

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

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE *Calophyllum brasiliense* Cambess  
UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO**

Renata Menoci Gonçalves

Eng<sup>a</sup> de Alimentos, UEM, 2005

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  
Mestre em Engenharia Química, área  
de Equilíbrio de Fases e Propriedades  
Termodinâmicas.

Maringá – PR – Brasil

Dezembro de 2011

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

G635o Gonçaves, Renata Menoci  
Obtenção de extratos bioativos de *Calophyllum  
brasiliense* Cambess utilizando fluido pressurizado /  
Renata Menoci Gonçalves. -- Maringá, 2011.  
89 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Prof. 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. *Calophyllum brasiliense* Cambess - Extração  
supercrítica. 2. Extratos bioativos. 3. Atividade  
antimicrobiana. 4. Atividade antioxidante. 5.  
Modelagem matemática. I. Cabral, Vladimir Ferreira,  
orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro  
de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
III. Título.

CDD 21.ed.660.284248

ECSL-00074

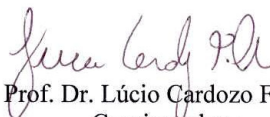
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Renata Menoci Gonçalves 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



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivana Correa Ramos Leal  
Membro



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia Regina Netto dos Santos  
Membro

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me proteger, orientar e por estar sempre presente na minha vida tornando tudo possível, além de me honrar em conhecer e poder trabalhar próximo a pessoas tão extraordinárias.

Ao Prof. Dr. Vladimir Ferreira Cabral, pela oportunidade, orientação, confiança e contribuições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho toda minha gratidão e respeito por sua atenção, coorientação, confiança, presença em todas as dificuldades enfrentadas e honestidade fundamentais a todos os aspectos relevantes ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Diógenes Aparício Cortez pelo fornecimento das matérias-primas utilizadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. Edson Antônio da Silva pelo auxílio no desenvolvimento da modelagem matemática.

À Prof<sup>a</sup>. Vera Lúcia Dias Siqueira pela ajuda e apoio nos testes de atividade antibacteriana.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Terezinha Svidzinski e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Cristiane Baeza e suas alunas Janine e Patrícia pela realização dos ensaios de atividade antifúngica.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pelos ensaios de citotoxicidade.

Aos companheiros de jornada Carolina, Elisângela, Simone, Vitor e Wylliam pela companhia, amizade e colaboração durante esses dois anos.

A meu irmão Rodrigo, a minha cunhada Andresa e a pequena Bruna pelo amor e incentivo.

A meu noivo Rodrigo pelo amor, respeito, incentivo e compreensão da minha ausência.

Aos meus pais Gilmar Godinho Gonçalves e Lucimar Aparecida Menoci Gonçalves por todo amor, incentivo, confiança e apoio em todos os momentos dessa caminhada.

A todos os demais familiares, avós, tios, primos que, mesmo distantes estavam sempre presentes fornecendo a base que sustenta o equilíbrio de qualquer indivíduo, a família.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá (DEQ), e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PEQ) pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

"Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída".

(Mahatma Gandhi)

## OBTENÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE *Calophyllum brasiliense* Cambess UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO

**AUTOR: RENATA MENOCI GONÇALVES**

**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 08 de dezembro de 2011. P.

### RESUMO

O *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), conhecido como guanandi é utilizado popularmente para o tratamento de bronquite, distúrbios gástricos e hepáticos, dor, inflamações, diabetes, hipertensão, diarreia e herpes. As plantas deste gênero têm sido uma rica fonte de substâncias bioativas incluindo cumarinas, xantonas, esteróides, triterpenos e biflavonóides. Dentre os diferentes métodos para extração de compostos bioativos de materiais vegetais, pode-se destacar a extração supercrítica, um processo de separação a alta pressão, livre de resíduos tóxicos, que não provoca degradação térmica dos extratos e preserva a qualidade de produtos termosensíveis. Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparação dos extratos bioativos das folhas de *Calophyllum brasiliense* obtidos via extração supercrítica (ESC) e extração convencional, visando a determinação do rendimento do processo, a composição e as atividades biológicas dos extratos. As condições de operação para extração com CO<sub>2</sub> pressurizado foram de 40 e 60°C e pressões variando de 109,2 a 250 bar, e para extração convencional foram utilizados os solventes diclorometano e n-hexano. O melhor rendimento foi obtido para extração com diclorometano, entretanto este foi o extrato que apresentou menor teor da (-) mammea A/BB, enquanto a ESC mostrou o melhor rendimento na condição de 60 °C e 244,1 bar. A modelagem matemática de segunda ordem ajustou-se satisfatoriamente aos dados experimentais. A atividade antioxidante dos extratos, utilizando a metodologia de redução de DPPH\*, não apresentou um bom resultado. O teor de fenóis totais foi alto, o que já era esperado, uma vez que as plantas desse gênero são constituídas de substâncias bioativas incluindo cumarinas, xantonas e biflavonóides. Foi observado também que a concentração da cumarina (-) mammea A/BB, marcador químico, foi maior nos extratos obtidos com fluido pressurizado. A quantificação deste composto é importante devido às substâncias dessa classe demonstrarem atividades farmacológicas potentes e relevantes e serem de baixa toxicidade para os mamíferos. A análise antibacteriana mostrou que nenhum dos extratos apresentou atividade frente aos microrganismos Gram-negativos, já contra os Gram-positivos os extratos obtidos via ESC foram fortemente ativos com CIM entre 15,62 e 31,2 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e entre 3,91 e 7,81 µg/mL para *S. aureus* multirresistente, além de apresentarem um índice de seletividade satisfatório frente ao macrófago J774G8. Para a atividade antifúngica o extrato obtido com diclorometano apresentou o melhor resultado para todos os microrganismos testados. Os resultados obtidos demonstram que a ESC é um eficiente método para obter compostos bioativos de *C. brasiliense*, preservando as propriedades associadas com a atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: *Calophyllum brasiliense*, extração supercrítica, (-) mammea A/BB, atividade biológica, modelagem matemática.

## OBTAIN EXTRACTS BIOACTIVES OF *Calophyllum brasiliense* Cambess USING PRESSURIZED FLUID

**AUTHOR: RENATA MENOCI GONÇALVES**

**SUPERVISOR: PROF. DR. VLADIMIR FERREIRA CABRAL**

**CO-SUPERVISOR: PROF. DR. LÚCIO CARDOZO FILHO**

Master dissertation; Chemical Engineering Specialization Program; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brazil, defended in December 8<sup>th</sup> 2011. P.

### ABSTRACT

The *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), known popularly as guanandi, is used to treat bronchitis, gastric and hepatic disorders, pain, inflammation, diabetes, hypertension, diarrhea, and herpes. Plants of this kind have been a rich source of bioactive substances including coumarins, xanthenes, steroids, triterpenes and biflavonoids. Among the different methods for extraction of bioactive compounds of plant materials, it can be highlighted the supercritical extraction, a process of high-pressure separation, free from toxic waste, which doesn't cause thermal degradation to extracts and preserves the quality of thermosensitive products. The objective of this study was the extraction of bioactive compounds from the leaves of *Calophyllum brasiliense* via supercritical extraction (SCE) and conventional extraction in order to determine the performance of the process, the composition and biological activities of the extracts. The operating conditions for the extraction of pressurized CO<sub>2</sub> were 40 and 60 ° C and pressures ranging from 109.2 to 250 bar, and for the conventional extraction solvents dichloromethane and hexane were used. The best performance was obtained for the extraction with dichloromethane, though this was the extract that presented the lowest content of (-) mammea A/BB, while the ESC showed the best performance in the condition of 60 ° C and 244.1 bar. The Mathematical modeling of second-order fit well the experimental data. The antioxidant activity of extracts, using the method of reduction of DPPH\* in the extracts studied did not present a good result. The content of total phenols was high, which was already expected, since the plants of this kind are composed of bioactive substances including coumarins, xanthenes and biflavonoids. It was also observed that the concentration of cumarima (-) mammea A/BB, chemical marker, was higher in extracts obtained with pressurized fluid. The quantification of this compound is important due to the fact that the substances of this class show potent pharmacological activities and relevant and are of low toxicity to mammals. The analysis showed that none of the antibacterial extracts presented activity against the Gram-negative microorganisms, as against the Gram-positive the extracts obtained via the SCE were strongly active with MIC between 15.62 and 31.2 µg/mL for *Staphylococcus aureus* and between 3.91 and 7.81 µg/mL for *S. aureus* multiresistant and presented a good selectivity index against the macrophage J774G8. For the antifungal activity the extract obtained with dichloromethane presented a better result for all the microorganisms tested. The results obtained showed that the SCE is an efficient method to obtain bioactive compounds of *C. brasiliense*, preserving the properties associated with the antimicrobial activity.

Key-words: *Calophullum brasiliense*, supercritical extraction, (-) mammea A/BB, biological activity, mathematical modeling.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de fases para uma substância pura com representação molecular dos estados de agregação da matéria. ....	17
Figura 2- Representação esquemática de um extrator de leito fixo de partículas esféricas e dos mecanismos de transporte de massa proposto pelo modelo de difusão.....	19
Figura 3 - Espécie vegetal <i>C. brasiliense</i> Cambess. ....	21
Figura 4 – Estruturas químicas das substâncias identificadas em <i>Calophyllum brasiliense</i> . .....	27
Figura 5 - Esquema do equipamento Soxhlet utilizado na extração com solvente orgânico. .....	43
Figura 6 – Esquema do módulo experimental utilizado na extração com fluido pressurizado. ....	44
Figura 7 - Dependência da densidade do CO <sub>2</sub> com a pressão e temperatura e condições usuais para a extração de compostos fenólicos.....	45
Figura 8 – Esquema da microplaca para determinação da CIM de bactérias.....	48
Figura 9 - Esquema da placa de microtitulação para determinação da CIM de fungos leveduriformes. ....	50
Figura 10 – Curvas de extração das folhas de <i>Calophyllum brasiliense</i> para o mesh 30.	59
Figura 11 – Curvas de extração das folhas de <i>Calophyllum brasiliense</i> para o mesh 50.	59
Figura 12 – Isotermas de rendimento global das folhas de <i>Calophyllum brasiliense</i> para o mesh 30.....	60
Figura 13 – Isotermas de rendimento global das folhas de <i>Calophyllum brasiliense</i> para o mesh 50.....	60
Figura 14 – Curva de calibração do padrão externo (-) mammea A/BB. ....	61
Figura 15 – Cromatograma do padrão externo (-) mammea A/BB (RT = 27,05 min).....	62
Figura 16 – Cromatogramas dos extratos das folhas de <i>Calophyllum brasiliense</i> obtidos por extração convencional (Soxhlet).....	62
Figura 17 - Cromatogramas dos extratos das folhas de <i>Calophyllum brasiliense</i> obtidos por extração supercrítica. ....	63
Figura 18 - Eletromicrografias do material vegetal antes e após o processo de extração. . .....	65
Figura 19 - Gráfico com os valores EC <sub>50</sub> para as diferentes condições de extração .....	73
Figura 20 - Curva de calibração do padrão ácido gálico. ....	75
Figura 21 – Cinéticas de extração experimentais e modeladas para as folhas de mesh 30 de <i>Calophyllum brasiliense</i> . ....	77



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Ordens de magnitude de parâmetros físicos para gases, fluidos supercríticos e líquidos.....	16
Tabela 2 - Substâncias isoladas de <i>Calophyllum brasiliense</i> de acordo com suas diferentes partes.....	24
Tabela 3 - Substâncias isoladas, extrato ou frações de <i>Calophyllum brasiliense</i> e suas atividades biológicas.....	35
Tabela 4 – Modelos matemáticos baseados na transferência de massa para ESC de produtos naturais.....	39
Tabela 5 - Condições operacionais de extração usando o CO <sub>2</sub> .....	46
Tabela 6 – Rendimento global do extrato das folhas de <i>C. brasiliense</i> obtido por ESC e solvente orgânico.....	57
Tabela 7 – Efeito da granulometria no rendimento da extração.....	58
Tabela 8 – Quantificação da substância (-) mamea A/BB dos extratos das folhas de <i>Calophyllum brasiliense</i> obtidos pelos diferentes métodos de extração.....	64
Tabela 9 – Resultados da Concentração Inibitória mínima dos extratos de <i>C. brasiliense</i> .....	66
Tabela 10 – Resultados do CIM e CFM para os fungos leveduriformes.....	69
Tabela 11 – Resultados do CIM e CFM para os fungos filamentosos.....	69
Tabela 12 – Dados da concentração citotóxica em 50% dos macrófagos (CC <sub>50</sub> ) para os extratos obtidos por ESC e convencional.....	71
Tabela 13 – Valores calculados do índice de seletividade (IS) dos extratos obtidos por ESC e convencional para os diferentes microrganismos.....	71
Tabela 14 – Dados de Atividade Antioxidante (%) dos extratos obtidos na ESC e convencional utilizando o método DPPH*.....	72
Tabela 15 – Dados de fenóis totais (EAG) para as extrações com fluido pressurizado e solvente orgânico.....	75
Tabela 16 – Parâmetros de transferência de massa e constante $k_f$ utilizados para a modelagem matemática de acordo com cada condição de extração.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA - atividade antioxidante

% AA - percentual da atividade antioxidante

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

$C_{out}$  - concentração dos compostos bioativos na fase fluida na saída do extrator

CB – compostos bioativos

CC<sub>50</sub> – concentração citotóxica à 50%

CFM - concentração fungicida mínima

Cl<sub>50</sub> - concentração referente à inibição de 50%

Cl<sub>90</sub> - concentração referente à inibição de 90%

CIM - concentração inibitória mínima

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CN - controle negativo

CP - controle positivo

DE<sub>50</sub> – dose efetiva referente a 50 %

DL<sub>50</sub> - dose letal referente a 50 %

DL<sub>90</sub> - dose letal referente a 90 %

DMSO - dimetilsulfóxido

DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilidrazila

EAG - equivalentes de ácido gálico

EC<sub>50</sub> - concentração de extrato necessária para reduzir em 50% o DPPH• da reação

ESC - extração supercrítica

IS – índice de seletividade

$k$  - constante cinética

$L$  - comprimento da coluna

$m_{CB_j}^{EXP}$  - massa dos compostos bioativos obtida experimentalmente

$m_{CB_j}^{MOD}$  - massa calculada dos compostos bioativos extraídos

MEV – microscopia eletrônica de varredura

$n_{exp}$  - número de dados experimentais da curva cinética

OMS - organização mundial da saúde

P - pressão

$P_c$  - pressão crítica

$q$  - concentração dos compostos bioativos na matriz sólida

$q_0$  - quantidade inicial dos compostos bioativos concentrados na matriz sólida depois da pressurização do extrator

$Q_f$  - vazão volumétrica de solvente

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

$\epsilon$  - porosidade do leito

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

$\rho_{leito}$  - densidade no leito

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>ix</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC).....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
3.1 <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	20
3.1.1 Agrônômica.....	20
3.1.2 Composição química .....	22
3.1.3 Potencial Medicinal .....	30
3.2 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	38
3.3. ESTADO DA ARTE .....	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 MATERIAL VEGETAL .....	42
4.1.1 Secagem e moagem do material vegetal .....	42
4.1.2 Granulometria do material vegetal .....	42
4.2 EXTRAÇÃO .....	42
4.2.1 Extração com solvente orgânico .....	42
4.2.2 Extração com fluido pressurizado (ESC).....	43
4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	46
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	47
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	47
4.5.1 Atividade antibacteriana.....	47
4.5.2 Atividade antifúngica .....	49
4.6 CITOTOXICIDADE .....	51

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH* .....	52
4.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS .....	53
4.9 MODELAGEM MATEMÁTICA .....	54
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1 RENDIMENTO GLOBAL DA EXTRAÇÃO .....	57
5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	61
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	65
5.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	66
5.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	68
5.6 CITOTOXICIDADE .....	70
5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	72
5.8 TEOR DE FENÓIS TOTAIS .....	74
5.9 MODELAGEM MATEMÁTICA .....	76
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais na terapêutica é tão antigo quanto a civilização humana. Até meados do século XIX, os recursos terapêuticos eram pautados no uso de plantas e extratos vegetais (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003). Após séculos de uso empírico de preparações a base de ervas, a partir do século XIX, houve o interesse pelo isolamento dos princípios ativos, iniciando uma nova era da pesquisa moderna envolvendo plantas medicinais (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

Ao longo dos anos, o homem busca a cura de algumas doenças, como AIDS, câncer, doenças tropicais e infecções por microrganismos. Nestas buscas o homem tem encontrado nos produtos naturais uma fonte de substâncias promissoras, que são muito importantes na terapêutica, pois existem compostos isolados de plantas com ações farmacológicas diversas como, por exemplo, a morfina e que funcionam como protótipos ou modelos para o desenvolvimento de novos fármacos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

A etnomedicina é um dos principais aspectos a serem observados quando se investiga substâncias ativas de plantas, pois a probabilidade de se encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular é maior em relação às plantas escolhidas ao acaso (ELISABETSKY, 2003; RATES, 2001).

Uma vez que as plantas medicinais são uma das maiores fontes para a descoberta de novas substâncias químicas, com potencial atividade terapêutica e farmacológica, tem se buscado nos produtos naturais uma alternativa para a cura de infecções tropicais e doenças crônicas (EDITORIAL, 1994).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que, atualmente, aproximadamente 80% da população mundial adota a prática do uso de plantas medicinais como a principal opção terapêutica (ALVES; SILVA, 2002). Para Lorenzi e Matos (2002), a preocupação com a biodiversidade e as ideias de desenvolvimento sustentável despertou um novo interesse, e o uso das plantas é visto como forma de cooperar para a melhoria da qualidade de vida da população.

Neste contexto, o Brasil se destaca como um país de grande diversidade de plantas, com potencial para a produção de ingredientes para a formulação de alimentos funcionais, para a prevenção, controle e tratamento de diversas enfermidades. As plantas são ricas em uma variedade de metabólitos secundários, como terpenóides, alcalóides e flavonóides e apresentam propriedades funcionais. A obtenção de novos compostos químicos com propriedades terapêuticas como atividade antioxidante, antiinflamatória, antirreumática, digestiva entre outras, justifica o número crescente de estudos químicos e farmacológicos envolvendo plantas (SIMÕES et al., 2000).

A literatura é profícua em estudos de compostos bioativos que possuem propriedades terapêuticas e farmacológicas. Dentre a grande variedade de plantas com potencial medicinal encontra-se *Calophyllum brasiliense* devido a alta disponibilidade e fonte de substâncias bioativas.

