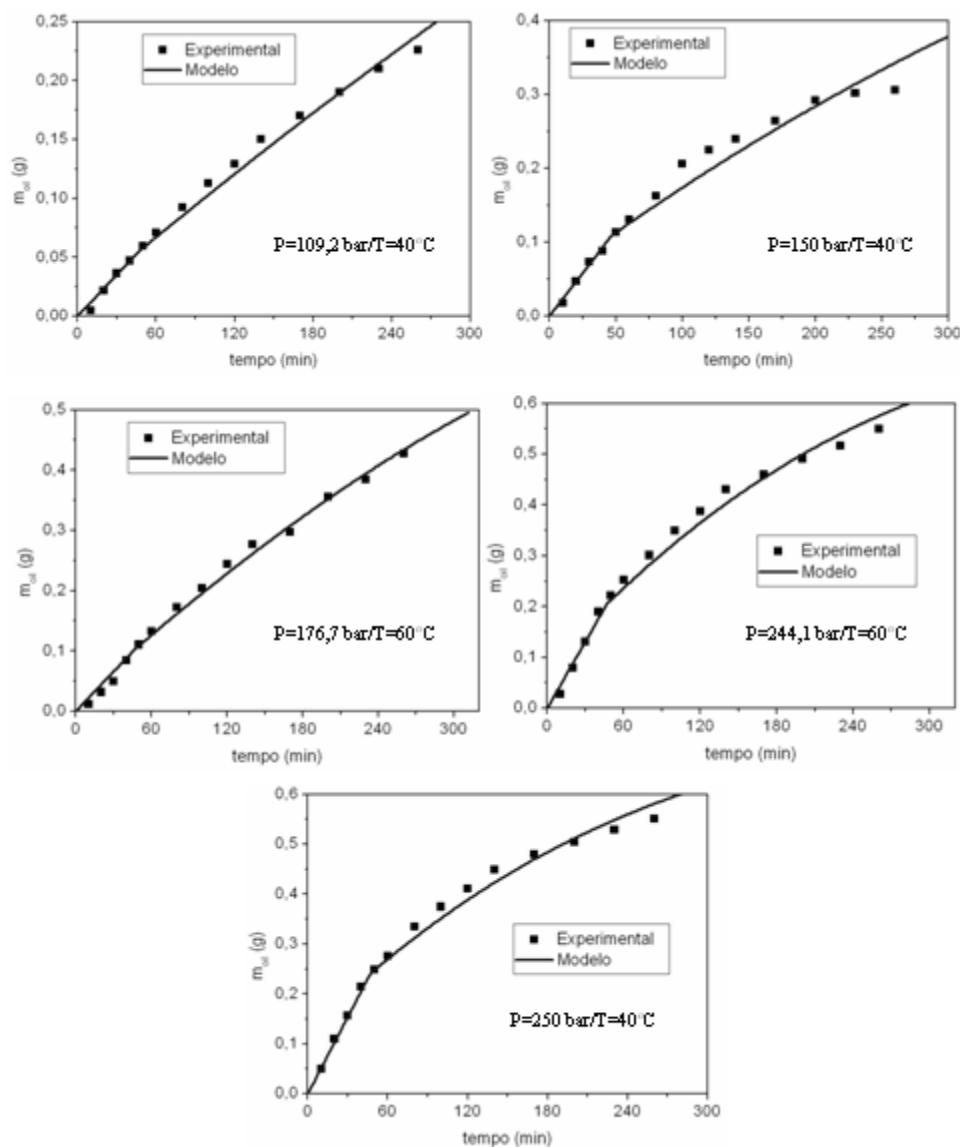


Figura 31. Gráficos representando os modelos matemáticos de segunda ordem para as diferentes curvas cinéticas experimentais de extração de compostos bioativos dos caules de *Piper regnellii* usando  $\text{CO}_2$  supercrítico.

O parâmetro  $k$  do modelo matemático está relacionado com a velocidade da extração. Observa-se na Tabela 29, em geral, os valores do parâmetro  $k$  nas extrações dos compostos bioativos das folhas foram todos superiores aos valores das extrações utilizando o caule, isto mostra que os compostos presentes nas folhas são extraídos com maior facilidade. O modelo matemático proposto se mostrou satisfatório podendo ser utilizado no projeto e otimização de uma unidade de extração de compostos bioativos de pariparoba em escala industrial.

## 6 CONCLUSÃO

O rendimento global de extração de pariparoba obtido por ESC variou de 0,6% a 2,4%, de acordo com as condições de extração (pressão e temperatura), sendo que a condição de extração que favoreceu o maior rendimento tanto para as folhas como para os caules foi de 60 °C e 244,1 bar. Já os rendimentos dos extratos obtidos a baixa pressão foram muito maiores quando comparados aos rendimentos apresentados pela ESC, variando de 3,7% a 7,5%.

Apesar do baixo rendimento (em massa) dos extratos obtidos via ESC, estes apresentaram os maiores teores das neolignanas apontadas na literatura como responsáveis pela excelente ação antimicrobiana desta espécie vegetal. Como consequência, os resultados verificados para estes extratos com relação às atividades biológicas foram superiores aos obtidos com extratos a baixa pressão.

Os extratos obtidos por ESC se apresentaram, em geral, mais tóxicos para os microrganismos do que para as células animais testadas *in vitro*. Apesar do baixo custo e da facilidade na execução, esse tipo de análise de citotoxicidade é apenas a primeira etapa para avaliar a toxidez de um fármaco, sendo necessária e de extrema importância a avaliação da citotoxicidade *in vivo* em diferentes modelos.

Os resultados obtidos nos testes da atividade antioxidante são dados inéditos, e nos apontam a *Piper regnellii* como promissora fonte de substâncias com alto poder inibidor dos danos causados por radicais livres, de acordo com o método de redução de DPPH\*. Entretanto maiores estudos devem ser feitos para elucidar o mecanismo de ação das substâncias presentes.

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 ESC, tanto para folhas como para caules. Portanto, pode ser utilizado no projeto e otimização de uma unidade de extração de compostos bioativos de pariparoba em escala industrial.

Por fim, pode-se concluir que a extração supercrítica se mostrou um excelente método para a obtenção de extratos ricos em compostos bioativos de *Piper regnellii*, apresentando potencial para ser futuramente utilizada na medicina tradicional. No entanto, um estudo com relação a viabilidade econômica do processo de extração deve ser realizado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, P. M., LEITE, P. H. A. S., PEREIRA J. V., PEREIRA, L. F., PEREIRA M. S., HIGINO J. S., LIMA, E. O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 2, pp. 192-196, 2006.

A.O.A.C. – Association of official analytical chemists. *Official Methods of Analysis*, 11th ed., Washington, DC, 1141p, 1990.

ASHRAF-KHORASSANI, M., TAYLOR, L. T., MARTIN, M., Supercritical fluid extraction of kava lactones from Kava root and their separation via supercritical fluid chromatography. *Chromatographia*, 50, 5, pp. 287-292, 1999.

BARBOSA FILHO, J. M., Lignananas, neo-lignananas e seus análogos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., *Química medicinal as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed, p. 15-51, 2001.

BATISTELA, C. B., WOLF-MACIEL, M. R. Modeling, simulation and analysis of molecular distillators: centrifugal and falling film. *Computers and Chemical Engineering*, v.20, n.5, pp. 19-24, 1996.

BENEVIDES P. J. C., SARTORELLI P., KATO M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry*, 52, pp. 339-343, 1999.

BILIA, A. R., SCALISE, L., BERGONZI, M. C., VINCIERI, F. F. Analysis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). *Journal of chromatography B-analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 812, 1, pp. 203-214, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm, Wiss. u. -Technol.* v. 28, n. 1, pp. 25-30, 1995.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. n. 67, n. 1-2, pp. 21-33, 2005.

CARDOZO-FILHO L. *Modelagem da extração supercrítica de óleos essenciais*. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, 1999.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement*, document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, 165 p, 2011.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungals susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: approved standard*, document M38-A2. CLSI, Wayne, PA.2008.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*, document M07-A8. CLSI, Wayne, Pennsylvania, 65 p, 2009.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L, BONATO, P. S. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 7. ed. Campinas: Unicamp, 279p., 1997.

CONSTANTIN M. B., SARTORELLI P., LIMBERGER R., HENRIQUES A. T., STEPPE M., FERREIRA M. J. P., OHARA M. T., EMERENCIANO V. P., KATO M. J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities, analysis by GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR. *Planta Méd*, 67: pp. 771-773, 2001.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M. Natural products in drugs discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60, 1, pp. 52-60, 1997.

CRANK, J. The mathematics of diffusion. Oxford: Clarendon, 414 p., 1975.

DJERIDANE, M., YOUSFI, B., NADJEMI, D., BOUTASSOUNA, P., STOCKER, N. VIDAL. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, pp. 654–660, 2006.

DUARTE, M. C. T., LEME, E. E., DELARMELENA, C., SOARES, A. A., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, pp. 197-201 2007.

ESQUÍVEL, M. M., BERNARDO-GIL, M. G., KING, M. B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. *The Journal of Supercritical Fluid*, v. 16, pp. 43–58, 1999a.

ESQUÍVEL, M. M., RIBEIRO, M. A., BERNARDO-GIL, M. G. Supercritical extraction of savory oil: Study of antioxidant activity and extract characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 14, pp. 129-138, 1999b.

FALCÃO H. S., LIMA I. O., SANTOS V. L., DANTAS H. F., DINIZ M. F. F. M., BARBOSA J. M., BATISTA L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, N15, pp. 381-391, 2005.