O gênero *Calophyllum* pertencente à família Clusiaceae/Guttiferae e é composto por um grande grupo de árvores tropicais, com aproximadamente 180 - 200 espécies restritas aos trópicos quentes e úmidos (STEVENS, 1980). A *Calophyllum brasiliense*, conhecida popularmente como guanandi, é uma das espécies mais abundantes e amplamente distribuídas na América Latina (MESÍA-VELA et al., 2001). As plantas deste gênero têm se mostrado uma fonte rica de substâncias bioativas incluindo cumarinas, xantonas, esteróides, triterpenos e biflavonóides (ALI et al., 1999; MACKEE; COVINGTON, 1998; MOREL et al., 2000; REYES-CHILPA et al., 1997; SILVA et al., 2001).

Quanto às atividades biológicas descritas quanto a ação dos extratos e frações das folhas, caules e raízes na literatura, esta é uma das espécies mais estudadas, destacando-se as propriedades antibacterianas, antifúngicas, citotóxicas, inibitória da promoção de tumor e inibitória da replicação do HIV-1 IIIb/LAV (COTTIGLIA et al., 2004; HUERTA-REYES et al., 2004; ITO et al., 2002; ITO et al., 2003; PRETTO et al., 2004; REYES-CHILPA et al., 1997; REYES-CHILPA et al., 2004). O potencial leishmanicida em promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* dos extratos, frações e composto isolados das folhas (BRENZAN et al., 2007; HONDA et al., 2010;).

Para produção de extratos de plantas é necessário o estudo de técnicas para obtenção de extratos de alta qualidade, com grande rendimento e de baixo custo. A extração com solvente orgânico é comumente aplicada em indústrias, na qual se pode utilizar uma ampla variedade de solventes. Porém, esta técnica tem como principais restrições a possibilidade de contaminações ambientais, a extração de compostos indesejáveis, que pode diminuir o rendimento de compostos de interesse e aumentar o custo de fracionamento, a necessidade de um pós-processamento para remover o solvente e a possível presença de traços de solvente no extrato, reduzindo a qualidade do produto pela toxicidade destes solventes. O hexano, na extração pelo método Soxhlet, é o solvente mais utilizado para a extração de óleos comestíveis, devido à sua polaridade nula, elevado poder de solubilização, facilidade de separação do óleo no processo de recuperação do solvente e pela alta pureza.

Um método alternativo é a utilização da tecnologia supercrítica, considerada um processo limpo, que se utiliza como solvente gases acima de suas pressão e temperatura crítica, e os extratos obtidos através desta técnica apresentam alta pureza. Esta tecnologia tem sido muito empregada na obtenção de extratos de plantas que podem ser

utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica. Este processo apresenta vantagens distintas quando comparado com outras técnicas de separação: compostos termicamente instáveis podem ser separados a baixas temperaturas; o solvente pode ser removido facilmente do soluto por redução de pressão e/ou ajuste de temperatura; a necessidade de energia térmica é inferior à do processo de destilação; alta seletividade para os solutos; rápida extração devido à baixa viscosidade do solvente, alta difusividade e bom poder de solvatação do solvente (fluido supercrítico) (CHARPENTIER; SEVENANTS, 1988). A descafeinação de café (ZOZEL, 1974) e a extração de lúpulo são os exemplos mais conhecidos de aplicações comerciais em uso.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral comparar os extratos bioativos das folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess obtidos utilizando fluido pressurizado e solvente orgânico.

Para alcançar a meta do objetivo proposto, implementou-se o desenvolvimento das seguintes etapas:

- Determinar experimentalmente e comparar 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;
- Quantificar o composto (-) mamea A/BB nos extratos via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Obter as eletromicrografias do material vegetal antes e após o processo de extração;
- Avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica e citotóxica dos extratos contendo os compostos bioativos de *Calophyllum brasiliense* Cambess;
- Propor um modelo matemático para as cinéticas de extração de compostos bioativos.



## 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (ESC)

A Extração supercrítica considera os mesmos parâmetros operacionais de transferência de massa (propriedades físico-químicas do solvente/soluto, 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 possibilidade de uma extração mais completa (SKOOG; LEARY, 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 (RAVENTÓS; DUARTE; ALARCÓN, 2002; SIHVONEN et al., 1999).

Na Tabela 1 encontram-se evidenciado 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.

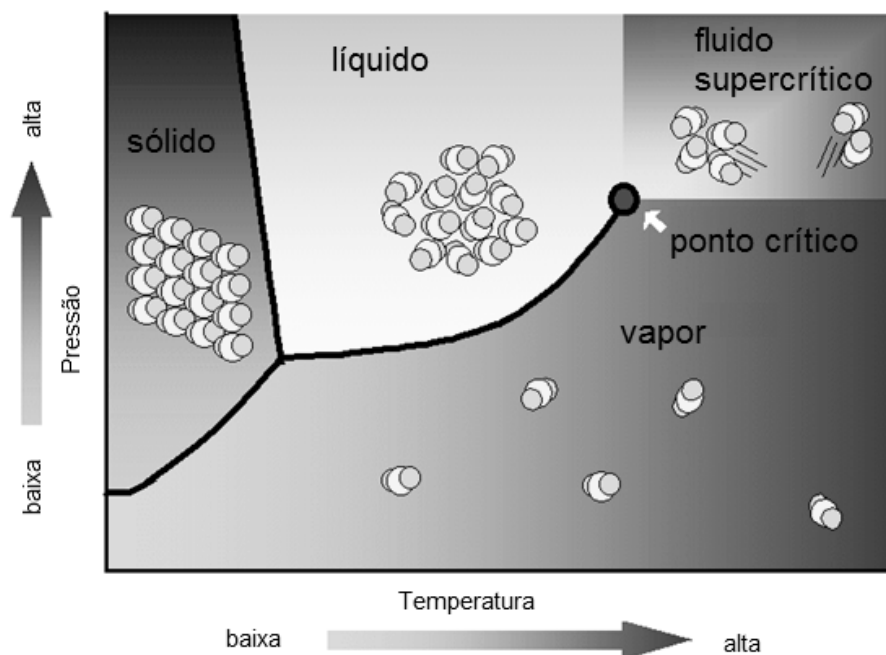


Figura 1 – Diagrama de fases para uma substância pura com representação molecular dos estados de agregação da matéria. Fonte: Cardozo-Filho (1999).

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 CO<sub>2</sub> 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 (McHUGH; KRUKONIS, 1986).

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 - CO<sub>2</sub> 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  $P_c = 73,8 \text{ bar}$ ) (McHUGH; 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 (McHUGH; 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). Como representado esquematicamente na 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 dos 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).

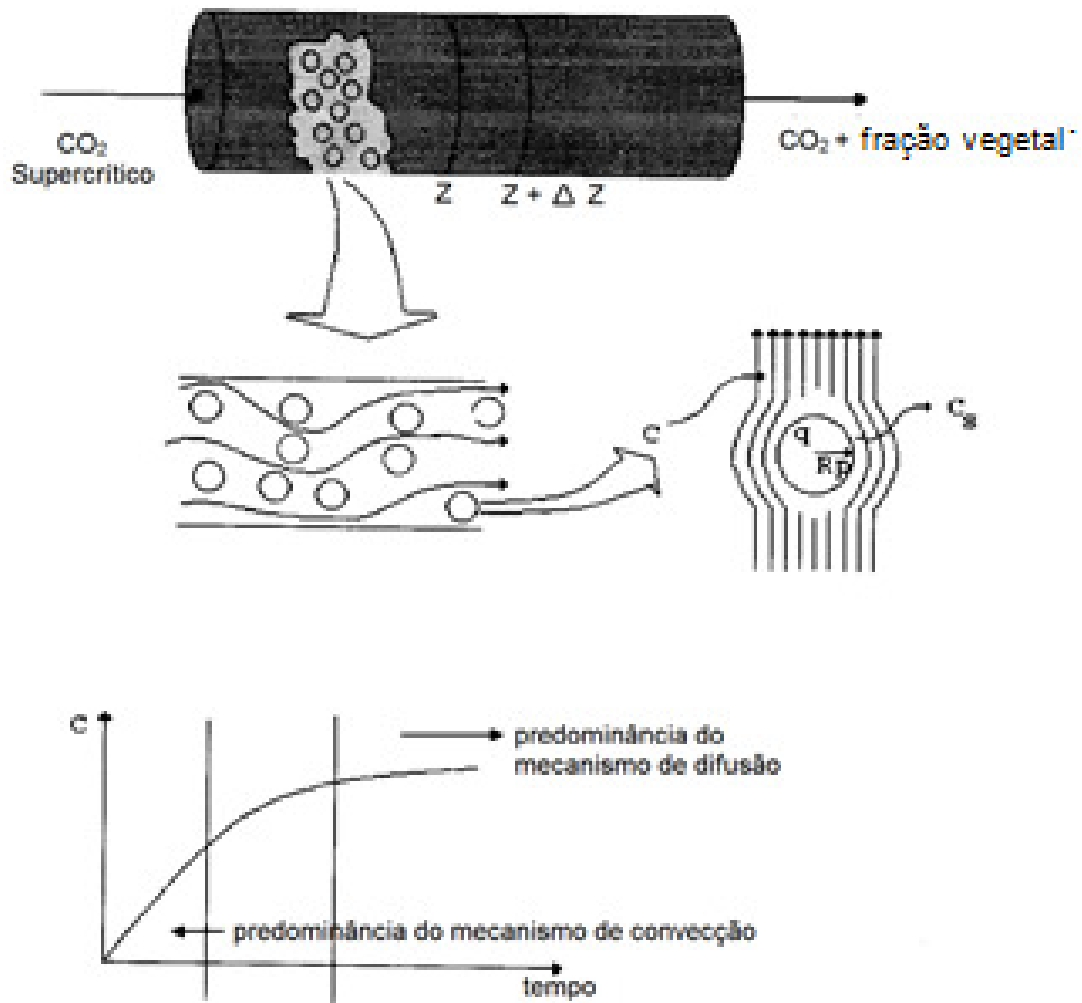


Figura 2- Representação esquemática de um extrator de leito fixo de partículas esféricas e dos mecanismos de transporte de massa proposto pelo modelo de difusão. Fonte: Cardozo-Filho (1999).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Pretende-se na revisão bibliográfica, destacar os estudos relacionados aos compostos bioativos presentes na espécie vegetal *Calophyllum brasiliense* Cambess com ênfase em processos de extração de compostos bioativos, focando nas atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica e citotóxica incluindo a sua descrição agrônômica. Além de uma breve revisão sobre os modelos matemáticas empregados para descrever a extração supercrítica de produtos naturais.

#### 3.1 *Calophyllum brasiliense*

##### 3.1.1 Agrônômica

O gênero *Calophyllum*, composto por um grande grupo de árvores tropicais, com aproximadamente 180 - 200 espécies restritas aos trópicos quentes e úmidos (STEVENS, 1980), pertence à família Clusiaceae/Guttiferae que engloba árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras, derivados químicos de interesse farmacêutico e tintas (CRONQUIST, 1981).

O *Calophyllum brasiliense* Cambess também é popularmente conhecido por várias denominações: gulande-carvalho, guanandi-carvalho, guanadí-cedro, landim, olandí, uá-landi, pelos aborígenes, em São Paulo como guanandi-carvalho, guanadi-cedro e guanandi-piolho, na Amazônia como jacareúba, desde a Venezuela até o México e as Antilhas recebem, dentre outros nomes, de pau-maria e pau-de-azeite (CORRÊA, 1978).

Na América Latina, o *C. brasiliense* (Figura 3A) é uma espécie abundante e amplamente distribuída, que está presente nas florestas atlântica e amazônica, e em determinados locais do domínio do cerrado, desde a América Central até o litoral norte de Santa Catarina (MESÍA-VELA et al., 2001). É muito frequente em vários ambientes ribeirinhos do sudeste do Brasil e em outros tipos de ambientes neotropicais, onde o solo é permanentemente ou periodicamente inundado (MARQUES; JOLY, 2000). Ocorre geralmente em grandes agrupamentos (LORENZI, 1992), e são susceptíveis a geadas (VIEIRA; FEISTAUER; SILVA, 2003). As folhas são opostas, simples, coriáceas, pecioladas, e com 10 a 13 cm de comprimento por 5 ou 6 cm de largura. A forma pode ser elípticolanceolada ou oblonga e a nervação é geralmente peninervada, com as nervuras secundárias formando praticamente um ângulo reto com a central. As flores são brancas, pequenas, aromáticas de 2 sépalas e 10 estames, dispostas em racemos axilares e terminais (Figura 3B). Os frutos são do tipo drupa globosa e oleaginosa, consumidos por vários animais (Figura 3 C, D) (CORRÊA, 1978; LORENZI, 1992).

Segundo Lorenzi (1992) o tronco é reto e cilíndrico, apresentando casca revestida de epiderme bastante dura, muito fendida, quebradiça, e composta de lâminas superpostas, podendo possuir até 40 mm de espessura, sendo a parte externa marrom-escura ou pardacenta, descamando em pequenas placas retangulares, provenientes de fissuras finas e transversais (Figura 3 E); a parte interna é rósea aromática, amargosa e ácida, exsudando látex amarelo e pegajoso (LORENZI, 1992). O *C. brasiliense* fornece madeira de alburno bastante espesso e cerne róseo-avermelhado ou castanho-avermelhado, ondeada (parecendo cedro, porém mais pesada), fácil da lavrar e de serrar, talhe macio sendo muito empregado na construção de canoas, vigas, mastros, construção civil e obras internas em geral (Figura 3 F) (CORRÊA, 1978). A Figura 3 representa a espécie *C. brasiliense* e as partes deste vegetal.

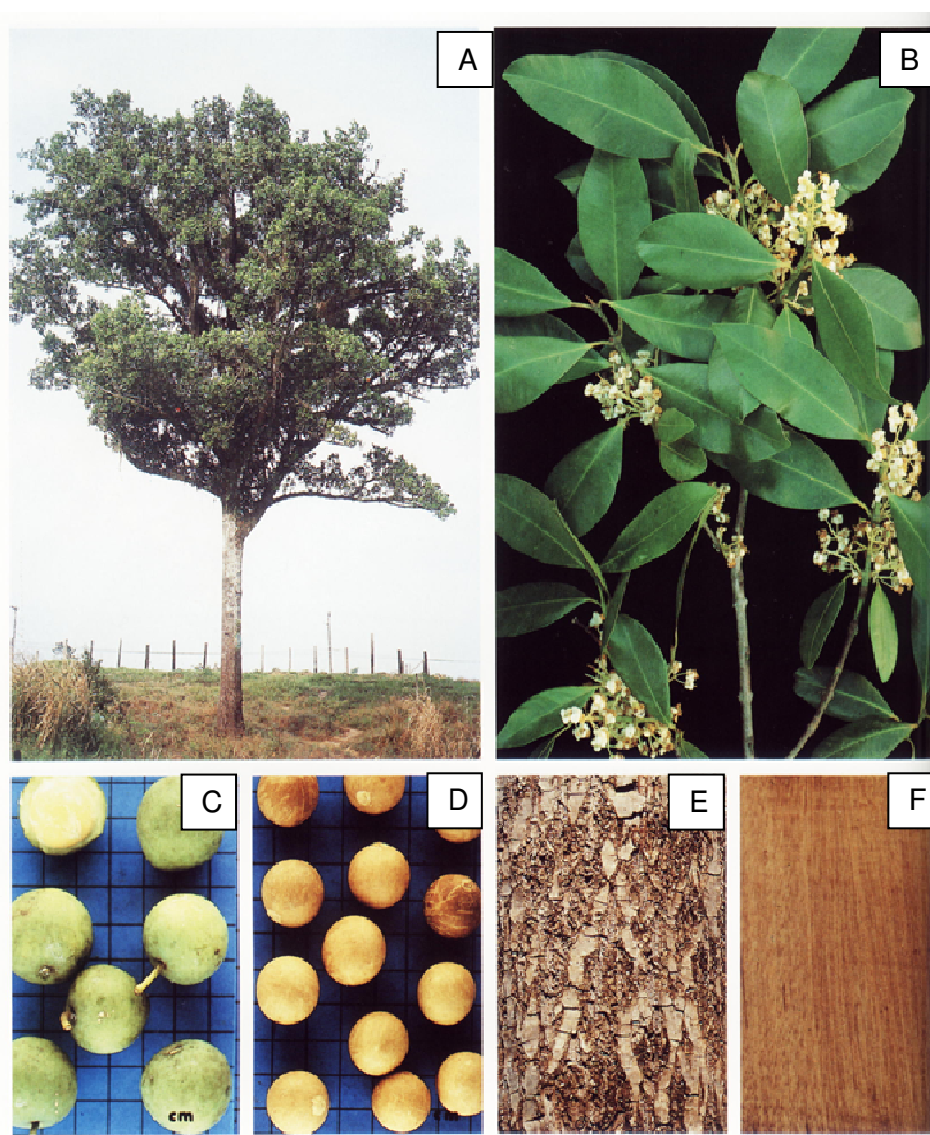


Figura 3 - Espécie vegetal *C. brasiliense* Cambess. A- aspecto geral da espécie; B- inflorescências e folhas; C- frutos verdes; D- frutos maduros; E- casca; F- madeira. Fonte: Lorenzi (1992).

A produção de mudas é feita a partir dos frutos quando caem espontaneamente da árvore, semeados mesmo sem a despulpagem para a obtenção da semente, ocorrendo à emergência em 40 a 60 dias (LORENZI, 1992). A germinação ocorre após 16 semanas, sendo que os frutos sem o endocarpo germinam em 8 semanas (ZENTSCH; DIAZ, 1977). Estudos de reflorestamento demonstram uma importante capacidade de desenvolvimento da espécie em áreas degradadas (CUSACK; MONTAGNINI, 2004; LOIK; HOLL, 1999; PIOTTO et al., 2003).

### 3.1.2 Composição química

Segundo Cronquist (1981) a família Clusiaceae é rica em metabólitos secundários; suas folhas apresentam cavidades resiníferas secretoras de algumas resinas aromáticas, que somados aos canais e cavidades secretores esquizógenos promovem o acúmulo de diversos tipos de substâncias incluindo esteróides, triterpenos, cumarinas, benzopiranos e diversos tipos de xantonas e proantocianinas.

Avaliando-se os constituintes majoritários das diferentes partes do *Calophyllum brasiliense*, detectou-se que a composição química é distinta para cada parte da planta. Das raízes foram isolados 1,5-dihidroxixantona, friedelina e ácido betulínico, nos frutos, ácido gálico, ácido protocatético e hiperosídeo, são os principais compostos, enquanto nas flores foram isolados ácido protocatético e ( $\pm$ ) epicatequina (ISAIAS et al., 2004).

Abe et al. (2004) isolaram a partir da fração metanólica do extrato da ceiva em metanol:acetona (2:1) quatro xantonas denominadas jacareubina, 6-desoxijacareubina, 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona e a 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)xantona. Em 2005, Yasunaka et al. isolaram as xantonas jacareubina; 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3,3-dimetilalil) xantona e a 6-desoxijacareubina.