FELIPE, D. F., DIAS FILHO, B. P., NAKAMURA, C. V., FRANCO, S. L., CORTEZ, D. A. G. Analysis of neolignans compounds of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, pp. 1371–1375, 2006.

FERREIRA, S. R. S., NIKOLOV, Z. L., DORAISWAMY, L. K., MEIRELES, M. A. A., PATENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *Journal of supercritical fluids*, 14, 3, pp. 235-245, 1999.

FERREIRA, S. R. S., MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *Journal of food engineering*, 54, 4, pp. 263-269, 2002.

FERREIRA, E.C., NOGUEIRA, A.R.A, SOUZA, G.B, BATISTA, L.A.R. Effect of drying method and length of storage on tanin of total phenol concentrations in Pigeon peã seeds. *Food Chemistry*, 86, pp. 17-23, 2004.

FIGUEIREDO, R. A., SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals Botany Company*, 85, pp. 455-460, 2000.

FIORI, L., BASSO, D., COSTA, P. Supercritical extraction kinetics of seed oil: A new model bridging the 'broken and intact cells' and the 'shrinking-core' models. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 48, pp. 131-138, 2009.

GLUECKAUF, E., COATES, J. I. Theory of chromatography. Part IV. The influence of incomplete equilibrium on the front boundary of chromatograms and on the effectiveness of separation. *Journal of the Chemical Society*, pp. 1315-1321, 1947.

GOTO, M., SATO, M., HIROSE, T. Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Engineering Japan*, v. 26, pp. 401-407, 1993.

GOTO, M., ROY, B. C., HIROSE, T. Shrinking-core leaching model for supercritical-fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 9, pp. 128-133, 1996.

GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., BOUKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26, 2, pp. 142–150, 2009.

HAMBURGER, M., MARSTON, A., HOTETTMANN, K. Search for new Drugs of Plant Origin. In: *Advances in Drug Research*, B. Testa, edit, Vol. 20, Academic Press, London, 1991.

HOLETZ F. B., PESSINI G. L., SANCHES N. R., CORTEZ D. A. G., NAKAMURA C. V., DIAS B. P. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. *Memorial I Oswaldo Cruz*, 97, pp.1027- 1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. *Princípios ativos de plantas superiores* – Série de textos da escola de verão em química, São carlos: EDUFSCAR, vol. 6, 152 p., 2003.

HUSSAIN, K., ISMAIL, Z., SADIKUN, A., IBRAHIM, P. Extraction efficiency of water and supercritical carbon dioxide for amide conten from fruit of *Piper sarmentosum* using colorimetric and high performance liquid chromatography. *Journal of the chemical society of Pakistan*, 32, 1, pp. 109-114, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 4. ed. São Paulo: IMESP, 118-119, 2004.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL-FILHO, V.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*: structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. *J. Nat. Prod., Downers Grove*, v. 65, n. 3, pp. 267-272, 2002.

JOLY, A. B. *Botânica: introdução a taxonomia vegetal*, 2ª ed, São Paulo, Ed. Nacional, 1975.

JUSTO, O. R., MORAES, A. M., BARRETO, G. P. M, MERCADANTE, A. Z., ROSA, P. T. V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. *Química Nova*, 31, 7, pp. 1699-1705, 2008.

KOROISHI A. M., FOSS S. R., CORTEZ D. A. G., NAKAMURA T. U, NAKAMURA C. V., FILHO B. P. D. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, pp. 270-277, 2008.

KUMORO, A. C., HASAN, M., SINGH, H. Extraction of sarawak black pepper essencial oil using supercritical carbon dioxide. *Arabian Journal for Science and Engeneering*, 35, 2B, pp. 7-16, 2010.

LUIZE P. S., TIUMAN T. S., MORELLO L. G., MAZA P. K., UEDA N. T., DIAS B. P., CORTEZ D. A. G., MELLO J. C. P., NAKAMURA C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania(L.)amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41, pp. 85-94, 2005.

McHUGH, M., KRUKONIS, V. *Supercritical fluid extraction: Principles and practice*, Butterworths, 1986.

MAIA, J. G. S., SILVA, M. L., LUZ, A. I. R., ZOGHBI M.G.B., RAMOS, L.S. Espécies de *Piperda* Amazônia ricas em safrol. *Química Nova*, 10, pp. 200-204, 1987.

MARÇAL, F. J. B., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, T. U. Activity of the Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). *Molecules*, 15, pp. 2060-2069, 2010.

MARTINEZ, 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. *Industrial and Engineering Chemical Research*, v. 42, pp. 1057-1063, 2003.

MARTINS, A. P., SALGUEIRO, L., VILA, R., TOMI, F., CAÑIGUERAL, S., CASANOVA, J., CUNHA, A. P., ADZET, T. Essential oil from four *Piper* species. *Phytochemistry*, 49, pp. 2019-2023, 1998.

MAUL, A. A. Fluidos supercríticos – Situação Atual e futuro da extração supercrítica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 11, pp. 42-46, 1999.

MAXWELL, A., DABIDEEN, D., REYNOLDS, F. W., McLEAN, S. Neolignanas from *Piper aequale*, *Phytochemistry*, 50, pp. 499-504, 1999.

MEDA, A., LAMIEN, C. E., ROMITO, M., MILLOGO, J., NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 3, pp. 571-577, 2005.

MEIRELES, M. A. A. *Extracting Bioactive Compounds for Food Products*. New York, CRC Press, 2009.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15, pp. 127-130, 2001.

MORRISON, R., BOYD, R. *Química orgânica*. 7.ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1510p., 1981.

NAKAMURA, C. V., SANTOS, A. O., VENDRAMETTO, M. C., LUIZE, P. S., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A. G., UEDA-NAKAMURA, T. Atividade Antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 1, pp. 61-66, 2006.

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, pp. 1104-1117, 2011.



PARMAR, V. S., JAIN, S. C., BISHT, K. S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O. D., PRASAD, A. K., WENGEL, J., OLSEN, C. E., BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46, pp. 597-673, 1997.

PAVIANI, L. C., DARIVA, C., MARCUCCI, M. C., CABRAL, F. A. *Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from the dry ethanolic extract of própolis*. *Journal of Food Process Engineering*, 33, 15-27, 2010.

PEREIRA, J. D., VIEIRA, L. C., LANGELOH, A. Estudo da Atividade Antiespasmódica de Extrato Hidroetanólico de *Piper regnellii* DC sobre o Jejuno Isolado de Rata. *Acta Farmaceutica. Bonaerense*, 23, 3, pp. 311-314, 2004.

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

PERRUT, M., CLAVIER, J. Y., POLETO, M., REVERCHON, E. Mathematical modeling of sunflower seed extraction by supercritical CO<sub>2</sub>. *Industrial Engineering Chemical Research*, v. 36, pp. 430-435, 1997.

PESSINI, G. L., HOLETZ, F. B., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., DIAS, B. P., NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, pp. 21-24, 2003a.

PESSINI, G. L., ALBIERO, A. L. M., MOURÃO, K. S. M., NAKAMURA, C. V., DIAS, B. P., CORTEZ, D. A. G. Análise Farmacognóstica de *Piper regnellii*(Miq.) C. DC. var. *pallescens*(C. DC.) Yunck: Aspectos Botânicos e Enfoque Físico-químico Preliminar. *Revista Latino Americanade Farmácia*, 22, 3, pp. 209-216, 2003b.

PESSINI, G. L., DIAS, B. P. D., NAKAMURA, C. V. N., CORTEZ, D. A. G. Antifungal Activity of the Extracts and Neolignans from *Piper regnellii*(Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 16, 6a, pp. 1130-1133, 2005.

PINELO, M., SINEIRO, J., NÚÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid-liquid Extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, 77, pp. 57-63, 2006.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO<sub>2</sub> extraction in food processing industry: an overview. *Food Science and Technology International*, 8, 5, pp. 269-284, 2002.

RECASENS, F., McCOY, B. J., SMITH, J. M. Desorption processes: supercritical fluid regeneration of activated carbon. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v. 35, pp. 951-958, 1989.

REVERCHON, E., MARRONE, C. Modeling and simulation of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of vegetable oils. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, pp. 161-175, 2001.

REVERCHON, E., MARRONE, C. Supercritical extraction of clove bud essential oil: Isolation and mathematical modeling. *Chemical Engineering Science*, v. 52, pp. 3421-3428, 1997.

SANTOS, P. R. D., MOREIRA, D. L., GUIMARÃES, E. F., KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. *Phytochemistry*, 58, pp. 547-551, 2001.

SARTORELLI, P., BENEVIDES, P. J. C., ELLENSOHN, R. M., ROCHA, M. V. A. F., MORENO, P. R. H., KATO M. J., 2001, Enantioselective conversion of p-hydroxypropenylbenzene to (+)- conocarpan in *Piper regnellii*. *Plant Science*, 161, pp. 1083- 1088, 2001.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 391-397, 2007.

SIHVONEN, M.; JÄRVENPÄÄ, E.; HIETANIEMI, V.; HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide Technologies. *Trends in Food Science & Technology*. 10, pp. 217-222, 1999.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J. T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, 82, pp. 1107-1118, 1990.

SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. *Principles of Instrumental Analysis*, 4th ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, 1995.