Em estudo com os galhos desta planta, foram isoladas as dipiranocumarinas calanolideo A, B, C e soulattrolideo, e outras substâncias como friedelina, ácido isoapetálico, canofilol e amentoflavona (HUERTA-REYES et al., 2004).

Mesía-Vela et al., (2001) isolaram das folhas duas cumarinas: mammea A/BA e mammea C/OA. Silva et al. (2001) analisaram a composição química das folhas, e obtiveram da fração acetato de etila cinco sólidos puros, identificados como quercetina, ácido gálico, ácido protocatético, hiperosídeo e amentoflavona. Em 2004, Reyes-Chilpa et al. isolaram a partir das folhas derivados cumarínicos do tipo mammea (mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, isomammeigina, mammea C/AO, C/OB, B/BA ciclo F e B/BB ciclo F). Esta classe de substâncias é caracterizada pela presença da estrutura básica de esqueleto cumarínico 5,7-dioxigenado, possuindo um radical fenila ou alquila ligado ao carbono-4, e substituintes acila ou prenila ligados ao carbono-6 ou carbono-8. Ocorrem

particularmente em plantas dos gêneros *Mammea* e *Mesua* (Clusiaceae), sendo rara em outros gêneros. Yasunaka et al. (2005) isolaram a partir das folhas o triterpeno friedelina e a cumarina mammea A/BA. A cumarina 4-substituída (-) mammea A/BB, foi isolada pela primeira vez por Gasparotto-Júnior et al. (2005) a partir da fração em hexano dos extratos hidroetanólicos (90%) das folhas; posteriormente essa mesma substância foi isolada por Brenzan et al. (2007).

Mesía-Vela et al. (2001) isolaram das cascas do *C. brasiliense* quatro xantonas denominadas: desoxijacareubina; jacareubina; 1,3,5,6,tetraidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona e 1,3,5,6,tetraidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona. Em outro estudo com as cascas foram isoladas sete novas xantonas, identificadas como brasixantona A, B, C, D, E, F e G, sob a forma de um óleo amarelo, exceto a brasixantona B, que cristalizou na forma de agulhas. Também foram isoladas dez xantonas conhecidas: toxiloxantona A; 6-desoxijacareubina; 3,8-diidroxi-1,2-dimetoxixantona; 8-desoxigartanina; cudraxantona F; 4-hidroxixantona; 1,2-dimetoxixantona; piranojacareubina; garcinina B e latisxantona C (ITO et al., 2002). Posteriormente, Ito et al. (2003) isolaram três novas cumarinas, denominadas de brasimarinas A, B e C juntamente com outras 11 cumarinas previamente relatadas na literatura (CROMBIE; GAMES; MMCCORMICK, 1987; KASHMAN et al., 1992; PATIL et al., 1993). Em estudos recentes realizados por Cottiglia et al. (2004), também foram isolados das cascas do caule seis novos ácidos cromanonas: ácido brasiliensofílico A, isobrasiliensofílico A, brasiliensofílico B, isobrasiliensofílico B, brasiliensofílico C e isobrasiliensofílico C.

Na Tabela 2 encontram-se as substâncias isoladas de *Calophyllum brasiliense* de acordo com suas diferentes partes.



Tabela 2 - Substâncias isoladas de *Calophyllum brasiliense* de acordo com suas diferentes partes.

Parte do Vegetal	Substâncias Químicas Identificadas	Referências	Parte do Vegetal	Substâncias Químicas Identificadas	Referências	
Raíz	1,5-dihidroxixantona	ISAIAS et al., 2004	Galho	Calanolideo A	Huerta-Reyes et al., 2004	
	Friedelina	ISAIAS et al., 2004		Calanolideo B	Huerta-Reyes et al., 2004	
	ácido betulínico	ISAIAS et al., 2004		Calanolideo C	Huerta-Reyes et al., 2004	
Fruto	ácido gálico	ISAIAS et al., 2004		soulattrolideo,	Huerta-Reyes et al., 2004	
	ácido protocatético	ISAIAS et al., 2004		Friedelina	Huerta-Reyes et al., 2004	
	Hiperosídeo	ISAIAS et al., 2004		ácido isoapetálico	Huerta-Reyes et al., 2004	
Flor	ácido protocatético	ISAIAS et al., 2004		Canofilol	Huerta-Reyes et al., 2004	
	(±) epicatequina	ISAIAS et al., 2004		Amentoflavona	Huerta-Reyes et al., 2004	
Ceiva	Jacareubina	ABE et al., 2004	Folha	mammea A/BA	MESÍA-VELA et al., 2001	
		YASUNAKA et al., 2005				REYES-CHILPA et al., 2004
	6-desoxijacareubina	ABE et al., 2004			YASUNAKA et al., 2005	
	1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona	ABE et al., 2004			mammea C/OA	MESÍA-VELA et al., 2001
	1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)xantona	ABE et al., 2004				REYES-CHILPA et al., 2004
1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3,3-dimetilalil) xantona	YASUNAKA et al., 2005		Quercetina	SILVA et al., 2001		

Continuação Tabela 2 - Substâncias isoladas de *Calophyllum brasiliense* de acordo com suas diferentes partes.

<b>Parte do Vegetal</b>	<b>Substâncias Químicas Identificadas</b>	<b>Referências</b>	<b>Parte do Vegetal</b>	<b>Substâncias Químicas Identificadas</b>	<b>Referências</b>
Folha	ácido gálico	SILVA et al., 2001	Cascas	Jacareubina	MESÍA-VELA et al., 2001
	ácido protocatético	SILVA et al., 2001		1,3,5,6,tetraidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona	MESÍA-VELA et al., 2001
	Hiperosídeo	SILVA et al., 2001		1,3,5,6,tetraidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona	MESÍA-VELA et al., 2001
	Amentoflavona mammea A/BB	SILVA et al., 2001 REYES-CHILPA et al., 2004		brasixantona A	ITO et al., 2002
	mammea B/BA	REYES-CHILPA et al., 2004		brasixantona B	ITO et al., 2002
	mammea B/BB	REYES-CHILPA et al., 2004		brasixantona C	ITO et al., 2002
	mammea C/OB	REYES-CHILPA et al., 2004		brasixantona D	ITO et al., 2002
	mammea B/BA ciclo F	REYES-CHILPA et al., 2004		brasixantona E	ITO et al., 2002
	mammea B/BB ciclo F	REYES-CHILPA et al., 2004		brasixantona F	ITO et al., 2002
	Isomammeigina	REYES-CHILPA et al., 2004		brasixantona G	ITO et al., 2002
	Friedelina	REYES-CHILPA et al., 2004		toxioxantona A	ITO et al., 2002
	(-) mammea A/BB	YASUNAKA et al., 2005 GASPAROTTO-JUNIOR et al., 2005		6-desoxijacareubina	ITO et al., 2002
		BENZAN, 2007		3,8-diidroxi-1,2-dimetoxixantona	ITO et al., 2002
Cascas	Desoxijacareubina	MESÍA-VELA et al., 2001		8-desoxigartanina; cudraxantona F	ITO et al., 2002 ITO et al., 2002
				4-hidroxixantona	ITO et al., 2002

Continuação Tabela 2 - Substâncias isoladas de *Calophyllum brasiliense* de acordo com suas diferentes partes.

<b>Parte do Vegetal</b>	<b>Substâncias Químicas Identificadas</b>	<b>Referências</b>	<b>Parte do Vegetal</b>	<b>Substâncias Químicas Identificadas</b>	<b>Referências</b>
Cascas	1,2-dimetoxixantona	ITO et al., 2002	Cascas	inofilum A	ITO et al., 2003
	Piranojacareubina	ITO et al., 2002		inofilum C	ITO et al., 2003
	garcinina B	ITO et al., 2002		inofilum D	ITO et al., 2003
	latisxantona C	ITO et al., 2002		inofilum E	ITO et al., 2003
	brasimarina A	ITO et al., 2003		Calofilolideo	ITO et al., 2003
	brasimarina B	ITO et al., 2003		calecumarina A	ITO et al., 2003
	brasimarina C	ITO et al., 2003		ácido brasiliensofílico A	COTTIGLIA et al., 2004
	calanolideo A	ITO et al., 2003		ácido isobrasiliensofílico A	COTTIGLIA et al., 2004
	Calanone	ITO et al., 2003		ácido brasiliensofílico B	COTTIGLIA et al., 2004
	5-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metil-1-oxo-2-butenil)-10-propil-2H, 8H-benzo [1,2 – b; 3,4-b']dipiran-8-ona mammea B/BB	ITO et al., 2003		ácido isobrasiliensofílico B	COTTIGLIA et al., 2004
		ácido brasiliensofílico C	COTTIGLIA et al., 2004		
		ácido isobrasiliensofílico C	COTTIGLIA et al., 2004		

Na figura 4 encontram-se as estruturas químicas das substâncias isoladas de *C. brasiliense*.

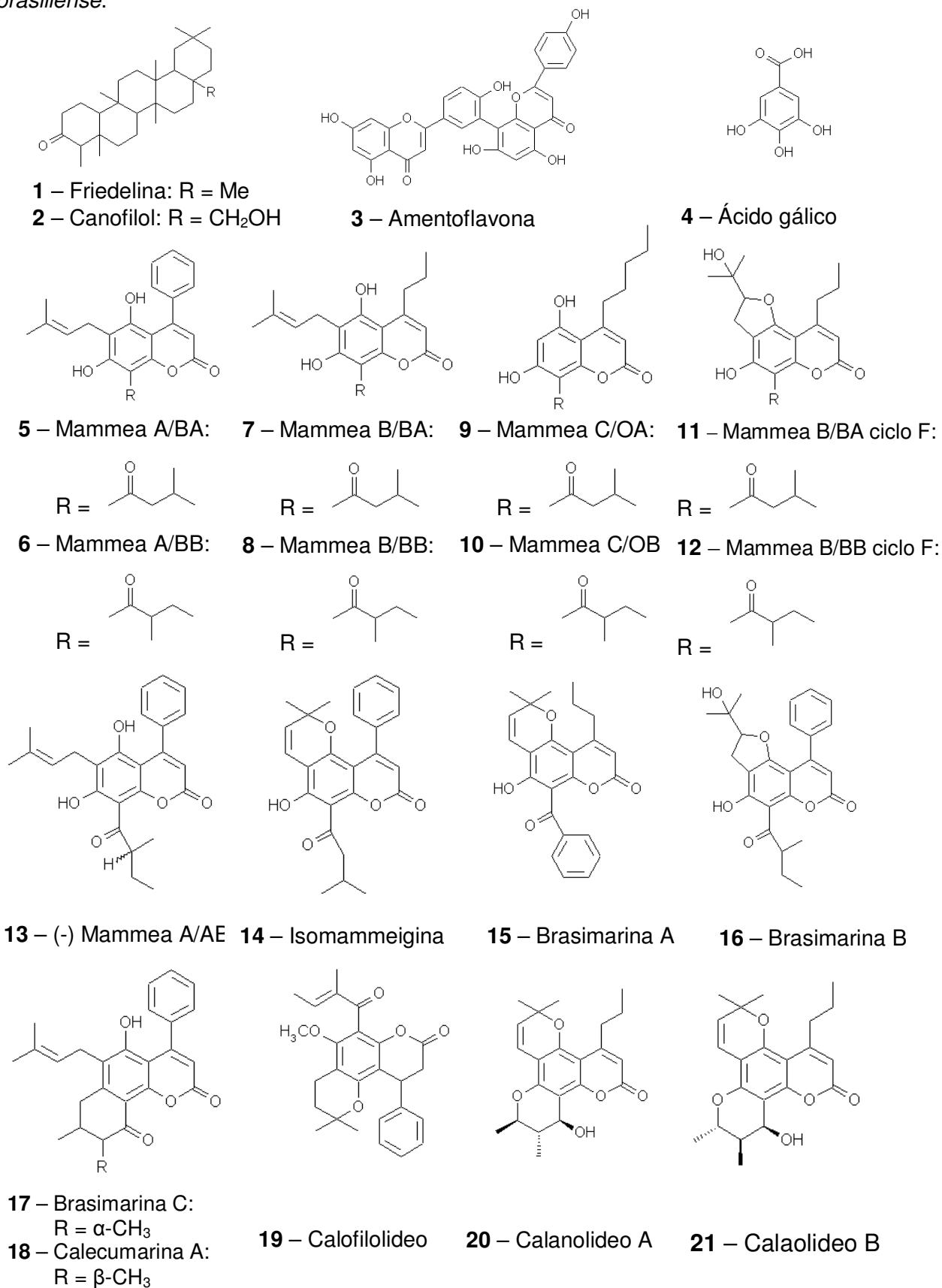
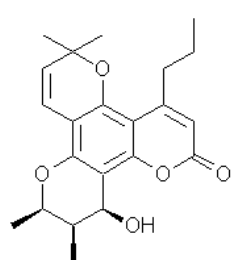
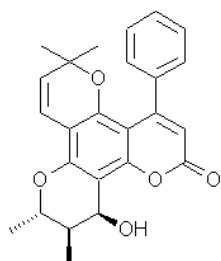


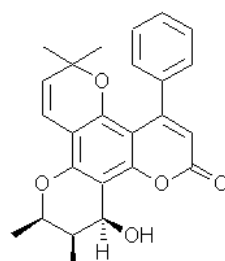
Figura 4 – Estruturas químicas das substâncias identificadas em *Calophyllum brasiliense*.



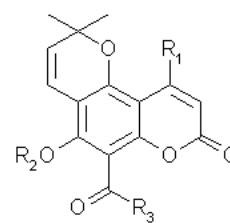
22 – Calanolideo C



23 – Soulattrolideo



24 – Inofilum A

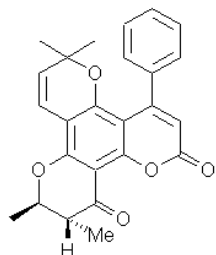


25 – Calanone

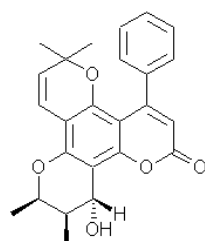
R<sub>1</sub> = Ph; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = Ph

26 – 5-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metil-1-oxo-2-butenil)-10-propil-2H,8H-benzo [1,2 - b; 3,4-b']dipiran-8-ona

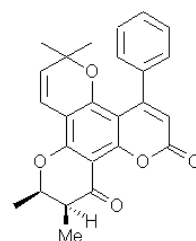
R<sub>1</sub> = *n*-Pr; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>



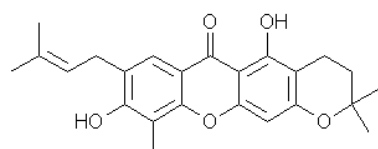
27 – Inofilum C



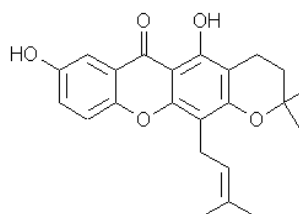
28 – Inofilum D



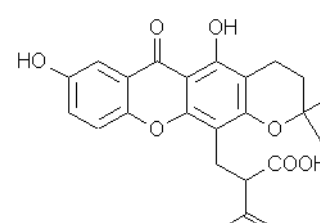
29 – Inofilum E



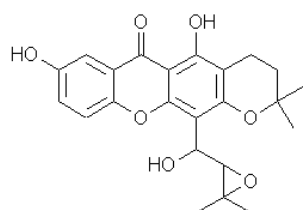
30 – Brasixantona A



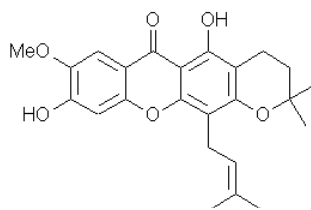
31 – Brasixantona B



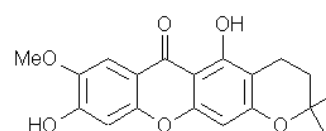
32 – Brasixantona C



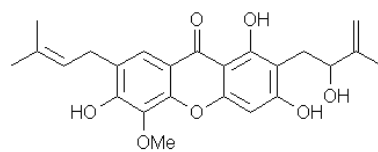
33 – Brasixantona D



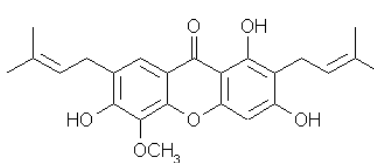
34 – Brasixantona E



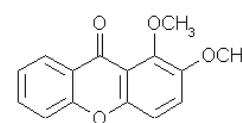
35 – Brasixantona F



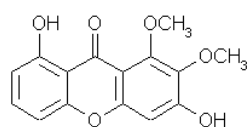
36 – Brasixantona G



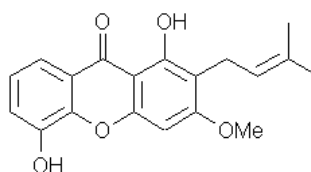
37 – Cudraxantona F



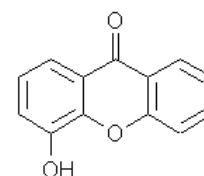
38 – 1,2-dimetoxixantona



39 – 3,8-diidroxi-1,2-dimetoxixantona

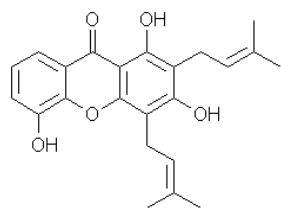


40 – 1,5-diidroxi-2-(dimetillalil)-xantona

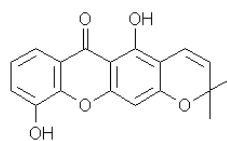


41 – 4-Hidroxi-xantona

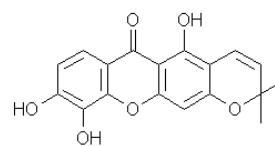
Continuação Figura 4 – Estruturas químicas das substâncias identificadas em *Calophyllum brasiliense*.



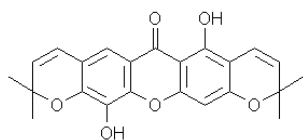
**42** – 8-desoxigartanina



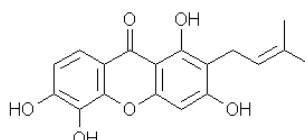
**43** – 6-desoxijacareubina



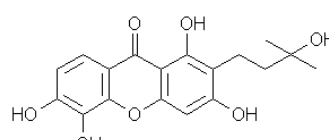
**44** – Jacareubina



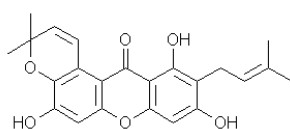
**45** – Piranojacareubina



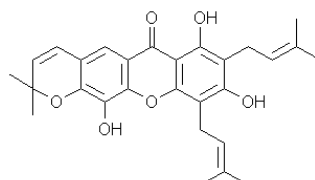
**46** – 1,3,5,6 tetrahydroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona



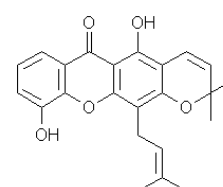
**47** – 1,3,5,6 tetrahydroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona



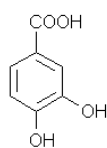
**48** – Garcinina B



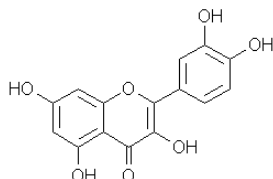
**49** – Latisxantona C



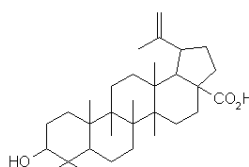
**50** – Toxiloxantona A



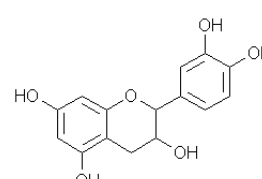
**51** – Ácido Protocatético



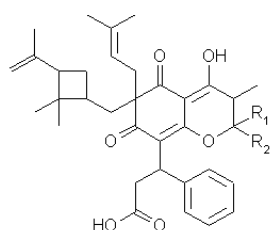
**52** – Quercetina



**53** – Ácido betulínico

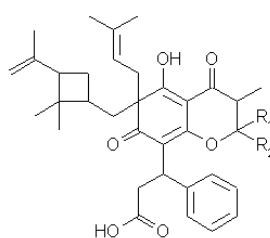


**54** – Epicatequina



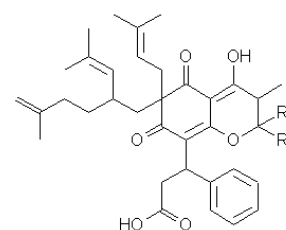
**55** – Ác. brasiliensofílico A:  
R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

**56** – Ác. isobrasiliensofílico A:  
R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = H



**57** – Ác. brasiliensofílico B:  
R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

**58** – Ác. isobrasiliensofílico B:  
R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = H



**59** – Ác. brasiliensofílico C:  
R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

**60** – Ác. isobrasiliensofílico C:  
R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = H

Continuação Figura 4 – Estruturas químicas das substâncias identificadas em *Calophyllum brasiliense*.

### 3.1.3 Potencial Medicinal

#### Uso etnofarmacológico

O balsamo obtido da gomo-resina do *Calophyllum brasiliense* Cambess é popularmente usado como antirreumático, antiulceroso e antitumoral. No entanto, como tem efeito irritativo, o seu emprego é mais comum na medicina veterinária, sobretudo para equinos aplicados na forma de emplasto como relaxante dos tendões. A infusão e o banho das cascas são remédios populares utilizados para o tratamento de reumatismo, varicoses, hemorroidas e úlceras crônicas (CORRÊA, 1978). Estudos etnofarmacológicos ainda revelam o uso do *C. brasiliense* Cambess no tratamento de bronquite, distúrbios gástricos e hepáticos (SARTORI et al., 1999), dor (LEWIS, 1977), inflamações, diabetes, hipertensão (DUKE; MARTINEZ, 1994), diarreia (VASQUEZ, 1990) e herpes (RUTTER, 1990).

#### Atividade antinociceptiva

Extratos e frações das folhas, flores, frutos e raízes de *C. brasiliense* foram avaliados no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, assim como os compostos quercetina e amentoflavona isolados da fração acetato de etila das folhas e os compostos friedelina e 1,5-dihidroxixantona isolados da fração clorofórmica das raízes, e estes demonstraram efeito antinociceptivo significativo. No modelo da formalina, as frações das folhas e raízes exibiram apenas atividade antinociceptiva em relação à segunda fase (dor de origem inflamatória), mas foram praticamente inativos em relação à primeira fase (dor de origem neurogênica) (ISAIAS et al., 2004; SILVA et al., 2001).

#### Efeito citoprotetor

Em um trabalho realizado por Sartori et al. (1999) com a fração diclorometano obtida a partir do extrato hexânico das cascas de *C. brasiliense*, foi avaliado o efeito citoprotetor gástrico em ratos e camundongos. Os resultados indicaram que quando esta fração era administrada pela via oral, doses de 12,5 a 250 mg/kg exibiram significativa ação citoprotetora, anti-secretora e antiulcerogênica, inibindo a formação de lesões gástricas induzidas por etanol, indometacina e estresse por imobilização em hipotermia.

#### Atividade Antiviral

As substâncias brasixantona B, C, D e 8-desoxigartanina apresentaram efeito inibitório sobre o vírus Epstein-Barr (ITO et al., 2002).

Huerta-Reyes et al. (2004) estudaram a inibição do HIV-1 em 21 espécies da família Clusiaceae dentre elas estavam os extratos hexânico, metanólico, em acetona e em diclorometano:metanol (1:1) das folhas de *C. brasiliense*. O extrato hexânico apresentou melhor atividade inibitória frente a transcriptase reversa do HIV-1

apresentando  $CI_{50} = 29,6 \mu\text{g/mL}$ , inibiu a replicação do HIV-1 IIIb/LAV em 74,5% ( $DE_{50} = 37,1 \mu\text{g/mL}$ ). No ensaio de citotoxicidade para os linfócitos MT2 os extratos hexânico, metanólico e em diclorometano:metanol (1:1) não apresentaram citotoxicidade. Este estudo sugere que o extrato em acetona, em metanol e principalmente o extrato hexânico possuem substâncias com potencial atividade anti-HIV. Os efeitos inibitórios sobre a enzima transcriptase reversa do HIV-1 foram apresentados pelas dipiranocumarinas, calanolideo A, B e soulattrolideo (HUERTA-REYES et al., 2004).

#### Atividade antitumoral

Ito et al. (2003) submeteram para avaliação da atividade antitumoral oito das catorze cumarinas isoladas, sendo três fenil-cumarinas e cinco 4-propil-cumarinas. Foi observado que as 4-propil-cumarinas, calanolideo A e a mammea B/BB, mostraram atividade antitumoral mais significativa ( $CI_{50} = 170\text{-}290 \text{ mg/mL}$ ) quando comparadas com as 4-fenil-cumarinas ( $CI_{50} = 342 - 348 \text{ mg/mL}$ ). A mammea B/BB, apresentou maior potência inibitória ( $CI_{50} = 170 \text{ mg/mL}$ ). A calanolideo A, uma *trans*-10,11 dimetildiidropirano foi mais potente ( $CI_{50} = 290 \text{ mg/mL}$ ) que o derivado 10,11-*cis* calanolideo C ( $CI_{50} = 351 \text{ mg/mL}$ ). Estes resultados sugerem que os grupos funcionais dos carbonos 10, 11 e 12 que são críticos para a atividade anti-HIV-1RT de algumas substâncias (KASHMAN et al., 1992; PATIL et al., 1993), podem também estar implicados com a potência da atividade antitumoral destes agentes. De uma forma geral, as 4-propil-cumarinas e as 4-fenil-cumarinas possuem potencial atividade citoprotetora frente a agentes promotores de tumoração, entretanto, um estudo destes compostos *in vivo* seria fundamental para o progresso dos agentes quimiopreventivos de origem natural.

#### Atividade antibacteriana

Os ácidos cromanonas demonstraram potencial antibacteriano, especialmente contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus epidermitis* (COTTIGLIA et al., 2004).

Extratos metanólicos obtidos das raízes, caule, folhas, flores e frutos da *C. Brasiliense* e duas frações denominadas apolar (solúvel em clorofórmio) e polar (insolúvel em clorofórmio), assim como os compostos isolados ácido brasiliênsico, ácido gálico, epicatequina, ácido protocatético, friedelina, e a 1,5-dihidroxixantona foram testados contra bactérias patogênicas e leveduras pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Todos os extratos apresentaram atividade frente as bactérias Gram-positivas (*B. cereus*, *S. aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae*), sendo que as folhas apresentaram uma melhor atividade. Quanto as bactérias Gram-negativas (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella typhimurium*) e leveduras (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*) testadas os extratos não apresentaram atividade. O ácido



protocatético demonstrou atividade frente a todos os microrganismos testados, a 1,5-dihidroxixantona apresentou atividade somente frente as bactérias Gram-positiva, já o ácido brasiliênsico foi testado até a concentração de 100 µg/mL no qual nenhuma atividade foi detectada, o ácido gálico, a epicatequina e a friedelina não apresentaram atividade contra os microrganismos até a concentração de 1000 µg/mL (PRETTO et al., 2004).

Yasunaka et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos das folhas e da ceiva de *C. brasiliense* bem como as substâncias isoladas dos mesmos, sendo que o extrato em acetona das folhas apresentou melhor atividade frente as cepas de *S. aureus* resistente e sensível a meticilina (CIM = 2 µg/mL). As substâncias, mammea A/BA (isolada da folha), jacareubina e 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3,33-dimetilalil) xantona (isolados da ceiva) foram ativas frente as cepas de *S. aureus* (resistente e sensível a meticilina) e somente elas foram ativas frente a *E. coli* (CIM = 12 µg/mL).

Em uma investigação sobre os efeitos do extrato hidroetanólico e da fração em diclorometano, a partir das cascas do caule de *C. brasiliense* contra a bactéria *Helicobacter pylori* *in vitro* e *in vivo*, a fração em diclorometano, nos testes *in vitro*, mostrou-se mais ativa e potente contra a bactéria com a CIM de 31 µg/mL. Nos ensaios *in vivo*, ratos ulcerados pelo ácido acético, e inoculados com *H. pylori* mostraram um atraso marcante na cicatrização da úlcera. Tratamento com o extrato hidroetanólico (50, 100 e 200 mg/kg) e a fração em diclorometano (100 e 300 mg/kg) reduziram a área ulcerada de forma dose-dependente. Enquanto a fração em diclorometano, na concentração de 200 mg/kg aumentou o nível de prostaglandina E2 (PGe2), o extrato e a fração diminuíram o número de animais urease-positiva, como confirmado pela redução da presença de *H. pylori* em análises histopatológicas. Os resultados sugerem que a atividade antiúlcera de *C. brasiliense* é devido, em parte, à sua ação anti- *H. pylori*, validando o uso popular desta espécie (SOUZA et. al, 2009).

#### Citotoxicidade

As cumarinas tipo mammea apresentaram atividades citotóxicas significativas contra três linhagens de células tumorais K562 (linfoma), U251 (sistema nervoso central) e PC3 (próstata), no entanto a mammea A/BA apresentou maior atividade citotóxica (CI<sub>50</sub> = 0,04 - 0,59 µM), as misturas dos isômeros mammea A/BA + A/BB, mammea B/BA + B/BB e mammea C/OA + C/OB mostraram importante atividade (CI<sub>50</sub> < 4.05 µM), já a mistura mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F e a isomammeigina apresentaram pequena atividade inibitória das células tumorais, a mammea A/BA + A/BB e a mammea C/OA + C/OB inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Bacillus subtilis*. (REYES-CHILPA et al., 2004).

#### Atividade tripanosomicida

Abe et al. (2004) avaliaram a atividade tripanosomicida da *C. brasiliense* frente a formas epimastigotas e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, com o extrato da ceiva em metanol:acetona (2:1) e este apresentou  $MC_{100} = 0,5$  mg/mL frente as formas epimastigotas. A partir deste extrato foram obtidas três frações (metanol 60%, metanol e acetato de etila), estas também foram testadas para as formas epimastigotas e apresentaram  $MC_{100} > 1000$  µg/mL,  $MC_{100} = 250$  µg/ml e  $MC_{100} > 1000$  µg/mL, respectivamente. As quatro xantonas isoladas a partir da fração em metanol foram testadas, sendo que, frente as epimastigotas a jacareubina e a 6-desoxijacareubina apresentaram  $MC_{100} = 50$  µg/mL e a 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona e a 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)xantona  $MC_{100} = 70$  µg/mL e  $MC_{100} > 300$  µg/mL, respectivamente. Já frente as tripomasotas apresentaram  $MC_{100} = 15$  µg/ml;  $MC_{100} = 200$  µg/L;  $MC_{100} = 40$  µg/ml e  $MC_{100} > 200$  µg/mL respectivamente. Este estudo mostrou importante atividade tripanosomicida das xantonas jacareubina, 6-desoxijacareubina, 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona.

#### Atividade moluscicida

Gasparotto-Júnior et al. (2005) avaliaram a atividade moluscicida de *C. brasiliense* frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*, molusco vetor da esquistossomose. Para este estudo foram preparados extratos hidroetanólicos 90% das folhas e dos galhos. A parte do extrato das folhas solúvel em diclorometano apresentou maior atividade que os demais, sendo a atividade moluscicida mínima 25 ppm (100% mortalidade). A fração em hexano deste extrato apresentou atividade moluscicida mínima em 1,2 ppm; a partir desta fração foi isolada pela primeira vez a cumarina 4-substituída ((-)-mamea A/BB) na espécie *C. brasiliense* e esta apresentou  $DL_{50} = 0,67$  ppm e  $DL_{90} = 1,47$  ppm; sugerindo que esta substância pode ser um substituto em potencial para o moluscicida sintético niclosamida.

#### Atividade antiespasmódica

Emendorfer et al. (2005) estudaram a atividade antiespasmódica (*in vitro*) do extrato metanólico das folhas da *C. brasiliense*, utilizando isolados de íleo de cobaia e duodeno de rato. Este extrato apresentou significativo efeito inibitório não competitivo e concentração dependente, da resposta contrátil promovida pela acetilcolina sob íleo de cobaia  $CI_{50} = 1,47$  mg/mL (0,64-3,42) e sobre duodeno de rato  $CI_{50} = 0,18$  mg/mL (0,15-0,24).

#### Atividade antileishmania

Os extratos brutos, frações e substâncias purificadas das folhas de *C. brasiliense* foram avaliados quanto a interferência no crescimento das formas promastigotas e

amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Verificou-se um aumento gradativo do efeito antileishmania com o processo de purificação, uma vez que o extrato bruto inibiu 50% do crescimento com 40 µg/mL e 3,69 µg/mL, e o composto (-) mammea A/BB mostrou significativa atividade, com  $CI_{50}$  de 3,0 e 0,88 µg/mL e o  $CI_{90}$  de 5,0 e 2,3 µg/mL, frente as formas promastigotas e amastigotas, respectivamente. Estudos de citotoxicidade foram realizados e a concentração tóxica da substância (-) mammea A/BB frente à cultura de macrófagos J774G8 foi bem maior do que aquela apresentada para os protozoários. A substância apresentou índice de seletividade de 8,6 para as formas promastigotas e 29,3 para as formas amastigotas, mostrando que esta substância apresenta importante atividade antileishmania e é pouco tóxica para os macrófagos. A análise da ultraestrutura das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 3,0 µg/mL da substância (-) mammea A/BB por microscopia eletrônica de transmissão apresentou significantes alterações ultraestruturais como o aparecimento de células binucleadas, múltipla vacuolização citoplasmática, intensa atividade exocítica na região da bolsa flagelar e aumento no volume da mitocôndria com a presença de membranas concêntricas na matriz mitocondrial (BRENZAN et al., 2007).

#### Atividade leishmanicida

Honda et al. (2010) avaliaram o potencial leishmanicida frente as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* das folhas de *C. brasiliense*. O extrato em diclorometano e a fração hexano apresentou para as promastigotas  $DL_{50}$  de 40 mg/mL e 20 mg/mL, respectivamente. Em macrófagos peritoneais de camundongos infectados com a forma amastigota de *Leishmania*, o índice de infecção diminuiu respectivamente 100% e 84,2% nas concentrações de 80 µg/mL e 40 µg/mL do extrato em diclorometano, já na fração hexano o índice de infecção diminuiu respectivamente 98,7% e 91,3% nas mesmas concentrações. Verificou-se que o tratamento prévio com o extrato em diclorometano ou a fração hexano dos camundongos infectados experimentalmente diminuiu o número das lesões de leishmania, já os animais tratados topicamente apresentaram a cura das lesões. Foi verificado também que a carga parasitária dos animais tratados foi significativamente reduzida, mostrando que os componentes da planta realmente controlam a infecção. Os resultados indicam que o extrato bruto e a fração hexano de *C. brasiliense* mostram uma atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*.

As atividades biológicas descritas na literatura para *C. brasiliense* de acordo com as substâncias isoladas, extratos ou fração estão sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Substâncias isoladas, extrato ou frações de *Calophyllum brasiliense* e suas atividades biológicas.

<b>Substância Ativa/ Extrato</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referências</b>	<b>Substância Ativa/ Extrato</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referências</b>
Quercetina (Figura 2-52)	Efeito antinociceptivo	SILVA et al., 2001 ISAIAS et al., 2004	Jacareubina (Figura 2-44)	Atividade tripanosomicida	ABE et al., 2004
Amentoflavona (Figura 2-3)	Efeito antinociceptivo	SILVA et al., 2001 ISAIAS et al., 2004		Atividade antimicrobiana	YASUNAKA et al., 2005
Friedelina (Figura 2-1)	Efeito antinociceptivo	SILVA et al., 2001 ISAIAS et al., 2004	1,3,5,6,tetraidroxi-2- (3,3-dimetilalil)- xantona (Figura 2-45)	Atividade antimicrobiana	YASUNAKA et al., 2005
1,5 dihidroxixantona (Figura 2-40)	Efeito antinociceptivo	SILVA et al., 2001 ISAIAS et al., 2004	Mammea A/BA (Figura 2-5)	Atividade antitumoral	REYES-CHILPA et al., 2004
	Atividade antibacteriana	PRETO et al., 2004		Atividade antimicrobiana	Yasunaka et al., 2005
Fração diclorometano à partir do extrato hexânico das cascas 6 – desoxijacareubina (Figura 2-43)	Ação citoprotetora; Ação anti-secretora; Ação antiulcerogênica	SARTORI et al., (1999)	Mammea C/OA (Figura 2-9)	Atividade antimicrobiana	Yasunaka et al., 2005
	Atividade tripanosomicida	ABE et al., 2004	Brasixantona B (Figura 2-31) Brasixantona C (Figura 2-32)	Efeito inibitório sobre o vírus Epstein-Barr Efeito inibitório sobre o vírus Epstein-Barr	ITO et al., 2002 ITO et al., 2002
Jacareubina (Figura 2-44)	Inibidora da SULT1A	MESÍA-VELA et al., 2001	Brasixantona D (Figura 2-33)	Efeito inibitório sobre o vírus Epstein-Barr	ITO et al., 2002
	Atividade tripanosomicida	ABE et al., 2004	8-desoxigartanina (Figura 2-42)	Efeito inibitório sobre o vírus Epstein-Barr	ITO et al., 2002

Continuação Tabela 3 - Substâncias isoladas, extrato ou frações de *Calophyllum brasiliense* e suas atividades biológicas.