SOUZA, A. T.; BENAZZI, T. L.; GRINGS, M. B.; CABRAL, V.; SILVA, E. A.; CARDOZO FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erithropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47, pp. 182-187, 2008.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 33, pp. 35-52, 2005.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>- modeling of Extraction curves. *Chemical Engineering Science*, v. 49, pp. 409-414, 1994.

STUART, I.A.; MACLAGHLAN, J.; MCNAUGHTAN, A. Compounds of Agricultural Significance Using Environmental Analytical Supercritical Fluid Extraction, *Analyst*, p.121, 1996.

TAN, C., LIOU, D. Modeling of desorption at supercritical conditions. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v. 35, pp. 1029-1031, 1989.

TAVARES, W., *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*, 2 ed. Atheneu, São Paulo, 792 p., 1999.

TORRES-RODRIGUES, J. M.; MADRENYS-BRUNET, N.; URREA-ARBELÁEZ, A.; LÓPEZ-JODRA, O. Terbinafina por via oral en el tratamiento de latinea unguium de los pies. Eficacia entre 12 y 14 semanas de tratamiento. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15: pp. 160-162, 1998.

ULTEE, A., KETS, E., SMID, E. Mechanisms of actions of carvacrol on the food borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, pp. 4606-4610, 1999.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001.

ZAIAS, M. D.; GERBERT-REBELL, M. S. Chronic dermatophytosis syndrome due to *Trichophyton rubrum*. *International Journal of Dermatology*, 35: pp. 614-618, 1996.

## ANEXO

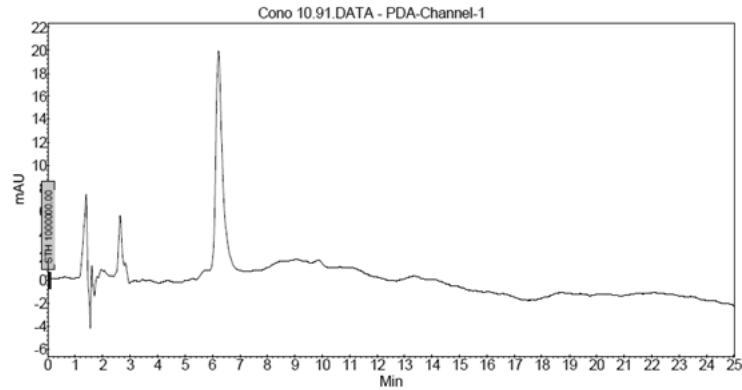


Figura 32. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 10,90 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

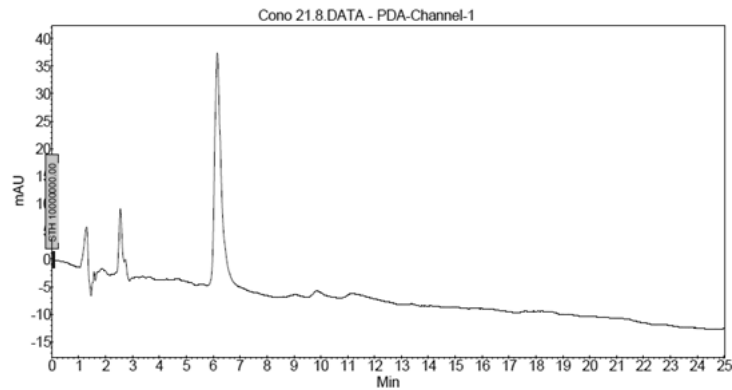


Figura 33. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 21,80 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

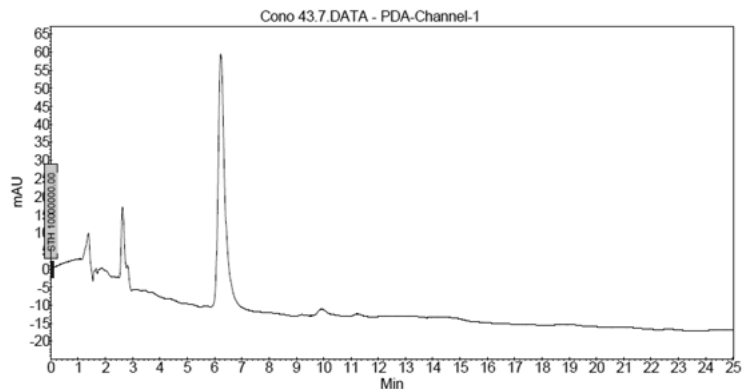


Figura 34. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 43,70 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

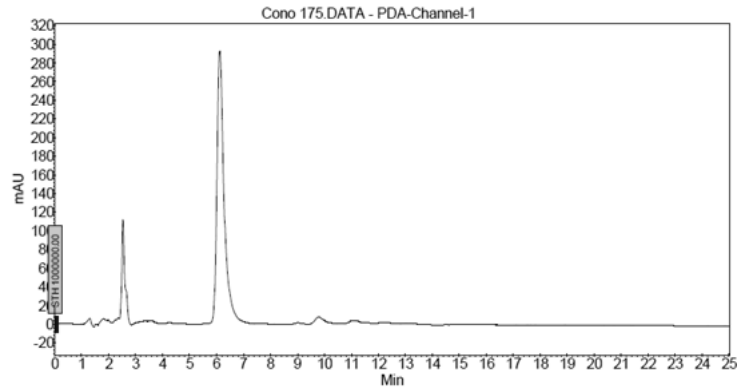


Figura 35. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de conocarpano na concentração de 175  $\mu\text{g/mL}$  em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

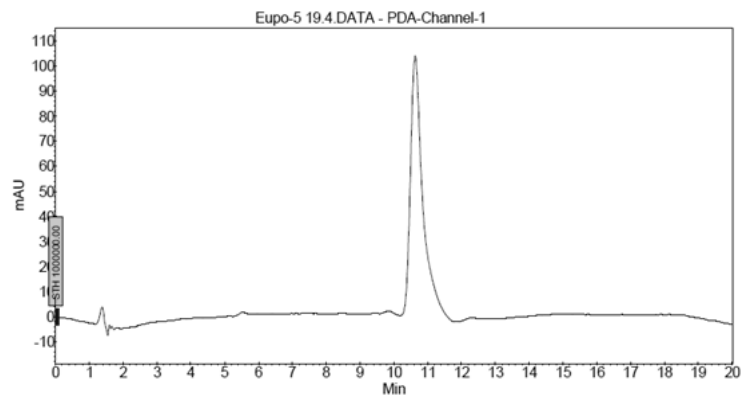


Figura 36. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomatenóide-5 na concentração de 19,40  $\mu\text{g/mL}$  em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

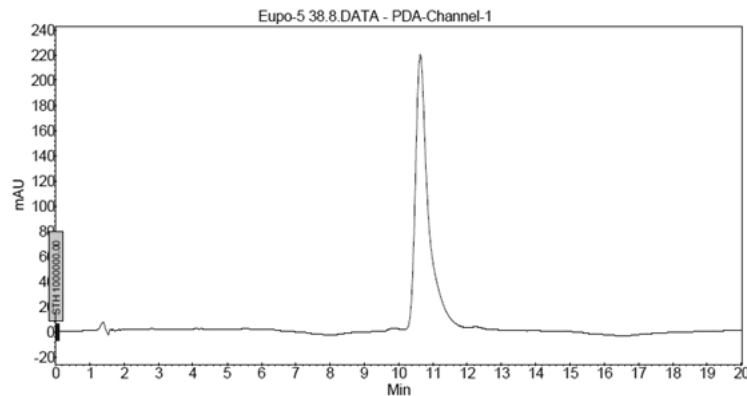


Figura 37. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomatenóide-5 na concentração de 38,80  $\mu\text{g/mL}$  em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

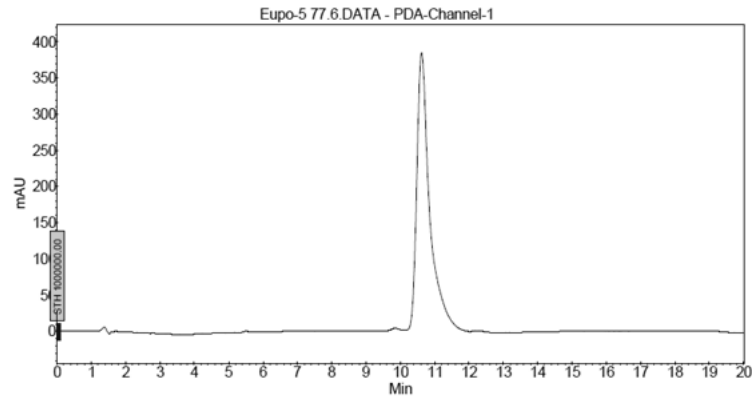


Figura 38. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomaténide-5 na concentração de 77,60 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

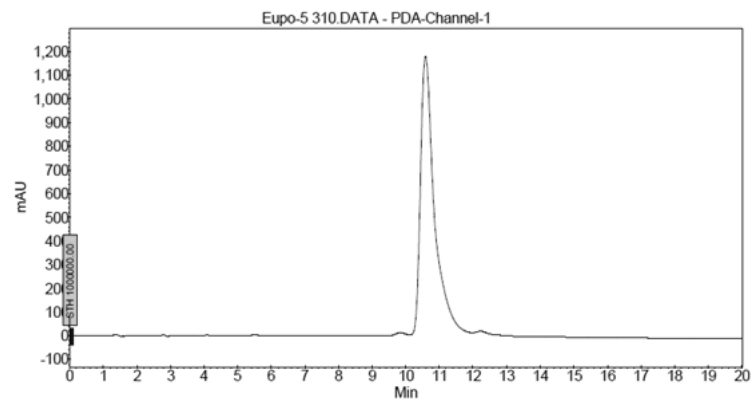


Figura 39. Cromatograma obtido a 280 nm da solução de eupomaténide-5 na concentração de 310 µg/mL em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