<b>Substância Ativa/ Extrato</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referências</b>	<b>Substância Ativa/ Extrato</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referências</b>
Calanolideo A (Figura 2-20)	Atividade antitumoral	ITO et al., 2003	Calanolideo B (Figura 2-21)	Efeitos inibitórios sobre a enzima transcriptase reversa do HIV-1	HUERTA-REYES et al., 2004
	Efeitos inibitórios sobre a enzima transcriptase reversa do HIV-1	HUERTA-REYES et al., 2004	Soulattrolideo (Figura 2-23)	Efeitos inibitórios sobre a enzima transcriptase reversa do HIV-1	HUERTA-REYES et al., 2004
Ácido brasiliensofílico A (Figura 2-55)	Atividade antibacteriana	COTTIGLIA et al., 2004	Mammea A/BA + A/BB	Atividade antitumoral	REYES-CHILPA et al., 2004
Ácido isobrasiliensofílico A (Figura 2-56)	Atividade antibacteriana	COTTIGLIA et al., 2004		Atividade antibacteriana	REYES-CHILPA et al., 2004
Ácido brasiliensofílico B (Figura 2-57)	Atividade antibacteriana	COTTIGLIA et al., 2004	Mammea B/BA + B/BB	Atividade antitumoral	REYES-CHILPA et al., 2004
Ácido isobrasiliensofílico B (Figura 2-58)	Atividade antibacteriana	COTTIGLIA et al., 2004	Mammea C/OA + C/OB	Atividade antitumoral	REYES-CHILPA et al., 2004
Ácido brasiliensofílico C (Figura 2-59)	Atividade antibacteriana	COTTIGLIA et al., 2004		Atividade antibacteriana	REYES-CHILPA et al., 2004
Ácido isobrasiliensofílico C (Figura 2-60)	Atividade antibacteriana	COTTIGLIA et al., 2004	1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona	Atividade tripanosomicida	ABE et al., 2004
Extrato hexânico das folhas	Atividade anti-HIV	HUERTA-REYES et al., 2004	Extrato metanólico das folhas	Atividade antibacteriana	PRETTO et al., 2004
				Atividade antiespasmódica	EMENDORFER et al., 2005

Continuação Tabela 3 - Substâncias isoladas, extrato ou frações de *Calophyllum brasiliense* e suas atividades biológicas.

<b>Substância Ativa/ Extrato</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referências</b>	<b>Substância Ativa/ Extrato</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referências</b>
Ácido protocatéquico (Figura 2-51)	Atividade antimicrobiana	PRETTO et al., 2004	Fração diclorometano à partir do extrato hidroetanólico das cascas	Ação anti- <i>Helicobacter pylori</i>	SOUZA et. al, 2009
Extrato em acetona das folhas	Atividade antibacteriana	YASUNAKA et al., 2005	Extrato em diclorometano das folhas	Atividade leishmanicida	HONDA et. al, 2010
(-) mammea A/BB (Figura 2-13)	Atividade antitoluscida	GASPAROTTO- JÚNIOR et al., 2005	Fração hexano das folhas	Atividade leishmanicida	HONDA et. al, 2010
	Atividade antileishmania	BRENZAN et.al, 2007			

### 3.2 MODELAGEM MATEMÁTICA

A extração com fluido supercrítico é uma alternativa promissora para a extração de produtos com alto valor agregado. Diferentes tipos de matizes 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 matrizes vegetais com alto valor agregado como ervas, sementes, folhas ou cascas é difícil devido à existência de diferentes estruturas no material vegetal. Este é geralmente triturado, antes do processo de extração, para aumentar a superfície 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; SILVESTRE; SILVA, 2001).

Há vários modelos empregados para descrever a 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 (McHUGH; 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 cinéticas de ESC. Modelos como os de Crank (1975), Tan e Liou (1989), Goto et al. (1993), Sovová (1994), Esquível et al. (1999a) e Martinez et al. (2003) entre outros são geralmente utilizados. Na Tabela 4 encontramos as considerações acerca de alguns modelos matemáticos baseados na transferência de massa.

Tabela 4 – 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.



Continuação Tabela 4 – Modelos matemáticos baseados na transferência de massa para ESC de produtos naturais.

<b>Referência</b>	<b>Modelo</b>	<b>Considerações</b>
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 avaliadas.
Perrut et al. (1997)	Partículas porosas	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	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	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	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 semicontínuo; (c) usar uma valor 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 de *Calophyllum brasiliense*.

### 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 à extração de compostos bioativos de *Calophyllum brasiliense* utilizando fluido pressurizado. No entanto, é relatado na literatura especializada disponível uma patente para o *Calophyllum inophyllum* relacionada à extração supercrítica. Como foi mostrado anteriormente existem trabalhos relacionando atividades biológicas dos compostos ativos presentes na *Calophyllum brasiliense* usando solventes orgânicos (maceração), mas não há estudos relacionados com as atividades biológicas a partir de extratos obtidos via ESC. 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 apresentados os materiais e as metodologias utilizadas para extração, identificação e quantificação dos compostos bioativos, eletromicrografias, atividades biológicas e finalmente a modelagem da curva cinética da ESC.

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

Para a realização do estudo foram utilizadas folhas do *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae/Guttiferae), as quais foram coletadas na Ilha do Cardoso localizada no Estado de São Paulo, em dezembro de 2010, e a exsicata foi depositada como documento taxonômico no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, sob o número de registro SP363818.

#### 4.1.1 Secagem e moagem do material vegetal

As folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess foram secas em estufa de ar circulante (QUIMIS, MODELO Q-31), trituradas em processador doméstico (WALITA, MODELO RI7625), acondicionadas em frasco âmbar e armazenadas em local seco e ao abrigo da luz.

#### 4.1.2 Granulometria do material vegetal

As folhas moídas foram introduzidas num jogo de peneiras da série padrão Tyler de tamanhos 16 a 200 mesh. A distribuição granulométrica foi realizada com o auxílio de um agitador mecânico de peneiras (BERTEL, SÉRIE 9702). Para os ensaios foram utilizados o material vegetal retido nas malhas de 30 (#30=0,600mm) e 50 (#50=0,300mm) mesh, uma vez que possuem um tamanho que favorece a extração sem entupir o equipamento supercrítico. As massas retidas foram armazenadas em frascos âmbar, em local seco e ao abrigo da luz.

## 4.2 EXTRAÇÃO

### 4.2.1 Extração com solvente orgânico

A extração com solvente orgânico foi baseada na metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2004), onde aproximadamente 15 g de folhas de *Calophyllum brasiliense*

previamente secas, moídas e peneiradas, foram embaladas em forma de cartucho em papel filtro e acondicionadas no extrator Soxhlet (SATELIT) de 500 mL conforme mostra a Figura 5. Ao balão volumétrico adicionou-se 300 mL de solvente, o qual foi aquecido próximo ao seu ponto de ebulição. O sistema foi mantido em refluxo por 8 horas, e então levado ao rotaevaporador (IKA, MODELO RV 10) para a retirada do excedente do solvente, o remanescente foi evaporado em estufa (LABSTORE, MODELO 400/4ND) até peso constante ( $\pm 0,01$  g) e então o extrato foi levado ao dessecador até atingir a temperatura ambiente. O extrato foi acondicionado em frasco âmbar, em local seco e ao abrigo da luz. Os resultados foram expressos em relação à massa da amostra inicial. Os solventes orgânicos utilizados na extração foram diclorometano (NUCLEAR, com 99,5% de pureza) e n-hexano (NUCLEAR, com 99,5% de pureza), escolhidos devido às diferenças de suas polaridades e constantes dielétricas. O hexano é um solvente apolar e o diclorometano é um solvente polar e seus pontos de ebulição e constantes dielétricas são iguais a 69 °C; 1,88 e 40 °C; 8,93, respectivamente.

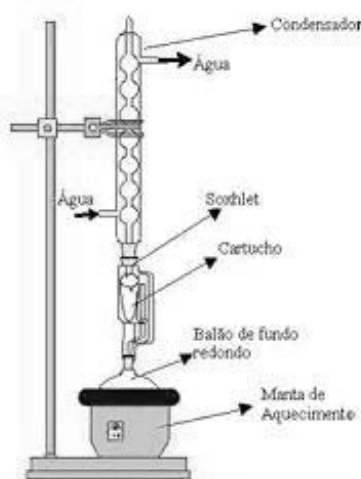


Figura 5 - Esquema do equipamento Soxhlet utilizado na extração com solvente orgânico.

#### 4.2.2 Extração com fluido pressurizado (ESC)

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados de modo semicontínuo em unidade de escala laboratorial, conforme Figura 6. O módulo experimental consistia de um cilindro de CO<sub>2</sub> (Figura 6 – C) (AIR LIQUIDE BRASIL LTDA, com 95% de pureza), uma bomba seringa (Figura 6 – A e B) (TELEDYNE ISCO, MODELO 500 D), dois banhos termostáticos (Figura 6 – BT-1 e BT-2). O primeiro banho (Figura 6 – BT-1) (QUIMIS, MODELO Q214M2) mantinha o extrator de aço inoxidável e com volume interno de aproximadamente 170 mL (diâmetro do leito é de 2,85 cm e a altura do leito é de 26, 1 cm) nas temperaturas selecionadas para as extrações. O segundo banho (Figura 6 – BT-

2) (TECNAL, MODELO TE-184) tinha a finalidade de resfriar e comprimir o fluido na bomba seringa. O aparato ainda era formado por uma válvula de expansão (Figura 6 – Va), uma válvula micrométrica (Figura 6 – Vm) (AUTOCLAVE ENGINEERS), um termostador (Figura 6 – IT) (THOLZ, MODELO CTM-04) e um vidro coletor (Figura 6 – R).

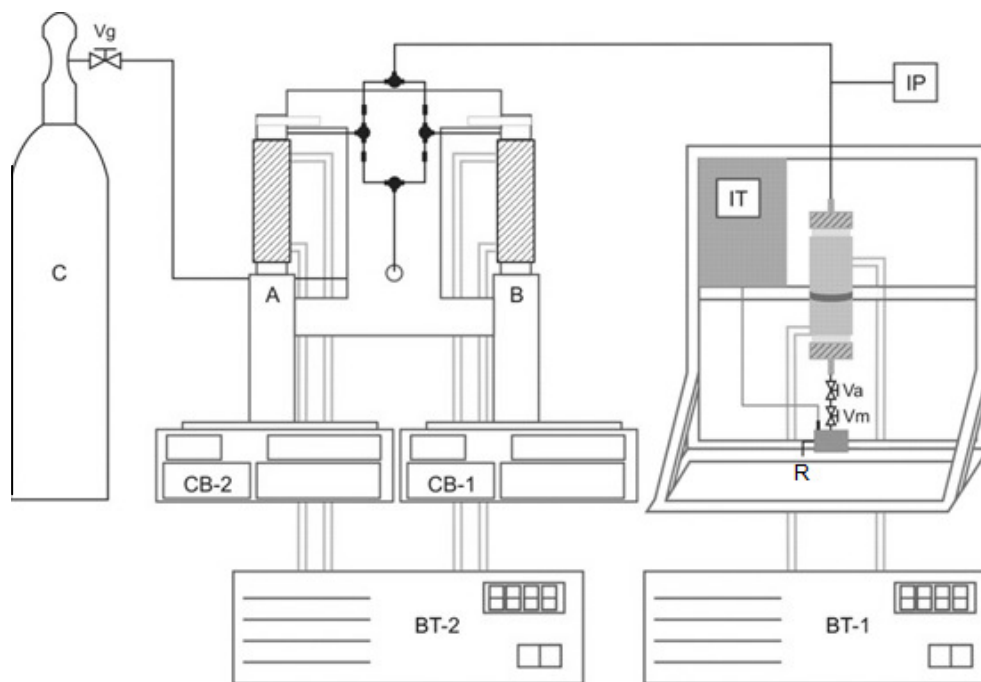


Figura 6 – Esquema do módulo experimental utilizado na extração com fluido pressurizado. A e B- Bomba seringa; BT-1 e BT-2- Banho termostático; C- Cilindro de CO<sub>2</sub>; CB-1 e CB-2- Controlador da bomba seringa; IP- Indicador de pressão; IT- Indicador de temperatura (termostador); Va- Válvula agulha; Vg- Válvula globo; Vm- Válvula micrométrica; R- Reservatório de coleta.

Aproximadamente 20 g das folhas de *Calophyllum brasiliense* previamente secas, moídas e peneiradas foram introduzidas no extrator de aço inoxidável e o restante da célula de extração foi preenchida com esferas de vidro (leito inerte). O CO<sub>2</sub> era resfriado a 0°C na bomba seringa, ao mesmo tempo em que o extrator era aquecido e mantido à temperatura operacional através do banho termostático. Na sequência o sistema foi pressurizado, uma vez alcançada a pressão de interesse aguardou-se 30 minutos para que os gradientes de temperatura e de pressão fossem quase eliminados. Anotou-se o volume de solvente remanescente na bomba e iniciou-se a extração. Na saída do extrator devido à despressurização ocorria a separação do extrato e solvente, então a massa extraída era coletada através de um recipiente de vidro âmbar, previamente pesado em balança analítica (MARTE, MODELO AM-220). A massa extraída era pesada a cada 10

minutos na primeira hora, a cada 20 minutos até a terceira hora e na sequência de 30 em 30 minutos. A extração foi realizada até que a massa pontual ( $\text{massa}_{\text{extraída}}/\text{tempo}$ ) não variasse mais, o que ocorreu em 280 minutos. As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A cumarina (-) mammea A/BB, pertencente ao grupo de compostos fenólicos que são amplamente encontrados em todas as estruturas das plantas e são produzidos pelo metabolismo secundário da mesma, será utilizada como marcador químico devido as suas propriedades biológicas.

Segundo a literatura, pressões na faixa de 8 a 15 MPa são adequadas para extração de óleos essenciais, porém pressões entre 15 e 40 MPa são mais usuais para compostos fenólicos (DÍAZ-REINOSO et al., 2006). Considerando que a temperatura pode influenciar na estabilidade térmica do soluto e propriedades da matriz o que pode dificultar a transferência de massa, condições moderadas de extração, de 40 a 60 °C são frequentemente utilizadas para a extração de compostos de plantas medicinais (ZANCAN et al., 2002).

A Figura 7 mostra a dependência da densidade do CO<sub>2</sub> com a pressão e temperatura e na área listrada as condições usuais para extração de compostos fenólicos.

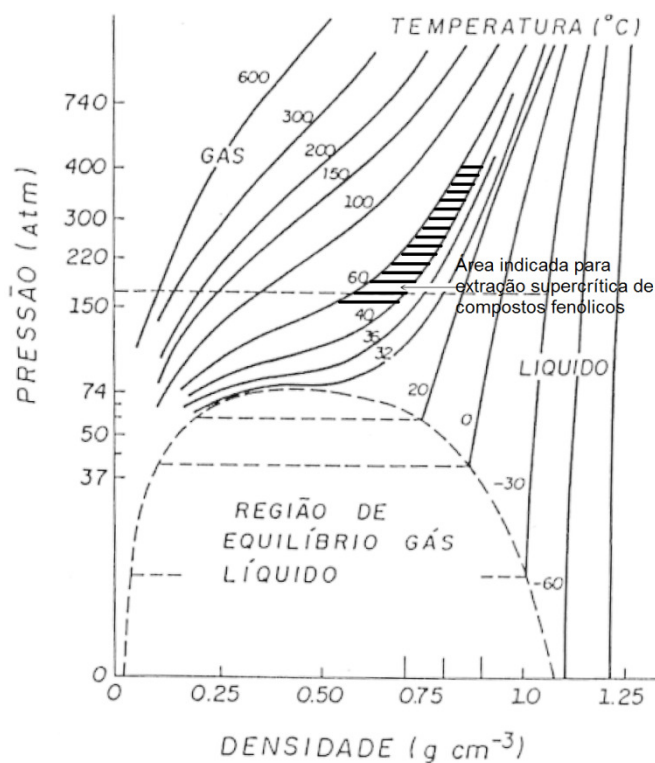


Figura 7 - Dependência da densidade do CO<sub>2</sub> com a pressão e temperatura e condições usuais para a extração de compostos fenólicos.

Portanto, as condições operacionais para a realização dos experimentos foram de 109,2 a 250 bar, 40 e 60 °C, folhas retidas nas peneira de 30 e 50 mesh e vazão constante de 3 mL/min, conforme combinações da Tabela 5.

Tabela 5 - Condições operacionais de extração usando o CO<sub>2</sub>.

<b>Pressão (bar)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>
109,2	40	0,6813
150	40	0,7811
176,7	60	0,6813
244,1	60	0,7811
250	40	0,8802

#### 4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A quantificação dos teores de (-) mammea A/BB presente nos extratos foi baseada na metodologia de Brenzan et al. (2010). Para a análise utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Varian 920 LC, com detector ultravioleta-visível, equipado com bomba quaternária, injetor automático, coluna de fase reversa Metasil ODS (METACHEM), 150X4,6 mm com partícula de 5 µm, detecção em 254 nm e temperatura da coluna de 30 °C.

A análise qualitativa e quantitativa foram realizadas utilizando um sistema gradiente, tendo como fase móvel uma mistura de acetonitrila (J.T.BAKER, com 99,99% de pureza)-água 5:95 v/v a 55:45 (0-10min.), 55:45 v/v a 80:20 (10-20min.), 80:20 v/v a 100% de acetonitrila (20-30min.) e 100% de acetonitrila (30-40min.), com vazão de 0,6 mL/min.

Para esta avaliação foram preparadas amostras dos extratos das folhas de *C. brasiliense* obtidos por solvente orgânico e solvente pressurizado nas concentrações de 1 mg/mL em metanol, estas foram filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm (MILLIPORE) e 20 µL dos extratos foram injetados no aparelho de CLAE.

A curva de calibração foi estabelecida pelo método do padrão externo baseado em cinco concentrações: 15,56 µg/mL, 31,12µg/mL, 62,25 µg/mL, 125µg/mL e 250µg/mL em metanol. O padrão externo utilizado foi a cumarina (-) mammea A/BB isolada das folhas de *Calophyllum brasiliense* por Brenzan et al. (2007). A curva de calibração foi obtida plotando o pico da área da (-) mammea A/BB versus a concentração das soluções padrão. Os parâmetros estatísticos da curva de calibração (inclinação, interceptação e coeficiente de correlação) foram calculados pela análise de regressão linear. As medidas foram realizadas em triplicata.