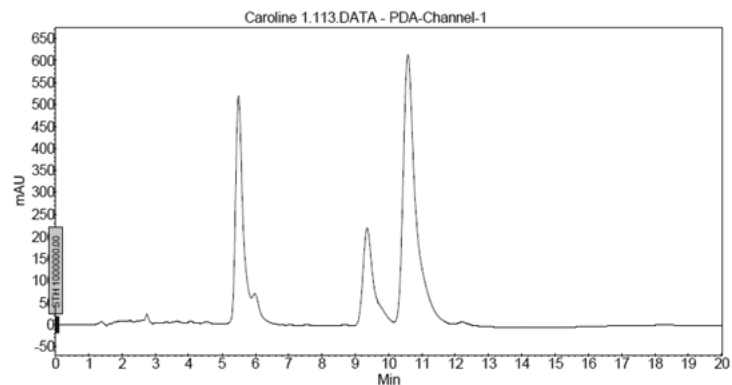


Figura 40. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 109,2 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

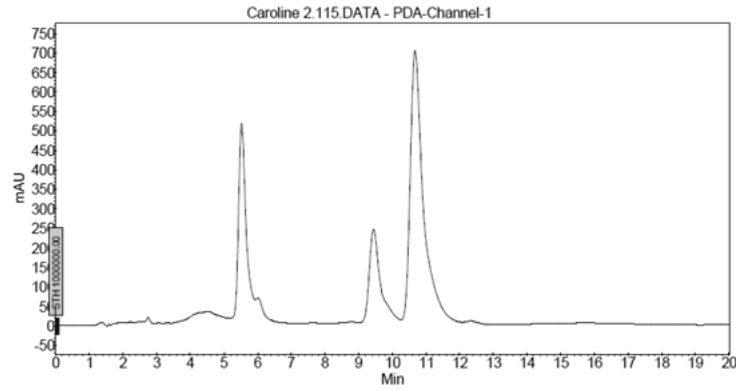


Figura 41. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 150 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

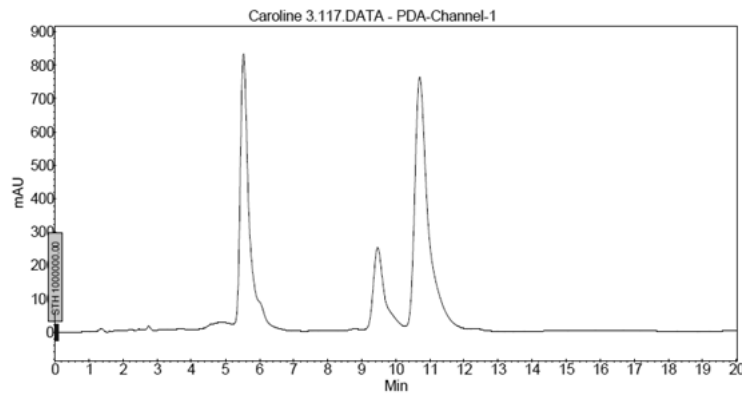


Figura 42. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 176,7 bar e 60 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

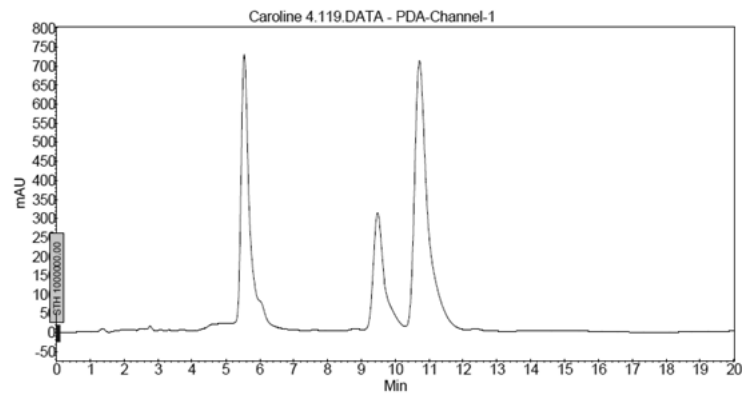


Figura 43. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 244,1 bar e 60 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

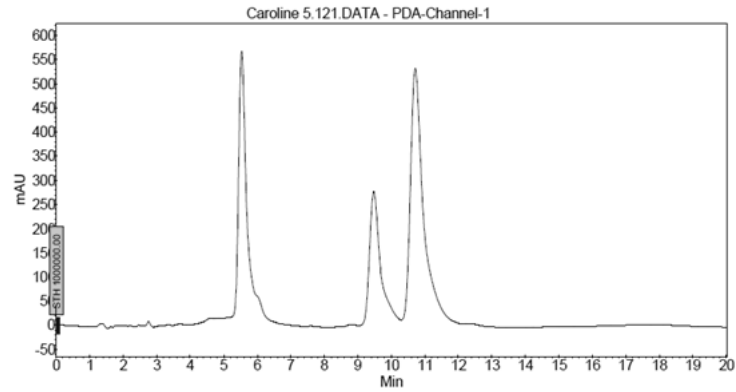


Figura 44. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por ESC em 250 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

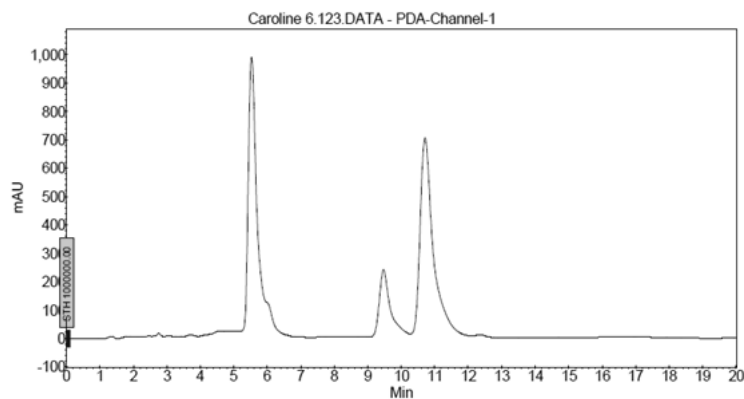


Figura 45. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 109,2 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

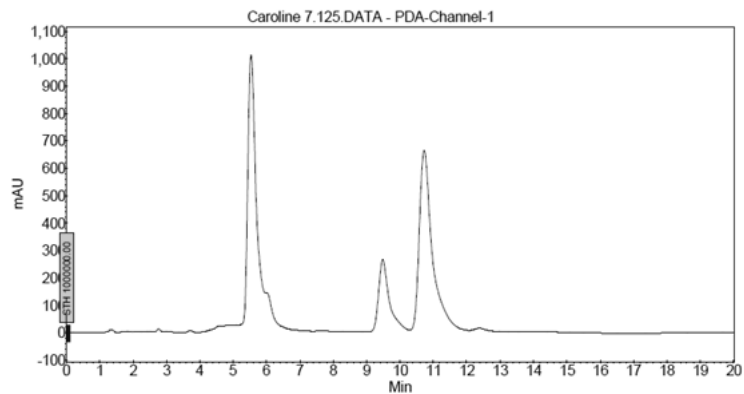


Figura 46. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 150 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.



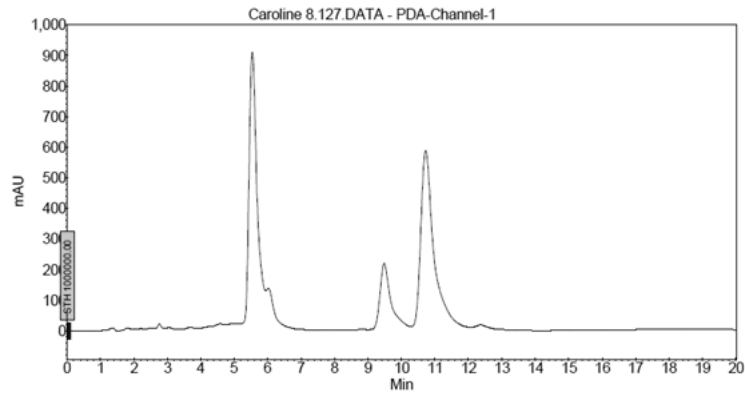


Figura 47. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 176,7 bar e 60 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

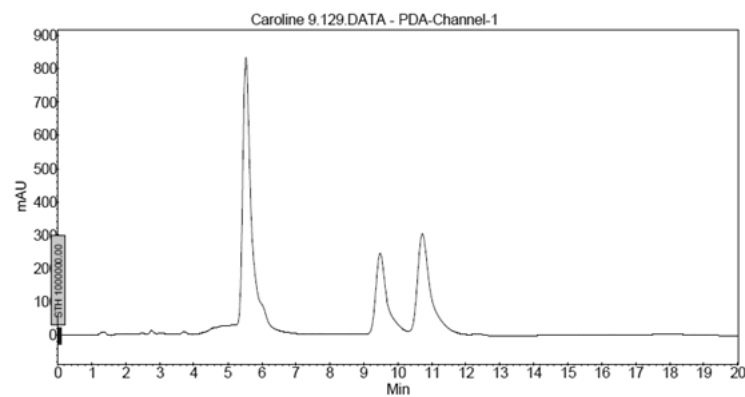


Figura 48. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 244,1 bar e 60 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

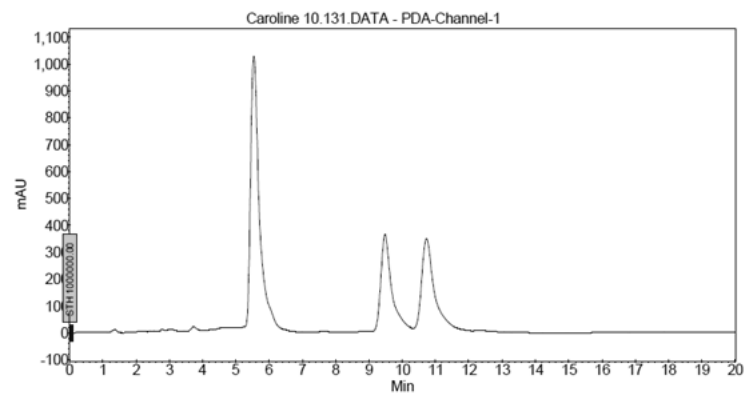


Figura 49. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por ESC em 250 bar e 40 °C em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

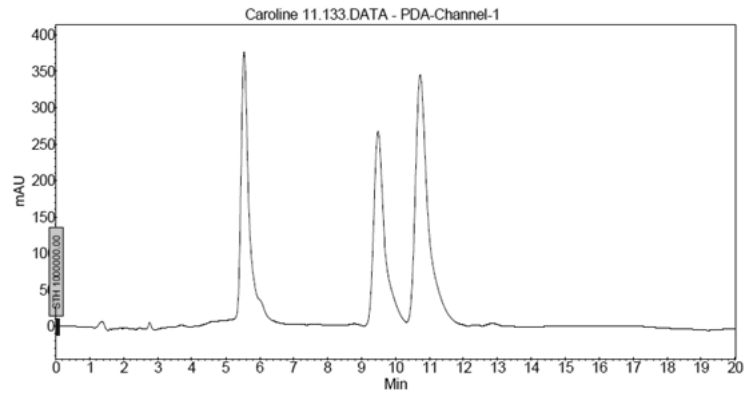


Figura 50. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por soxhlet com hexano em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

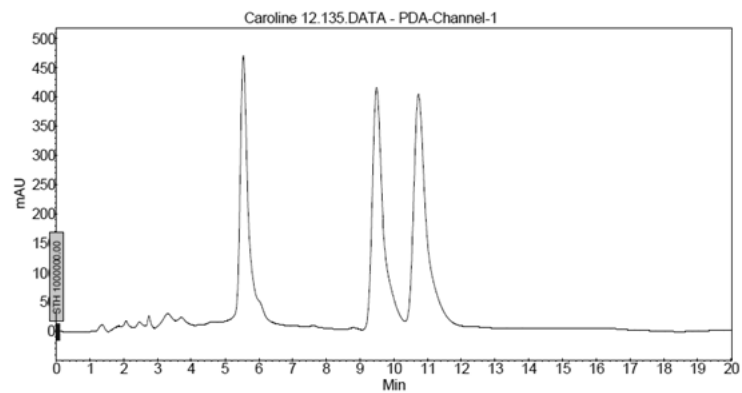


Figura 51. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato das folhas obtido por soxhlet com diclorometano em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

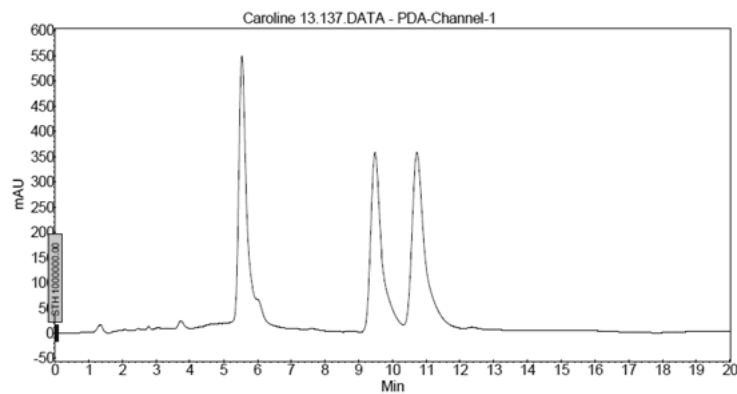


Figura 52. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por soxhlet com hexano em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

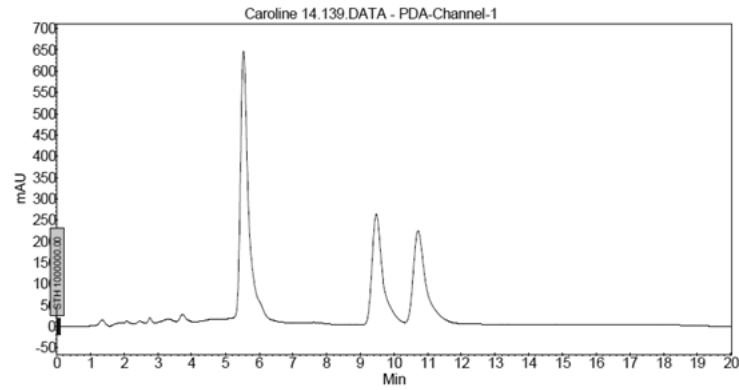


Figura 53. Cromatograma obtido a 280 nm da solução do extrato dos caules obtido por soxhlet com diclorometano em fase móvel acetonitrila:água (60:40 v/v) contendo 2% de ácido acético Glacial.

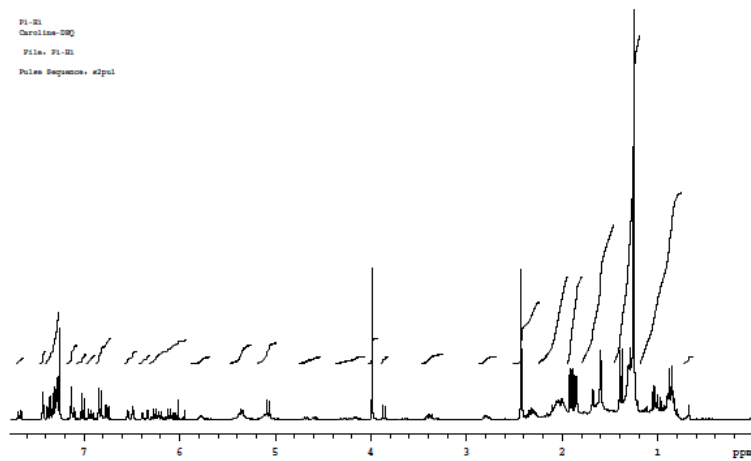


Figura 54. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub> para o extrato das folhas obtido a 109,2 bar e 40 °C.

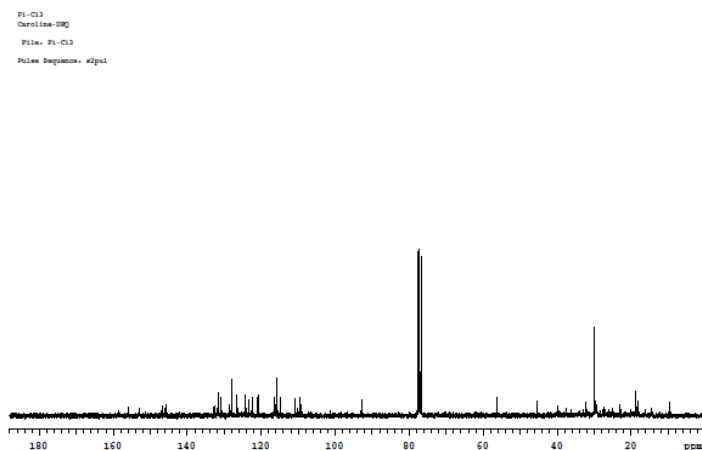


Figura 55. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na frequência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub> para o extrato das folhas obtido a 109,2 bar e 40 °C.

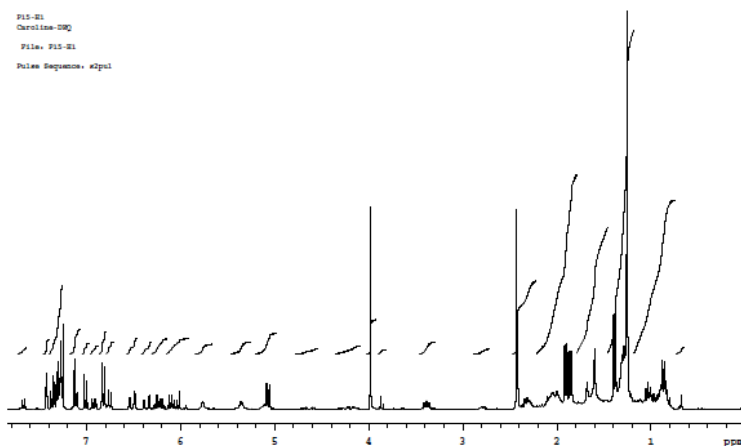


Figura 56. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido a 150,0 bar e 40°C.