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

A caracterização microestrutural das folhas de *Calophyllum brasiliense* após a extração supercrítica e com solvente orgânico foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio Shimadzu SuperScan SS-550 no laboratório de microscopia do GMPC-UEM. As amostras foram depositadas sobre uma fita dupla face e metalizadas com uma camada de ouro.

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

##### 4.5.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (DIFCO) cátions ajustados (CAMHB), utilizando microplacas de 96 poços (INLAB) conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009), para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), dos extratos vegetais e dos antibióticos de referência.

Foram usadas as amostras ATCC (American Type Culture Collection, Bethesda, MD, USA) dos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* resistente a metilina - MRSA (ATCC 43300) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os antibióticos de referência empregados para o controle de qualidade do teste foram Ciprofloxacino, Vancomicina e Oxacilina (SIGMA-ALDRICH) para *E. coli*, *S. aureus* e MRSA, respectivamente. A interpretação do controle de qualidade com os antibióticos padrões foi realizada segundo critérios do CLSI (2011).

As cepas ATCC em 3ª geração (3º repique) foram inoculadas em caldo Triptcaseína Soja (DIFCO) e mantidas a 37°C. Após 6 horas de incubação, as bactérias foram semeadas em placas de petri contendo agar Tripicaseína Soja (DIFCO) e mantidas por 16 a 20 horas em estufa à 37°C. Após esse período a cultura de microrganismo foi diluída em um tubo contendo solução salina estéril (NaCl - 0,85%) até a formação de uma turvação idêntica àquela do tubo 0,5 da escala de McFarland (suspensão de BaSO<sub>4</sub> e ácido clorídrico) que corresponde a 1,0 x 10<sup>8</sup> Unidade Formadora de Colônia (UFC)/mL. Em seguida, fez-se diluição obtendo-se suspensões microbianas de 5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, cujos inóculos foram utilizados para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Os extratos vegetais foram preparados na concentração de 1000 µg/mL, utilizando dimetilsulfóxido DMSO (AMRESCO, com 99,99% de pureza) e CAMHB na proporção 1:20. Os antibióticos padrões foram diluídos diretamente em CAMHB.



Na microplaca adicionaram-se 100,0 µL de meio de cultura (CAMHB), em todos os poços de acordo com as diluições a serem realizadas. Em seguida, no primeiro poço, obteve-se uma concentração inicial de cada extrato de 500 µg/mL, 300 µg/mL para os antibióticos padrão vancomicina e oxacilina e 8 µg/mL para o antibiótico padrão ciprofloxacina pela transferência de 100,0 µL das soluções. A partir do primeiro poço, realizaram-se diluições seriadas, homogeneizando e transferindo 100,0 µL do primeiro poço para o segundo, do segundo para o terceiro e assim sucessivamente até ter uma concentração final de 0,98 µg/mL para o extrato e 0,15 µg/mL para os antibióticos vancomicina e oxacilina com 2% de NaCl e 0,004 µg/mL para o antibiótico ciprofloxacina.

Volumes de 10,0 µL das suspensões de microrganismos preparadas como descrito acima foram adicionados em todos os poços, dando uma concentração final no poço de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. As microplacas foram encubadas em estufa à 37°C por 20 horas. Em cada placa foi realizada o controle negativo (CN) do extrato e do solvente (DMSO) para verificar a ausência de bactérias nos mesmos, e o controle positivo (CP) onde o microrganismo foi adicionado somente ao meio de cultura e deveria haver crescimento em todos os poços.

A CIM foi definida como a menor concentração dos extratos e antibióticos padrões em que os microrganismos testados não demonstram crescimento visível. A Figura 8 mostra um esquema da microplaca para a CIM de microrganismos.

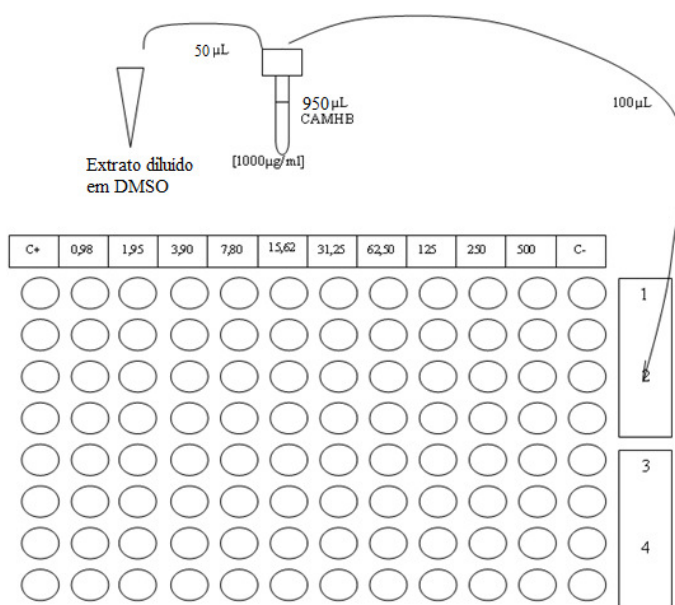


Figura 8 – Esquema da microplaca para determinação da CIM de bactérias.

#### 4.5.2 Atividade antifúngica

O teste de microdiluição em caldo para fungos leveduriformes seguiu o documento M27-A3 do CLSI que utiliza como controle *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

Os inóculos foram preparados a partir de cepas ATCC dos seguintes microrganismos: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida tropicalis* (ATCC 750) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). A droga padrão utilizada para controle foi o flucanazol. As leveduras foram semeadas em tubos de ágar Sabouraud Dextrose (BD- BECTON) inclinados e incubados por 24 a 48 horas em estufa à 37 °C. Após esse período a cultura de microrganismo foi diluída em um tubo contendo solução salina estéril (NaCl - 0,85%).

A concentração da suspensão fúngica foi ajustada em espectrofotômetro (QUIMIS, MODELO Q7980RM) em comprimento de onda de 530nm para obtenção de  $90 \pm 2\%$  de transmitância, utilizando como branco solução salina estéril (NaCl – 0,85%). Na sequência a solução foi diluída 1:50 em solução salina e depois 1:20 em meio RPMI (GIBCO).

Os extratos vegetais foram dissolvidos em solução DMSO:H<sub>2</sub>O (1:20) na concentração de 250 µg/mL.

Na placa de microtitulação adicionaram-se 100,0 µL de meio de cultura (RPMI), nos poços de número 2 a 11, sendo que no décimo segundo poço foi adicionado 200 µL. Em seguida, foi adicionado, no primeiro e segundo poço, 100 µL do extrato, a partir do segundo poço fez-se a diluição seriada, obteve-se uma concentração inicial de cada extrato de 250 µg/mL e concentração final de 0,49 µg/mL.

Volumes de 100,0 µL das suspensões de microrganismos preparadas como descrito acima foram adicionados nos poços de número 1 a 11. As microplacas foram incubadas em estufa à 35°C, sem agitação por 48 horas e então se determinou a CIM. Em cada placa foi realizada o controle positivo e negativo do meio de cultura, onde no controle negativo (CN) deveria haver a ausência de crescimento e no controle positivo (CP) deveria haver 100% de crescimento microbiano. A Figura 9 mostra um esquema da placa de microtitulação para a determinação da CIM de leveduras.

250	125	62.5	31.25	15.625	7.81	3.906	1.953	0.977	0.49		

CP CN  
↑ ↑

Figura 9 - Esquema da placa de microtitulação para determinação da CIM de fungos leveduriformes.

A seguir, uma alíquota de todos os poços foi retirada e repicada em ágar Sabouraud para determinação da CFM (Concentração fungicida mínima). Após incubação a 37°C por 48 horas, foi verificado o crescimento microbiano e determinada a CFM dos extratos. As CFMs foram definidas como a menor concentração que não houve crescimento microbiano.

Já os testes de sensibilidade para os fungos filamentosos foram realizados de acordo com o documento M38-A2 (2008) do CLSI com algumas modificações para produtos naturais, tendo como controle o *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481.

Foram utilizadas para atividade antifúngica as cepas padrões de *T. rubrum* ATCC 28189 e de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, pertencentes à micoteca do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

Os dermatófitos foram cultivados em ágar batata-dextrose, incubados a 25°C, durante sete a 10 dias. Após esse período, foram adicionadas às colônias 3 mL de solução salina estéril (0,85%), a qual foi retirada com auxílio de pipeta Pasteur e transferida para tubo estéril. A suspensão contendo conídios e fragmento de hifas permaneceu em repouso por cerca de 20 a 30 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e homogeneizado. A quantificação foi feita pela contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, essas suspensões foram diluídas em meio RPMI-1640 (GIBCO) com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS (3-N-morfolino-propanosulfônico 0,165M pH 7,2) (SIGMA-ALDRICH), acrescido de 2% de glicose, para obtenção de  $2 \times 10^3$  até  $6 \times 10^3$  UFC/mL.

Os extratos foram diluídos em DMSO:H<sub>2</sub>O (1:20), para obtermos a concentração inicial na placa de 500 µg/mL. Foram utilizadas microplacas com 96 poços (INLAB), onde nos poços de 1 a 10 o colocadas diluições decrescentes do extrato preparado em meio RPMI-1640 (GIBCO) acrescido de 2% de glicose, iniciando-se 500 µg/mL até 1 µg/mL (o dobro da concentração final na placa). Os poços 11 e 12 foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Como controle do experimento foi empregado o

antifúngico sintético terbinafina (NOVARTIS), obtido sob a forma de pó, o qual foi diluído em DMSO (AMRESCO, com 99,99% de pureza), em seguida foi feita uma nova diluição na proporção de 1:100 em meio RPMI acrescido de 2% de glicose, nas concentrações de 1 até 0,002 µg/mL (o dobro da concentração final na placa), antes da adição do inóculo. Posteriormente, foram adicionados 100 µL do inóculo nos poços de 1 a 11, este passo levará à diluição da droga na proporção de 1:2. A leitura foi feita visualmente após quatro e sete dias de incubação a 35 °C, com agitação constante. A CIM para os produtos naturais foi considerada a menor em que se observou a inibição do crescimento fúngico. A CIM da terbinafina deverá estar entre 0,002 até 0,008 µg/mL.

A seguir, uma alíquota de cada um dos 96 poços da microplaca foi retirada e semeada em ágar Sabouraud para determinação da CFM (Concentração fungicida mínima). Após sete dias de incubação a 25°C, foi verificado o crescimento microbiano e determinada a CFM dos extratos.

#### 4.6 CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade com macrófagos de linhagem contínua J774G8, dos extratos obtidos via extração convencional (n-Hexano e diclorometano) e via extração supercrítica (P = 109,2 bar, P = 244,1bar e P = 250 bar), foi realizado de acordo com o método colorimétrico da sulforrodamina B como descrito por Skehan et al. (1990).

Inicialmente preparou-se uma suspensão de macrófagos de linhagem contínua J774G8 contendo  $5 \times 10^5$  células/mL em meio de cultura RPMI-1640 pH 7,6 (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 (INLAB) 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, para haver a formação de uma monocamada confluyente de células. Após a formação da monocamada, o meio foi retirado e as células foram tratadas com 100 µL das diferentes concentrações finais das substâncias (250; 100; 50; 10 e 5 µg/mL), preparadas a partir de uma solução estoque de cada extrato na concentração de 1000 µg/mL solubilizado em 5% de DMSO (AMRESCO, com 99,99% de pureza), adicionou-se ainda 100 µL de RPMI com gentamicina.

Os poços foram identificados, deixando-se alguns para o controle de células (células sem tratamento) em seguida incubou-se a placa por 48 horas a 37°C em estufa úmida com tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. Nos controles de células adicionou-se 200 µL de RPMI com gentamicina. Após o período de incubação, retirou-se o meio de todos os poços e lavou-se as células com 100 µL/poço com tampão fosfato salina (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 três vezes, e 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 sulforrodamina B (0,4% p/V em 1% de ácido acético, SIGMA-ALDRICH) na placa seca. Levou-se a microplaca a geladeira por 30 minutos (ao abrigo da luz). Em seguida, removeu-se o corante lavando-se quatro vezes com ácido acético 1% (F-MAIA). 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. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração da droga.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH\*

Os extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* tiveram sua atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH\* (2,2-difenil-1-picrilidrazila). O ensaio foi baseado na metodologia de Blois (1958) e 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. Para avaliação da atividade antioxidante os extratos e produtos elaborados reagiram com o radical estável DPPH\*, padrão Sigma-Aldrich, em uma solução de metanol (F-MAIA, com 99,8% de pureza). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Inicialmente preparou-se uma solução estoque, onde 0,024 g de DPPH<sup>®</sup> foram diluídos em 100 mL de metanol, esta solução foi mantida a -20 °C até a sua utilização. A partir desta solução foi feita a solução trabalho onde eram misturados 10 mL da solução estoque com 45 mL de metanol e então, 2850 µL desta solução eram misturados com 150 µL das soluções dos extratos.

As soluções de cada extrato foram preparadas nas concentrações de 500 µg/mL, 666,67 µg/mL, 1000 µg/mL, 3000 µg/mL, 5000 µg/mL e 7000 µg/mL. Nos tubos, após a adição da solução trabalho as concentrações finais foram: 25 µg/mL, 33,33 µg/mL, 50 µg/mL, 150 µg/mL, 250 µg/mL e 350 µg/mL.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV- VIS (SHIMADZU, MODELO UV-1203) em 515 nm após uma hora no escuro e a temperatura ambiente. Como controle positivo foi utilizado butilhidroxitolueno (BHT) e como controle negativo foi utilizado água destilada, a preparação destas soluções procedeu-se da mesma forma, porém substituindo-se 150 µL da solução de extrato por 150 µL do controle desejado (BHT ou

água destilada). O percentual da atividade antioxidante (AA%) foi calculado pela equação:

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

Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a concentração dos extratos, necessária para reduzir em 50% o DPPH• da reação (EC<sub>50</sub>). Os valores de EC<sub>50</sub> foram calculados por regressão linear de gráficos onde o eixo das abcissas (X) representa a concentração em µg/mL e o eixo das ordenadas (Y) a % média da atividade antioxidante das triplicatas.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

A avaliação do teor de fenóis totais presentes nos extrato de *C. brasiliense* foi baseada na metodologia descrita por Meda et al. (2005) porém utilizando-se o reagente de Folin-Denis ao invés do reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos são moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação (PIETTA, 2000). Segundo Shahidi et al. (1992), os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação, eles atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre.

Os extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* selecionados foram preparados na concentração de 1000 µg/ml em metanol (F-MAIA, com 99,8% de pureza). A uma alíquota de 0,5 mL dessa solução adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin-Denis 10% (SIGMA-ALDRICH, com 100% de pureza) (10 mL do reagente em 100 mL de água ultrapura), após 5 minutos adicionou-se solução de carbonato de sódio 14% (NUCLEAR, com 99,9% de pureza) (14 g do reagente em 100 mL de água ultrapura) recém-preparada.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV- VIS (SHIMADZU, MODELO UV-1203) em 760 nm após duas horas no escuro e a temperatura ambiente, onde a coloração passou de esverdeada para azul. O equipamento foi zerado com uma solução de 0,5 mL de metanol, 2,5 mL de reagente de Folin-Denis 10% e solução de carbonato de sódio 14% recém-preparada.

Foi preparada uma curva de ácido gálico utilizando as concentrações de 0,8 µg/mL, 1,4 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, 6 µg/mL e 7 µg/mL deste padrão antioxidante, a preparação desta soluções procedeu-se da mesma forma como descrita

anteriormente, sendo os extratos substituídos pelo ácido gálico. Os valores do teor de fenóis totais nas amostras foram calculados por regressão linear de gráficos onde o eixo das abcissas (X) representa a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  e o eixo das ordenadas (Y) a média das absorvâncias das triplicatas. O resultado final foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g de extrato.

#### 4.9 MODELAGEM MATEMÁTICA

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

As curvas cinéticas de extração usando  $\text{CO}_2$  supercrítico dos compostos bioativos de *C. brasiliense* foram modeladas utilizando o 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 (SOUZA et al., 2008) demonstram sucesso na modelagem da cinética de extração supercrítica utilizando esse tipo de modelo.

O modelo matemático considera 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) O soluto é tratado 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 na fase fluida resulta na seguinte equação diferencial:

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

Na qual  $C$  é a concentração dos compostos bioativos no solvente ( $\text{g/cm}^3$ ),  $q$  é a concentração dos compostos bioativos na matriz sólida ( $\text{g}_{\text{CB}}/\text{g}_{\text{sólido}}$ ),  $\rho_{\text{leito}}$  é a densidade no leito ( $\text{g/cm}^3$ ),  $u$  é a velocidade ( $\text{cm/min}$ ),  $t$  é o tempo de extração ( $\text{min}$ ),  $\varepsilon$  é a porosidade do leito e  $z$  é a coordenada na direção axial do leito ( $\text{cm}$ ). 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 ( $q$ ).

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

Na qual  $k$  é a constante cinética ( $\text{cm}^3/\text{g min}$ );  $C_{eq}$  é a concentração de equilíbrio dos compostos bioativos no solvente ( $\text{g}_{CB}/\text{cm}^3$ ). As condições iniciais e de contorno são expressas pelas equações (3) e (4), respectivamente:

$$C(0, z) = C_{eq} \text{ e } q(0, z) = q_0 \quad (3)$$

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

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

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

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

Em que  $t_r = (L/u)$  é o tempo de residência,  $L$  é o comprimento da coluna (cm) e  $u$  é a velocidade (cm/min),  $A = (z/u)\beta$ ,  $B = (-tu + z)\beta/\alpha u$ ,  $\beta = kC_{eq}\alpha$  e  $\alpha = \rho_{leito} q_0/\varepsilon C_{eq}$ .

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

$$m_{CB} = \int_0^{t_e} C_{sai} Q_f dt$$

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

Sendo que,  $Q_f$  é a vazão volumétrica de solvente e  $C_{sai}$  é a concentração dos compostos bioativos na fase fluida na saída do extrator. A constante  $k$  foi determinada minimizando a função objetivo definida pela equação (7):



$$F = \sum_{j=1}^{n_{exp}} (m_{CB_j}^{MOD} - m_{CB_j}^{EXP})^2 \quad (7)$$

Em que  $m_{CB_j}^{MOD}$  é massa calculada dos compostos bioativos extraídos;  $m_{CB_j}^{EXP}$  é a massa dos compostos bioativos obtida experimentalmente, e  $n_{exp}$  é o número de dados experimentais da curva cinética.

## 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 finalmente a modelagem da curva cinética da ESC.

### 5.1 RENDIMENTO GLOBAL DA EXTRAÇÃO

O rendimento global da extração é definido como a máxima quantidade de material que pode ser extraído a uma determinada temperatura, pressão e vazão (MEIRELES, 2003). O valor do rendimento depende das características da matéria-prima, mas também da forma como os compostos nela presentes interagem com o solvente. O rendimento da extração neste trabalho foi definido como a razão entre a massa de compostos bioativos extraídos e a massa das folhas de *Calophyllum brasiliense* utilizada na extração.

A Tabela 6 apresenta os resultados de rendimento global obtido pela extração com fluido supercrítico nas diferentes condições de processo e resultados obtidos através da extração com solvente orgânico.

Tabela 6 – Rendimento global do extrato das folhas de *C. brasiliense* obtido por ESC e solvente orgânico.

Extração com fluido supercrítico					Extração com solvente orgânico	
Condições operacionais			Rendimento %		Solvente	Rendimento %
T (°C)	Pressão (bar)	Densidade CO <sub>2</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	Mesh 30	Mesh 50		
40	109,2	0,6813	1,4	1,6	Diclorometano n-Hexano	4,3 3,9
40	150	0,7811	2,0	2,2		
60	176,7	0,6813	2,2	2,3		
60	244,1	0,7811	2,9	3,0		
40	250	0,8802	2,8	2,8		

Comparando a extração com fluido supercrítico com a extração com os solventes orgânicos, observa-se que os rendimentos globais foram superiores para os extratos obtidos com solventes orgânicos. Estes resultados podem ser explicados devido à polaridade dos solventes empregados. Outros fatores que podem influenciar no rendimento global é a maior quantidade de solvente orgânico utilizada na extração com Soxhlet e o tempo prolongado de extração (aproximadamente duas vezes maior) quando comparada com a ESC.

Apesar dos valores de rendimentos utilizando solventes orgânicos serem superiores, cabe ressaltar que os extratos obtidos por métodos convencionais necessitam de processos adicionais de separação. Assim, a escolha do melhor processo de extração deve considerar os gastos do processo total (extração + separação).

As diferenças dos rendimentos globais obtidos pela extração por solventes orgânicos apresentados na Tabela 6 indicam que a polaridade do solvente influenciou no rendimento da extração, ou seja, o rendimento global aumentou com a polaridade do solvente.

Para avaliar o efeito da granulometria no rendimento da extração foi feita novo ensaio para as condições de 176, 7 bar e 244, bar a 60°C, e então se fez a análise estatística ANOVA ao nível de 5% de significância. Os rendimentos globais estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Efeito da granulometria no rendimento da extração.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento %	
		Mesh 30	Mesh 50
176,7	60	2,2 ± 0,04	2,3 ± 0,05
244,1	60	2,9 ± 0,02	3,0 ± 0,06

De acordo com a análise estatística realizada com as duplicatas descritas na Tabela 7 não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância para o rendimento global nas diferentes granulometria. Sendo assim, foi escolhida a granulometria de mesh 30 para os testes microbiológicos e antioxidantes de *C. brasiliense*, assim como para a modelagem matemática e quantificação da substância (-) mammea A/BB.

Analisando os resultados da ESC percebe-se que o parâmetro que mais influenciou no rendimento global foi a pressão. Os dados da Tabela 6, nas isotermas de 40°C e 60°C, comprovam que o aumento isotérmico da pressão aumenta a densidade do solvente, aumentando seu poder de solubilização e conseqüentemente o rendimento da extração (KHAJEH et al; 2004; LOULI et al., 2004).

As curvas de extração para os ensaios com as folhas do material vegetal no mesh 30 e 50 são apresentadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Elas descrevem o comportamento do rendimento de extrato obtido em base seca para cada um dos experimentos. Para pressões próximas a extração é mais rápida no início do processo para baixas temperaturas, entretanto o rendimento global é maior para altas temperaturas. Evidencia-se que a alta densidade do CO<sub>2</sub> para temperaturas baixas são responsáveis para uma extração inicial rápida. Para longos períodos de tempo a solubilidade é o fator dominante para o rendimento global. Considerando que o extrato é

formado por diferentes classes de compostos, a solubilidade destes compostos pode ser diferente para as várias condições de temperatura e pressão.

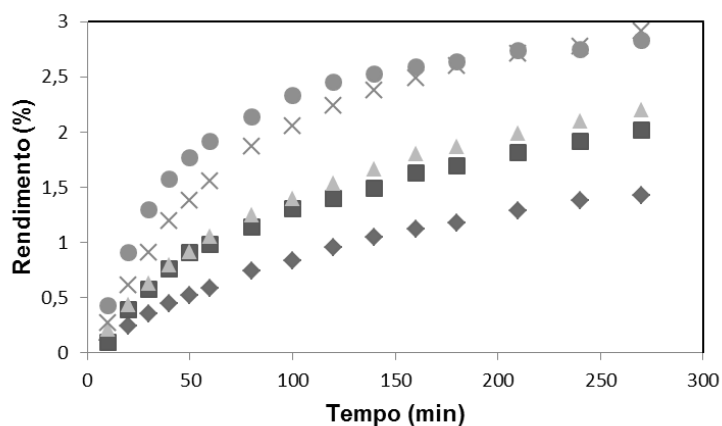


Figura 10 – Curvas de extração das folhas de *Calophyllum brasiliense* para o mesh 30. (◆) P = 109,2 bar; T = 40 °C; (■) P = 150 bar; T = 40 °C; (▲) P = 176,7 bar; T = 60 °C; (X) P = 244,1 bar; T = 60 °C; (●) P = 250 bar; T = 40 °C.

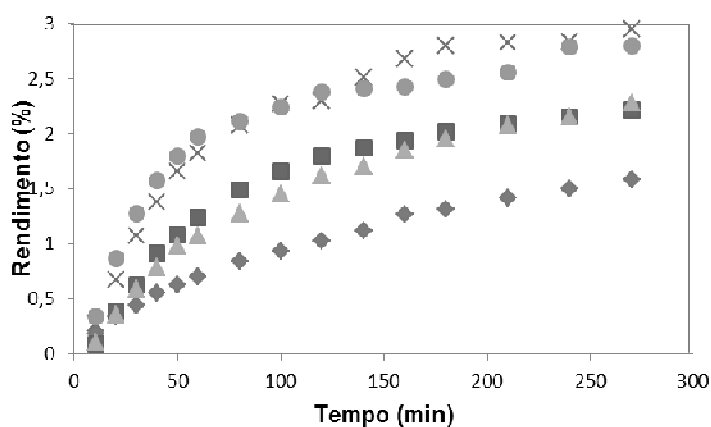


Figura 11 – Curvas de extração das folhas de *Calophyllum brasiliense* para o mesh 50. (◆) P = 109,2 bar; T = 40 °C; (■) P = 150 bar; T = 40 °C; (▲) P = 176,7 bar; T = 60 °C; (X) P = 244,1 bar; T = 60 °C; (●) P = 250 bar; T = 40 °C.

As isotermas de rendimento global do *C. brasiliense* são mostradas na Figura 12 e 13.

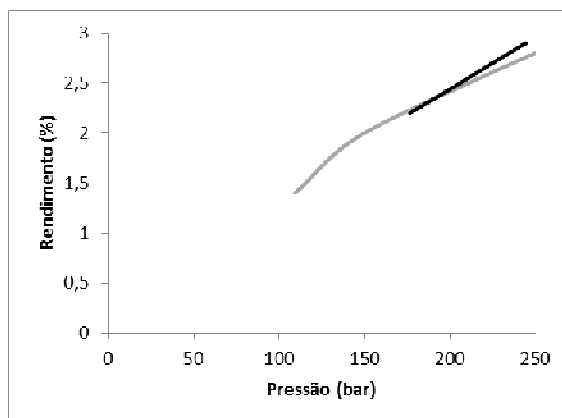


Figura 12 – Isotermas de rendimento global das folhas de *Calophyllum brasiliense* para o mesh 30. (—) isoterma de 40°C; (—) isoterma de 60°C.

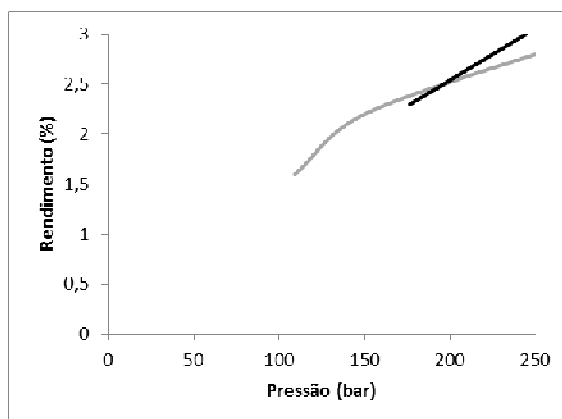


Figura 13 – Isotermas de rendimento global das folhas de *Calophyllum brasiliense* para o mesh 50. (—) isoterma de 40°C; (—) isoterma de 60°C.

Analisando as Figuras 12 e 13 observa-se o fenômeno de inversão das isotermas. As pressões de inversão foram verificadas nas proximidades 190 bar para os mesh de 30 e 50. Este fenômeno deve ser avaliado em termos do efeito da densidade do  $\text{CO}_2$  e da pressão de vapor do soluto no rendimento global de extração. Os efeitos antagônicos destes parâmetros ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, tal acontecimento é conhecido como condensação retrógrada ou retrogradação. Portanto, abaixo da pressão de inversão das isotermas, o efeito da densidade do  $\text{CO}_2$  é dominante, logo a solubilidade diminui com o aumento da temperatura. Acima da pressão de inversão, o efeito da pressão de vapor do soluto é dominante, assim a solubilidade aumenta com a temperatura (GÜÇLÜ-ÜSTUNDAG; TEMELLI, 2004; SAUCEAU et al., 2004; MICHIELIN et al; 2005).

As colorações dos extratos também foram distintas de acordo com a tecnologia empregada para a extração dos compostos bioativos. Observou-se que os extratos obtidos por extração com solvente orgânico apresentaram coloração verde, sendo ela

mais intensa para o extrato obtido com o diclorometano. Os extratos ESC apresentaram uma coloração que variou de amarelada para as condições mais amenas de extração e uma coloração verde-amarelada para a pressão mais elevada (250 bar). Estas diferenças instigam o estudo da composição, ação biológica e antioxidante dos diferentes extratos.

## 5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A determinação do conteúdo da substância (-) mammea A/BB foi feita empregando uma curva de calibração, estabelecida pelo método do padrão externo como descrito por Brenzan et al. (2010). A curva de calibração, mostrado na Figura 14, foi feita relacionando a área dos picos da (-) mammea A/BB (y), usadas como padrão externo, versus a concentração injetada (x µg/mL). A curva da calibração pode ser representada pela equação  $y = 0,7666 * x + 2,6565$ . O tempo de retenção do padrão (-) mammea A/BB e o espectro foram utilizados para identificar os picos correspondentes nos extratos de *C. brasiliense*.

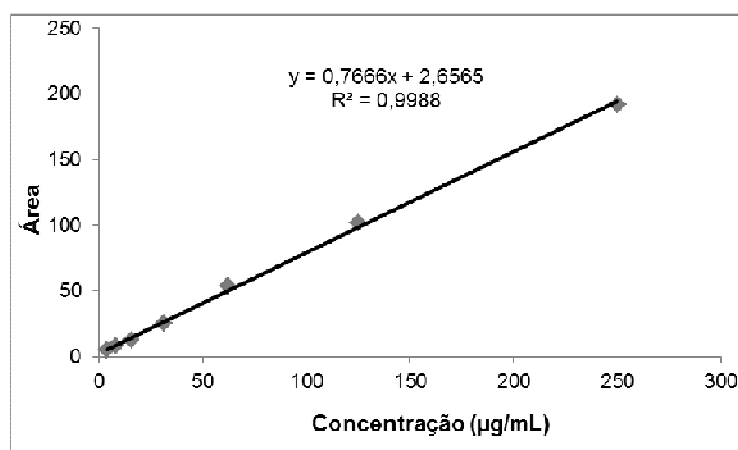


Figura 14 – Curva de calibração do padrão externo (-) mammea A/BB.

As Figuras 15, 16 e 17, mostram o cromatograma do padrão externo na concentração de 250 µg/mL, os cromatogramas dos extratos das folhas de *C. brasiliense* obtidos via Soxhlet e os cromatogramas dos extratos obtidos por ESC, respectivamente.

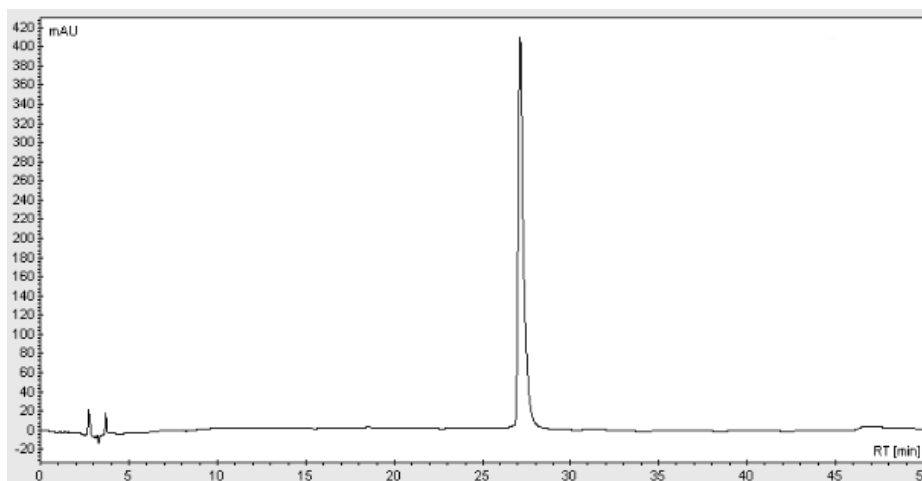


Figura 15 – Cromatograma do padrão externo (-) mammea A/BB (RT = 27,05 min).

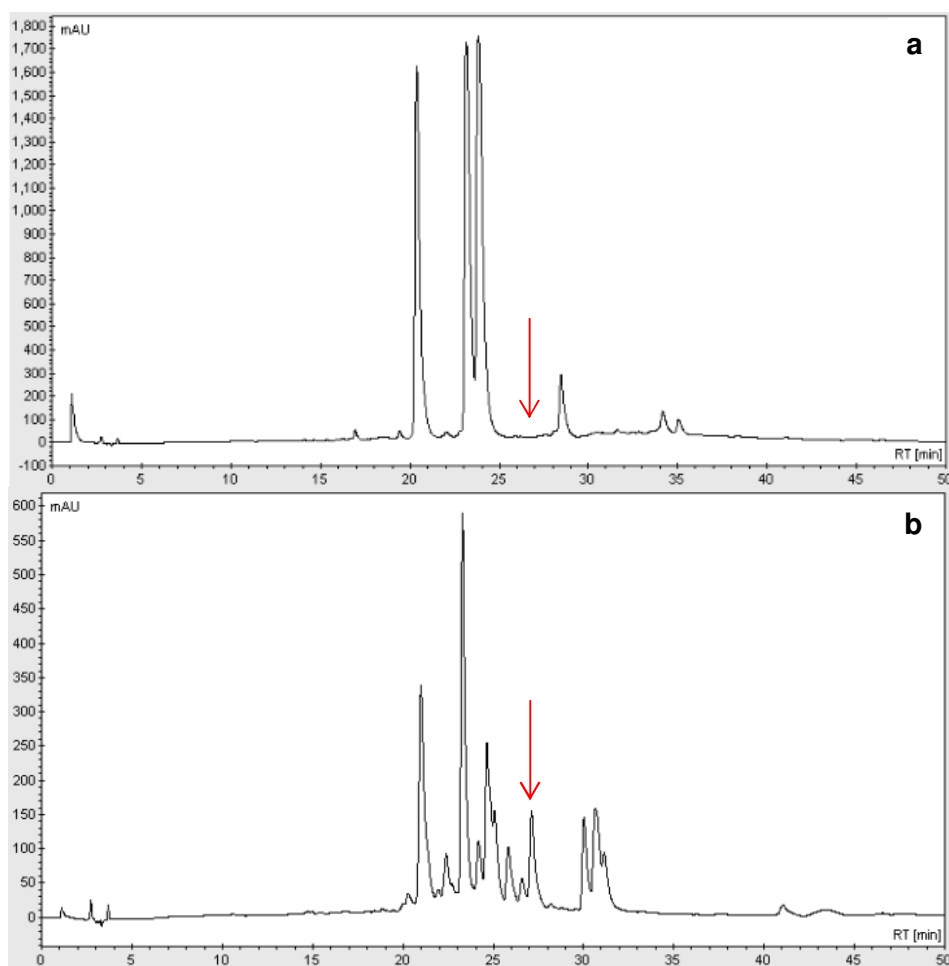


Figura 16 – Cromatogramas dos extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* obtidos por extração convencional (Soxhlet). (a) Diclorometano; (b) n-Hexano.