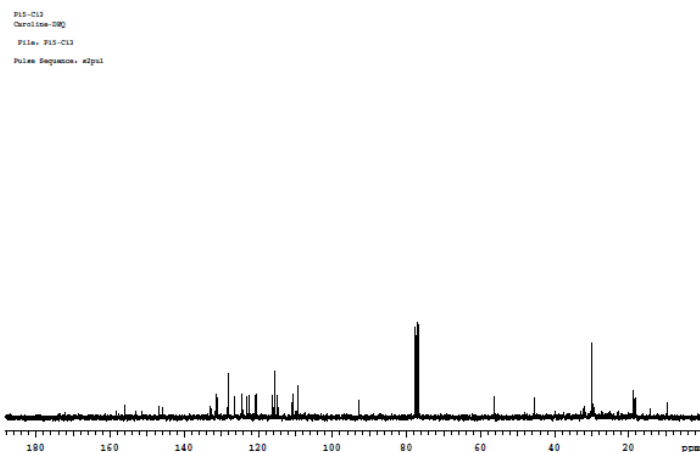


Figura 57. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na frequência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido a 150,0 bar e 40°C.

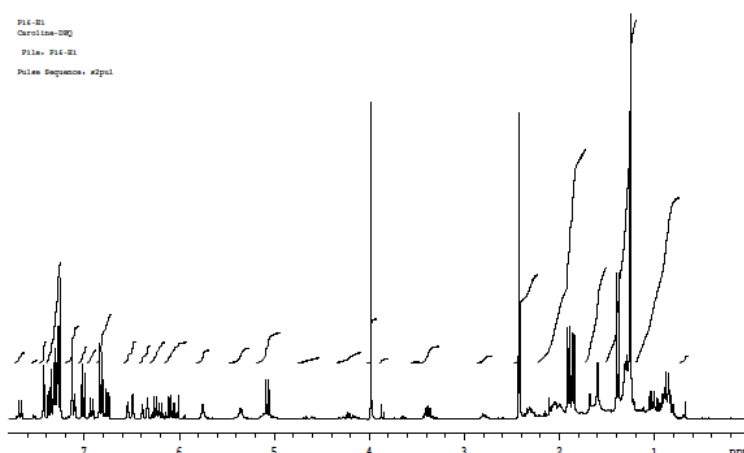


Figura 58. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido a 176,7 bar e 60°C.

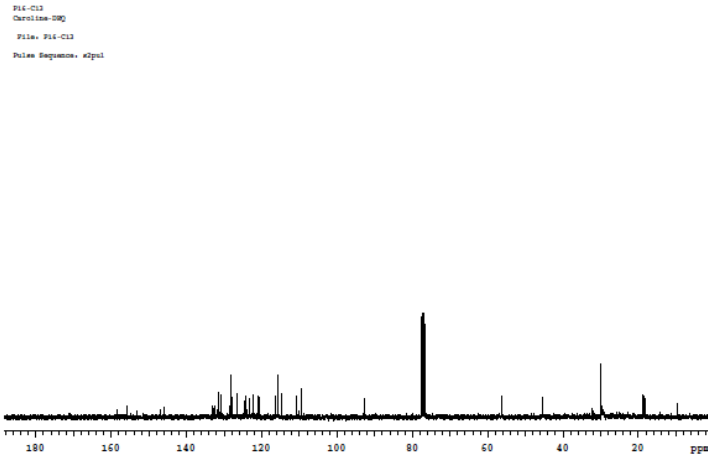


Figura 59. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na freqüência de 75,458 mHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido a 176,7 bar e 60°C.

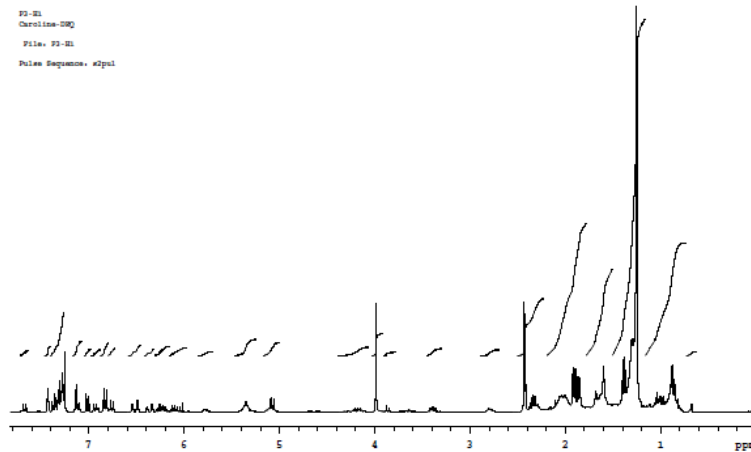


Figura 60. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na freqüência de 300,060 mHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido a 244,1 bar e 60°C.

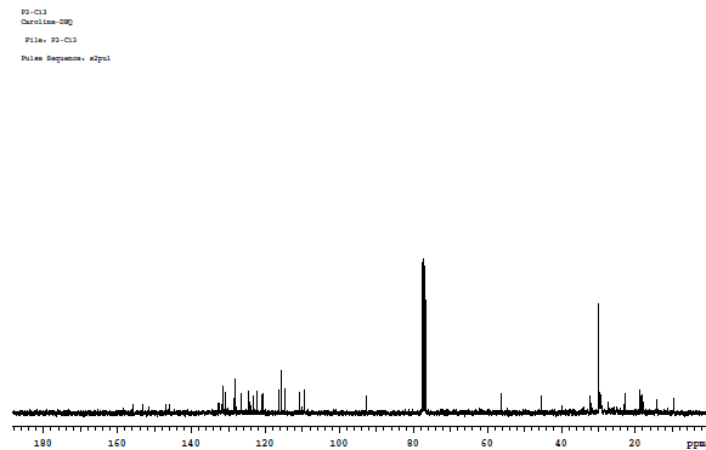


Figura 61. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na freqüência de 75,458 mHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido a 244,1 bar e 60°C.

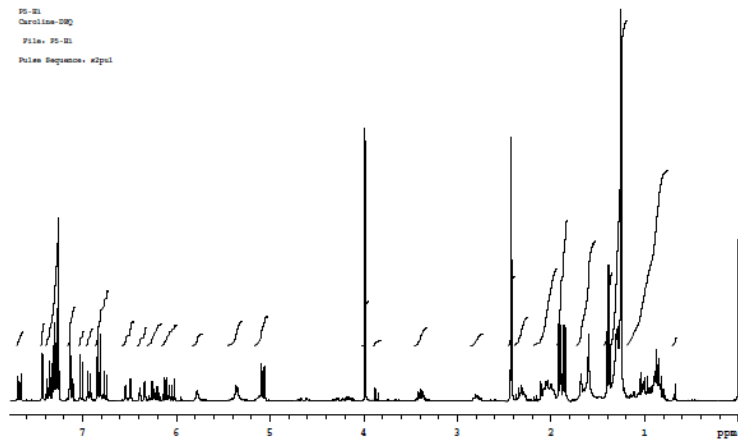


Figura 62. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido a 250,0 bar e 40 °C.

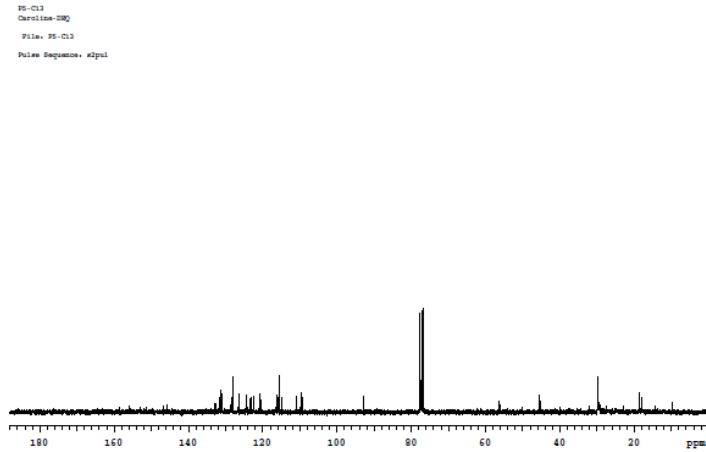


Figura 63. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na frequência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido a 250,0 bar e 40 °C.

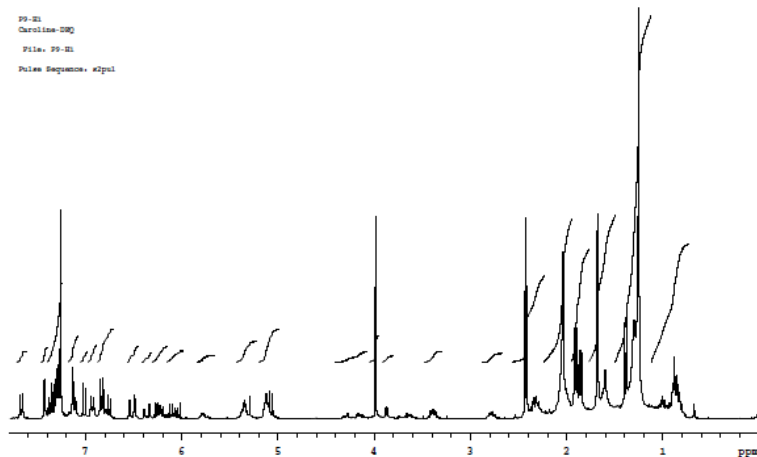


Figura 64. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido em soxhlet com diclorometano.

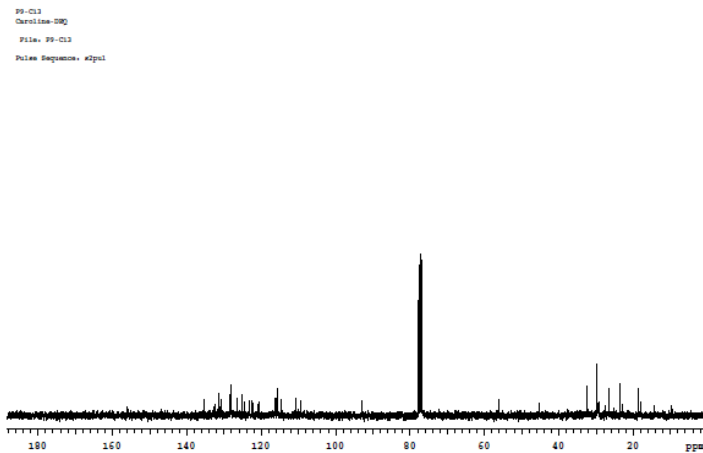


Figura 65. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para oextrato das folhas obtido em soxhlet com diclorometano.

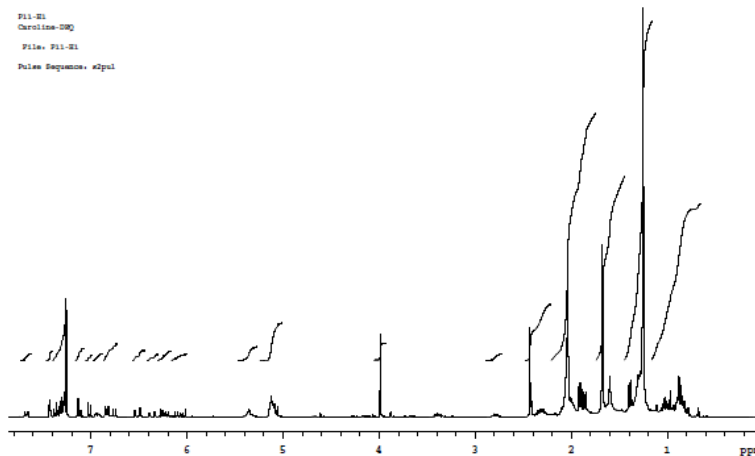


Figura 66. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato das folhas obtido em soxhlet com hexano.

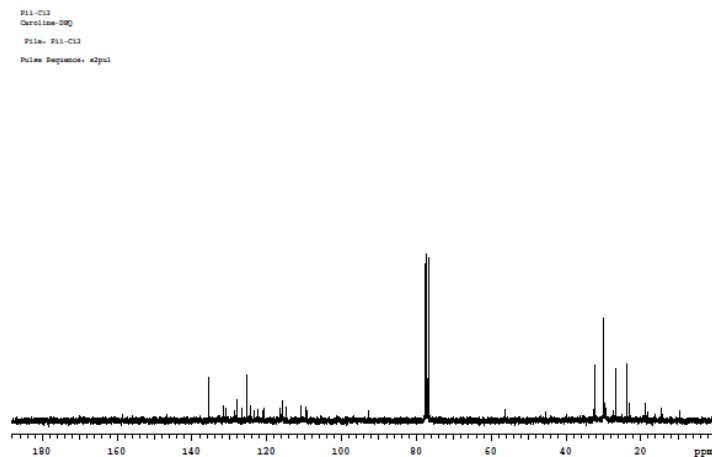


Figura 67. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para oextrato das folhas obtido em soxhlet com hexano.

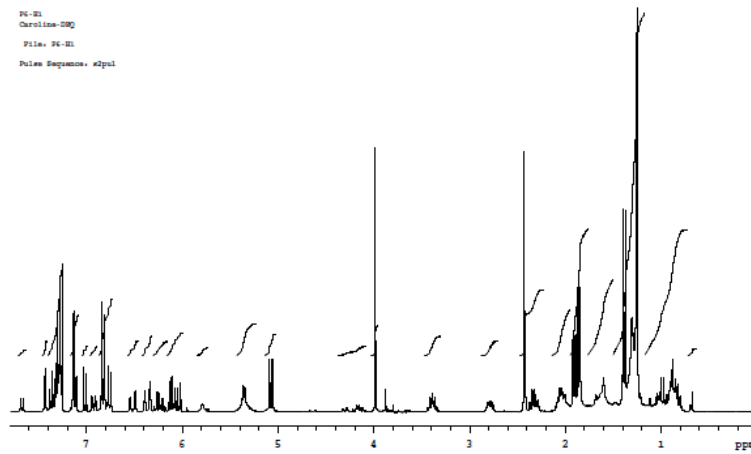


Figura 68. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>, para o extrato dos caules obtido a 109,2 bar e 40°C.

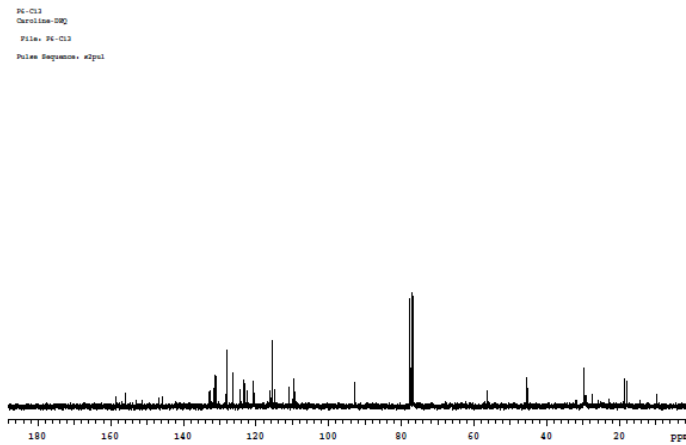


Figura 69. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na frequência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>, para o extrato dos caules obtido a 109,2 bar e 40°C.

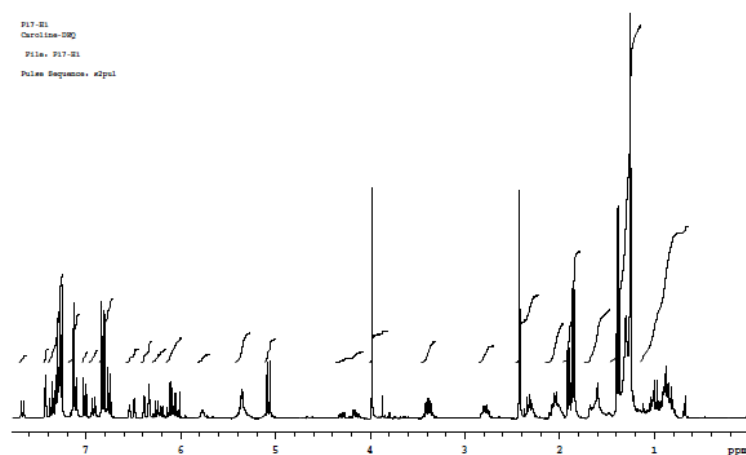




Figura 70. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato dos caules obtido a 150,0 bar e 40°C.

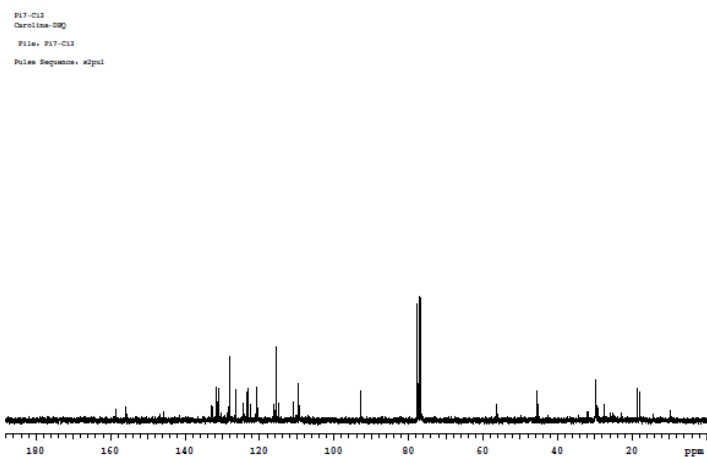


Figura 71. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na freqüência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato dos caules obtido a 150,0 bar e 40°C.

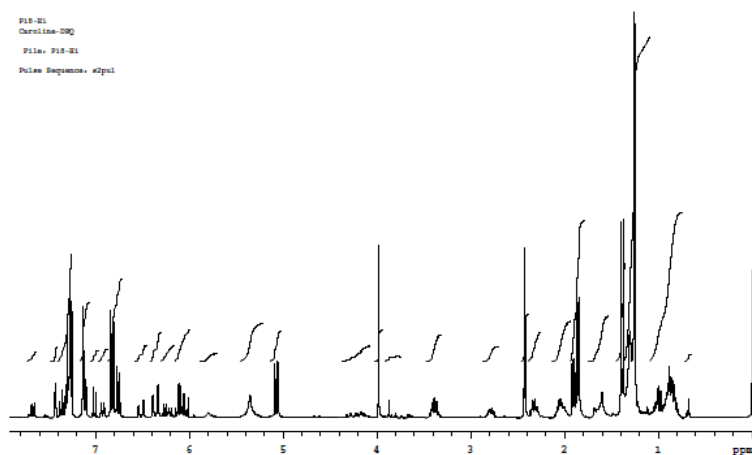


Figura 72. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na freqüência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato dos caules obtido a 176,7 bar e 60°C.

F18-C13  
Carolina-08Q  
File: F18-C13  
Pulse Sequence: #2pul

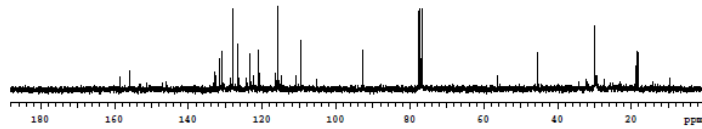


Figura 73. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na frequência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato dos caules obtido a 176,7 bar e 60°C.

F7-H1  
Carolina-08Q  
File: F7-H1  
Pulse Sequence: #2pul

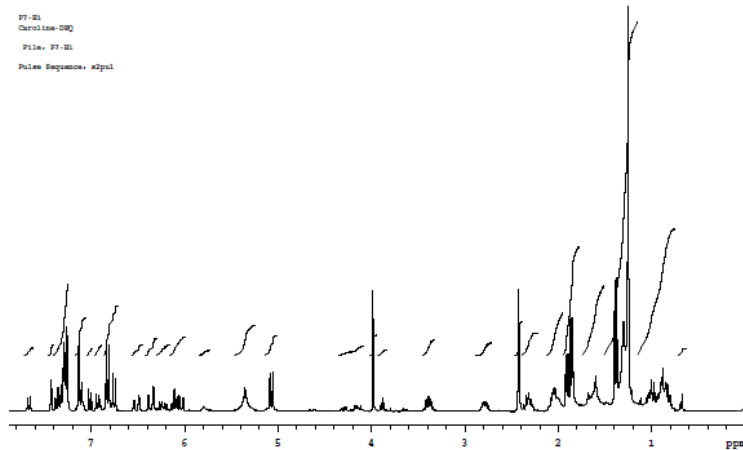


Figura 74. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato dos caules obtido a 244,1 bar e 60°C.

F7-C13  
Carolina-08Q  
File: F7-C13  
Pulse Sequence: #2pul

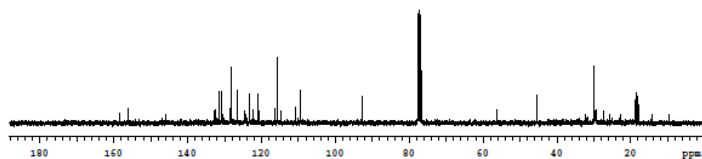


Figura 75. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na frequência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>.para o extrato dos caules obtido a 244,1 bar e 60°C.

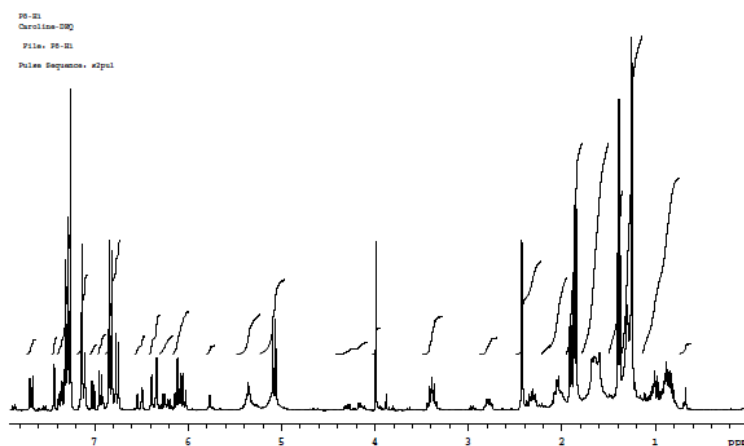


Figura 76. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  na frequência de 300,060 MHz em solvente  $\text{CDCl}_3$ . para o extrato dos caules obtido a 250,0 bar e 40°C.

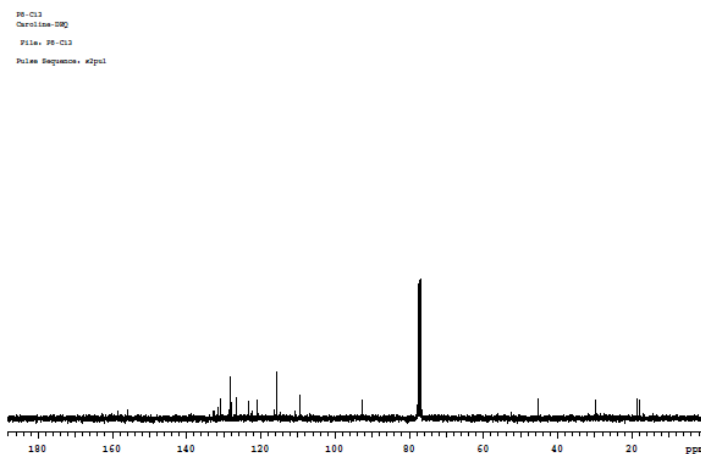


Figura 77. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  na frequência de 75,458 MHz em solvente  $\text{CDCl}_3$ . para o extrato dos caules obtido a 250,0 bar e 40°C.

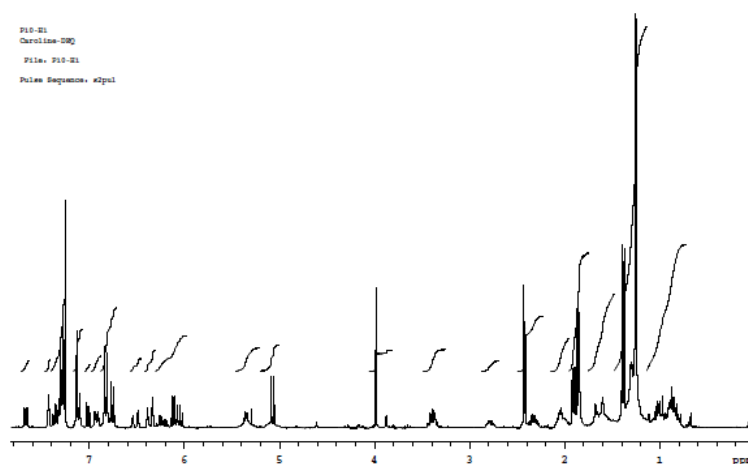


Figura 78. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  na frequência de 300,060 MHz em solvente  $\text{CDCl}_3$ . para o extrato dos caules obtido em soxhlet com diclorometano.

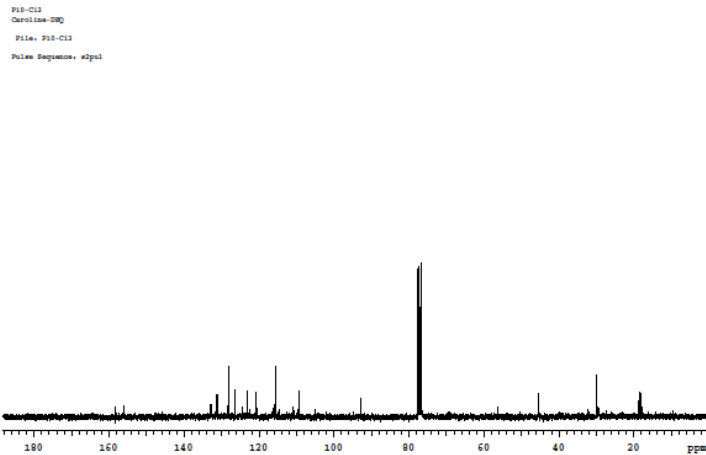


Figura 79. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na frequência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>, para o extrato dos caules obtido em soxhlet com diclorometano.

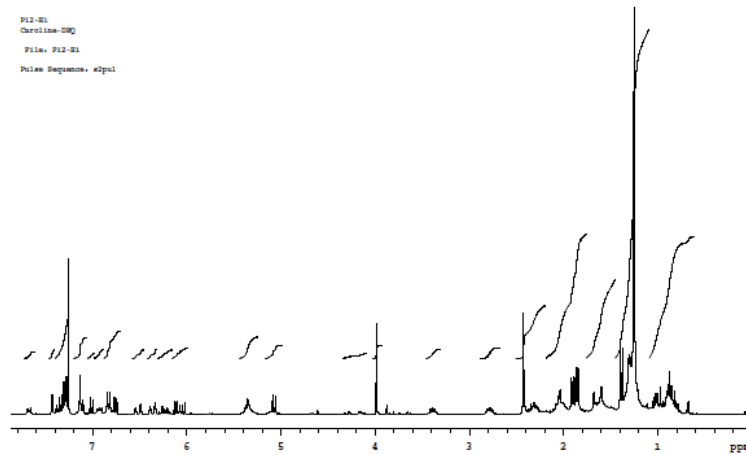


Figura 80. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H na frequência de 300,060 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>, para o extrato dos caules obtido em soxhlet com hexano.

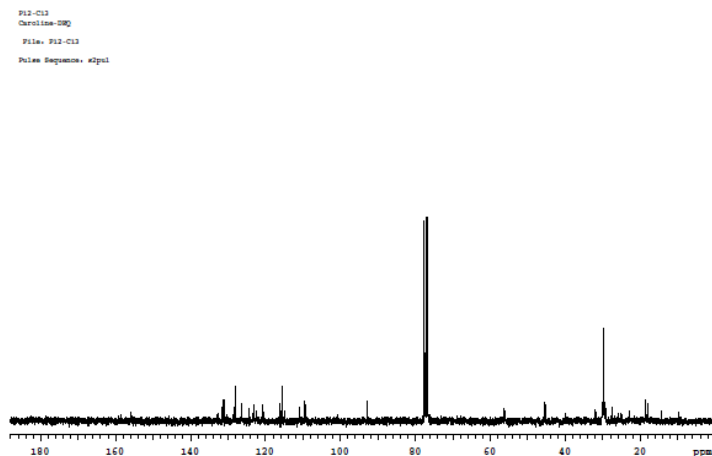


Figura 81. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C na frequência de 75,458 MHz em solvente CDCl<sub>3</sub>, para o extrato dos caules obtido em soxhlet com hexano.