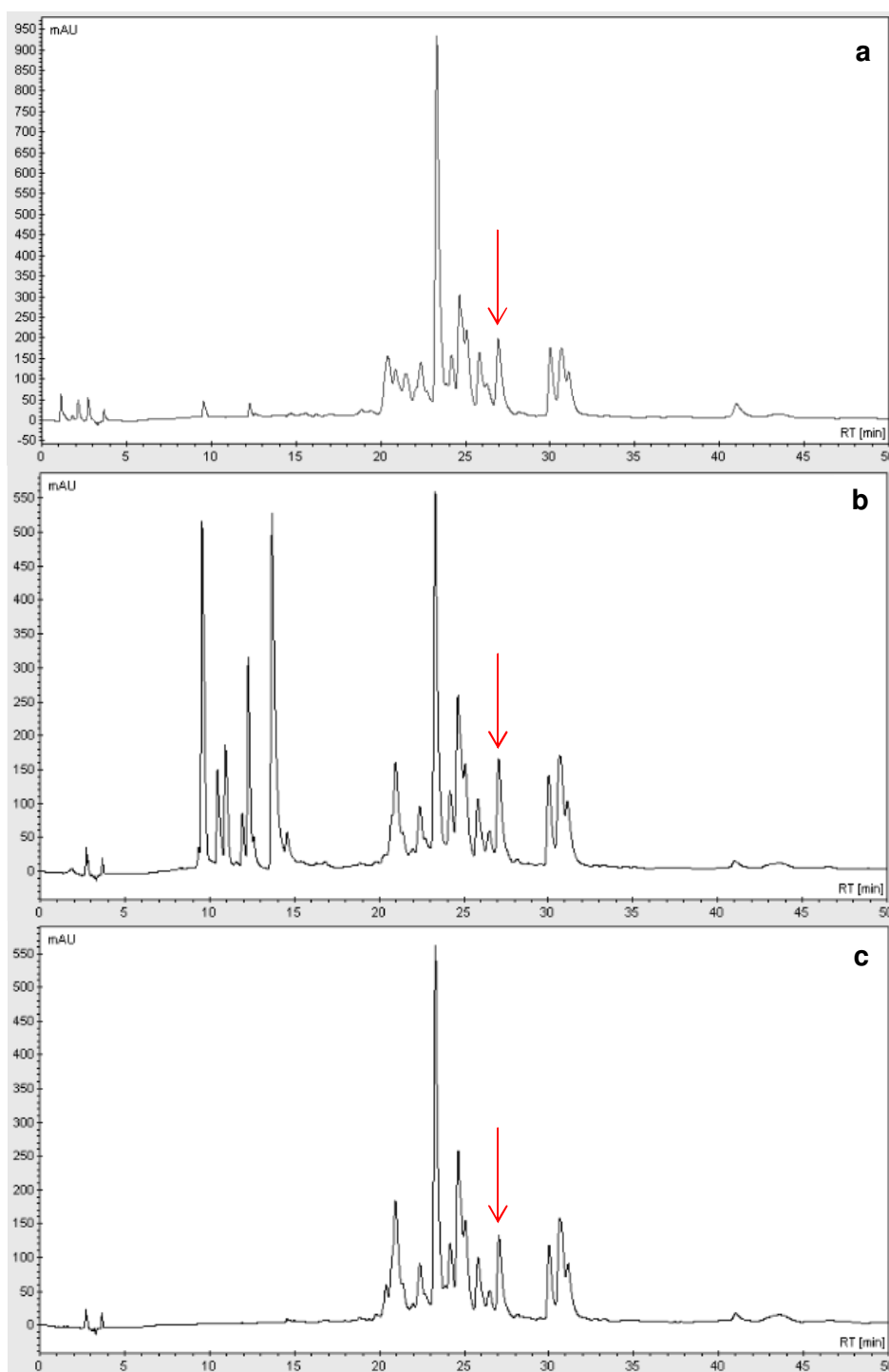


Figura 17 - Cromatogramas dos extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* obtidos por extração supercrítica. (a) P = 109,2 bar, T = 40 °C; (b) P = 250 bar, T = 40 °C; (c) P = 244,1 bar, T = 60 °C.

Os extratos apresentaram diferentes perfis cromatográficos, e diferentes concentrações da substância (-) mamea A/BB. Na Tabela 8 encontram-se os teores dessa substância nos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração



Tabela 8 – Quantificação da substância (-) mammea A/BB dos extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* obtidos pelos diferentes métodos de extração.

<b>Condição de Extração</b>	<b>% (-)mammea A/BB</b>
ESC 109,2 bar/ 40°C	5,6 ± 0,4
ESC 244,1 bar/ 60°C	4,7 ± 0,2
ESC 250 bar/ 40°C	5,3 ± 0,1
Soxhlet – Diclorometano	0,3 ± 0,03
Soxhlet- n-Hexano	3,6 ± 0,2

Analisando os dados da Tabela 8 percebe-se que os extratos obtidos por ESC apresentaram concentrações de (-) mammea A/BB superiores aos extratos obtidos por extração convencional, evidenciando que o conteúdo extraído da substância (-) mammea A/BB aumenta com a diminuição da polaridade do solvente. Comparando os resultados referentes somente aos extratos obtidos via extração supercrítica, verificamos que o extrato obtido por ESC à 40°C e 109,2 bar foi o que apresentou maior concentração da (-) mammea A/BB. Podemos verificar que o conteúdo da substância é influenciado pelo aumento pressão, quanto maior a temperatura e/ou a pressão menor a concentração da (-) mammea A/BB.

Os dados foram tratados com a análise estatística ANOVA ao nível de 5% de significância, foi constatado que os extratos obtidos com diclorometano e n-hexano diferem entre si e de todos os extratos obtidos por extração com fluido pressurizado. Já os extratos obtidos por extração supercrítica nas condições de 250 bar, 40°C e 109,2 bar, 40°C não apresentam diferença significativa, assim como os extratos obtidos nas condições de 250 bar, 40°C e 244,1 bar, 60°C com 95% de confiança.

O perfil cromatográfico obtido para o extrato permite sua padronização, para fins de controle de qualidade, contribuindo para a futura utilização deste extrato bruto. Gasparotto-Júnior et al. (2005) isolaram pela primeira vez das folhas da *C. brasiliense* a (-) mammea A/BB e esta apresentou atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. Posteriormente, Brenzan et al. (2007) isolaram a (-) mammea A/BB das folhas da *C. brasiliense* e mostraram sua atividade antileishmania. As cumarinas tipo mammea isoladas de diferentes partes da *C. brasiliense* apresentam importantes atividades biológicas, entre elas estão a atividade citotóxica para células tumorais humanas (REYES-CHILPA et al., 2004), antitumoral (ITO et al., 2003) e antibacteriana (REYES-CHILPA et al., 2004; YASUNAKA et al., 2005).

### 5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O MEV destina-se ao exame de superfícies das amostras, sendo que as superfícies internas das amostras também podem ser visualizadas desde que a amostra seja fraturada e exposta. Uma ampla faixa de aumentos pode ser usada (20x – 100.000x) e a microscopia eletrônica de varredura pode alcançar uma profundidade de campo aproximadamente 500 vezes maior que a microscopia ótica. Na Figura 18 são apresentadas as eletromicrografias do material vegetal antes e após o processo de extração.

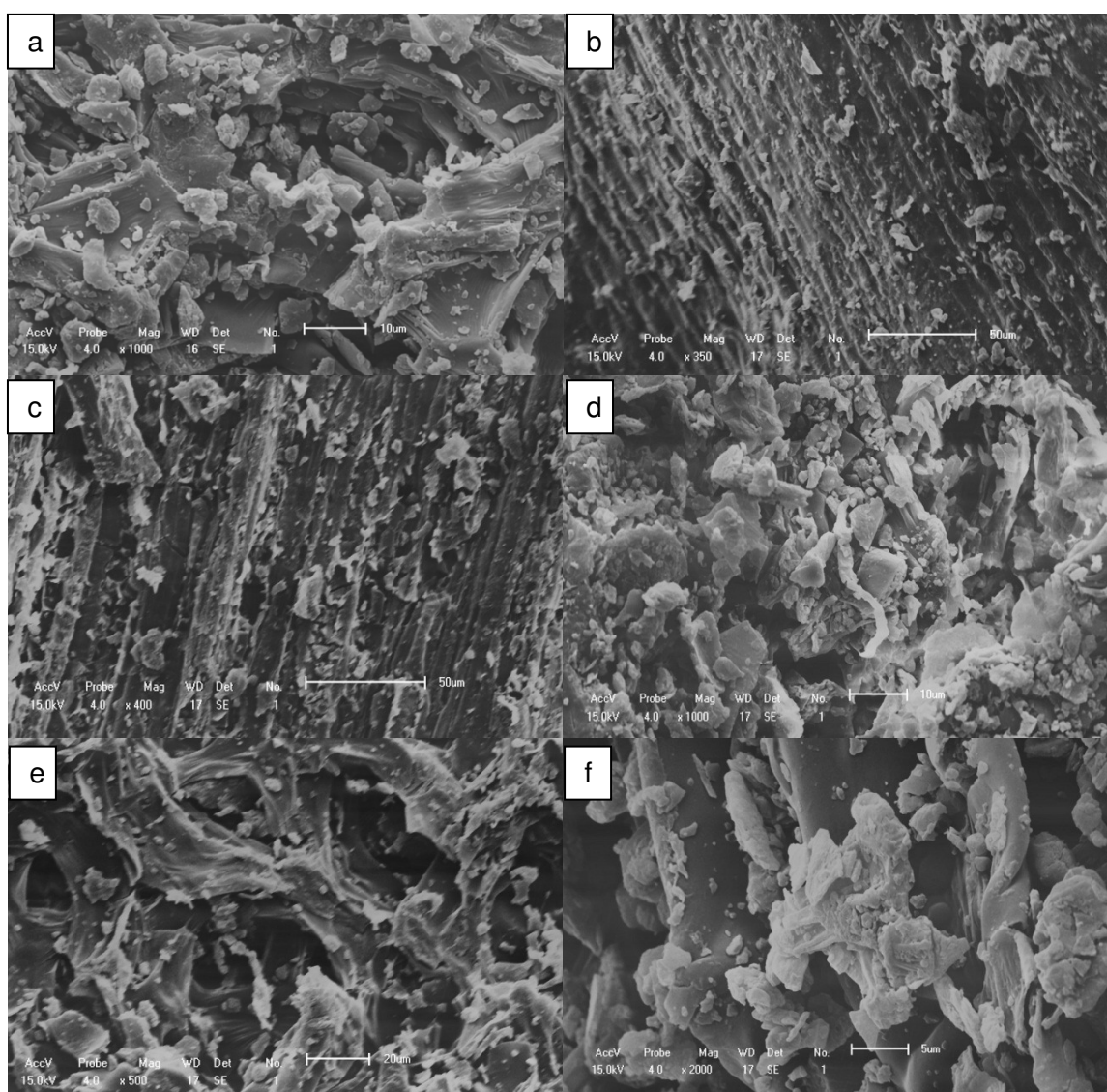


Figura 18 - Eletromicrografias do material vegetal antes e após o processo de extração. (a) material vegetal anterior ao processo de extração; (b) material vegetal após ESC (P=250 bar, T=40°C); (c) material vegetal após ESC (P=244,1 bar, T=60°C); (d) material vegetal após ESC (P=109,2 bar, T=40°C); (e) material vegetal após extração com diclorometano; (f) material vegetal após extração com n-Hexano.

Comparando as eletromicrografias da Figura 18 observa-se que as imagens relacionadas à extração convencional estão mais próximas ao material vegetal antes do processo de extração, e quando comparadas com as eletromicrografias da ESC verifica-se que o material vegetal está mais intacto. Embora a extração convencional tenha apresentado maiores rendimentos, evidencia-se que este método extraiu compostos celulósicos presentes na superfície do material vegetal.

#### 5.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Estudos já realizados com extratos, frações e compostos isolados das diferentes partes de *Calophyllum brasiliense* demonstram que a planta possui atividade antimicrobiana frente às bactérias *B. cereus*, *B. subtilis*, *H. pylori*, *S. aureus* (resistente e sensível meticilina), *S. epidermitis*, *S. saprophyticus* e *S. agalactiae* (COTTIGLIA et al., 2004; REYES-CHILPA et al., 2004; PRETTO et al., 2004; YASUNAKA et al., 2005; SOUZA et. al, 2009).

Para classificar a atividade antimicrobiana dos extratos das plantas, foi utilizado o seguinte critério: os extratos que apresentaram CIM menor que 100 µg/mL foram considerados com forte atividade antimicrobiana, os que apresentaram CIM entre 100 e 500 µg/mL foram considerados moderadamente ativos, os que apresentaram CIM entre 500 e 1000 µg/mL foram considerados com atividade fraca e quando a CIM foi maior que 1000 µg/mL o extrato foi considerado inativo (HOLETZ et al., 2002).

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *C. brasiliense* para as bactérias testadas estão sumarizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da Concentração Inibitória mínima dos extratos de *C. brasiliense*.

Droga	CIM (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>
ESC 109,2 bar/ 40 °C	15,62	3,91	> 500
ESC 244,1 bar/ 60 °C	31,2	7,81	> 500
ESC 250 bar/ 40 °C	15,62	3,91	> 500
Soxhlet - Diclorometano	250	ND*	> 500
Soxhlet- n-Hexano	125	ND*	> 500
Ciprofloxacina	ND*	ND*	0,06
Oxacilina	ND*	9,37	ND*
Vancomicina	1,17	ND*	ND*

ND\* = não determinado

Conforme Tabela acima, pode-se observar que todos os extratos apresentaram atividade contra as bactérias Gram-positiva. Estes resultados confirmam outros estudos e

justificam a razão pela qual as plantas deste gênero têm sido utilizadas para o tratamento de doenças diversas relacionadas a processos infecciosos (REYES-CHIPA et al., 1997; DWECK; MEADOWS, 2002). Já quanto à bactéria Gram-negativa os extratos se mostraram inativos.

A inatividade dos extratos contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* pode ser explicada devido à presença de uma membrana externa existente nesse microrganismo, dificultando a penetração do agente antimicrobiano, ou quando o agente consegue penetrar a concentração não é alta o suficiente para apresentar o resultado esperado. Os compostos hidrofílicos apresentam dificuldade para atravessar a membrana externa devido ao interior hidrofóbico da membrana, e os compostos hidrofóbicos apresentam dificuldade de atravessar a membrana devido à porção polar estar situada na face externa da membrana (SCHAECHTER et al., 2002; TAVARES, 1999).

Outro fator a ser considerado é que as bactérias Gram-negativas possuem o espaço periplasmático que contém enzimas que são capazes de quebrar moléculas estranhas introduzidas nas células (DUFFY; POWER, 2001; SARTORI et al., 2003).

Também tem sido demonstrado que algumas bactérias Gram-negativas possuem bomba de efluxo, mecanismo especializado em expulsar substâncias estranhas para fora de sua célula. Sendo assim, o acesso do agente antimicrobiano ao seu alvo de ação pode estar limitado por uma ativa bomba de efluxo que lança a molécula de antibiótico para fora da célula, prevenindo o acúmulo de droga no interior da célula e evitando que o agente antimicrobiano atinja a quantidade necessária para tonar o ambiente letal á célula (GHANNOUM; RICE, 1999; HANCOCK; BELL, 1988; KÖHLER, PECHÈRE, PLÉSIAT, 1999; NIKAIDO, 1989, 1994; POOLE, 1994; VAN BAMBEKE, MICHOT, TULKENS, 2003).

Comparando os resultados da Tabela 9 quanto a atividade frente aos microrganismos Gram-positivos, podemos perceber que os extratos obtidos via extração supercrítica apresentaram boa atividade antimicrobiana enquanto os extratos obtidos via extração convencional (Soxhlet) apresentaram atividade antimicrobiana moderada. Embora os valores da CIM para os ESC tenham se diferenciado, não podemos considerar a mesma como significativa devido a diferença estar em um log de diluição.

Pretto et al. (2004) analisaram os extratos, frações e compostos isolados de diferentes parte de *C. brasiliense* frente a *S. aureus* (ATCC 6538P), entretanto a atividade das folhas do material vegetal se mostrou mais evidente. Nesses ensaios o extrato bruto das folhas e a fração apolar apresentaram um CIM de 300 µg/mL, e dos seis compostos isolados (1,5-dihidoxixantona, ácido brasillênsico, ácido gálico, ácido protocatético, (-) epicatequina e friedelina) o ácido protocatético foi o único que apresentou atividade moderada com uma CIM de 200 µg/mL, o que evidencia a superioridade da atividade dos

extratos obtidos via ESC. O trabalho realizado pelo mesmo autor também não apresentou atividade frente aos microrganismos Gram-negativos (*E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *S. typhimurium*).

Em 2005 Yasunaka et al. testaram a atividade de *C. brasiliense* frente a amostras clínicas isoladas na cidade de Fukukoa, Japão e caracterizados como MRSA, onde todos os extratos da planta (folha e ceiva) foram ativos com uma CIM variando de 8 a 32 µg/mL. Os compostos isolados das folhas e ceiva do material vegetal, mammea A/BB, jacareubina, 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)xantona e 6-desoxijacareubina apresentaram uma CIM de 2 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente, enquanto a friedelina foi fracamente ativa apresentando a CIM maior que 512 µg/mL. Percebe-se novamente que os extratos supercríticos apresentaram atividade semelhante à dos extratos e compostos isolados por Yasunaka et al.

Pode-se verificar que a atividade antimicrobiana é diretamente proporcional a concentração do composto (-) mammea A/BB, ou seja, quanto maior a concentração deste composto (Tabela 8), maior a atividade antimicrobiana pois menor o valor da CIM dos extrato analisados (Tabela 9). Estudos anteriores já demonstraram as atividades biológicas de algumas cumarinas (ITOIGAWA et al., 2001; OJALA et al., 2000; YASUNAKA et al. 2005). Embora exista relação entre a concentração do composto (-) mammea A/BB e a CIM, é importante salientar que foram testados extratos o que sugere a ação sinérgica de alguns compostos, como a presença de outros compostos bioativos que já foram isolados a partir das folhas desta planta como as cumarinas (ITO et al., 2003), flavonoides (SATORI et al., 1999; SILVA et al., 2001), xantonas (REYES-CHILPA et al., 1997; SARTORI et al., 1999; ITO et al., 2002) entre outros, identificados nos trabalhos e reconhecidos como agentes antimicrobianos contra vários microrganismos (COWAN, 1999).

## 5.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os resultados da atividade fungicida e fungistática para os fungos leveduriformes usando os extratos supercríticos selecionados (P= 109,2 bar, P=244,1bar e P=250bar) e os extratos de solventes orgânicos das folhas de *Calophyllum brasiliense* estão sumarizados na Tabela 10.

Para estes ensaios foi utilizada a seguinte classificação: os extratos que apresentaram um CIM menor que 75 µg/mL a atividade antifúngica foi considerada forte, entre 75 a 150 µg/mL possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a 250 µg/mL, fraca e maior que 250 µg/mL inativo (SCORZONI et al., 2007).

Tabela 10 – Resultados do CIM e CFM para os fungos leveduriformes.

Droga	CIM – CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
ESC 109,2 bar/ 40°C	CT – CT	62,5 – CT	CT – CT	CT – CT
ESC 244,1 bar/ 60°C	CT – CT	62,5 – CT	CT – CT	CT – CT
ESC 250 bar/ 40°C	CT – CT	31,25 – CT	CT – CT	CT – CT
Soxhlet- n-Hexano	CT – CT	31,25 – CT	CT – CT	125 – CT
Soxhlet - Diclorometano	31,25 – 31,25	31,25 – CT	CT – CT	31,25 – 31,25
Flucanazol	0,125	16,0	0,5	2,0

CT= houve crescimento em todos os poços.

Analisando os dados da Tabela 10 percebe-se que os extratos obtidos pela extração convencional apresentaram a concentração fungicida mínima (CFM) e concentração inibitória mínima (CIM) menores que os extratos obtidos por extração supercrítica para os fungos leveduriformes. O extrato obtido com diclorometano (Soxhlet) apresentou uma atividade antifúngica forte para os fungos leveduriformes testados com exceção da *Candida tropicalis* que foi inativo, enquanto o extrato obtido com n-hexano apresentou atividade forte para *Candida glabrata*, atividade moderada para *C. parapsilosis* e foi inativo para *C. albicans* e *C. tropicalis*. Já os extratos obtidos por extração supercrítica nas condições testadas apresentaram atividade somente para a *Candida glabrata*. De acordo com os resultados fica evidenciado que os compostos responsáveis pela atividade antifúngica tem maior afinidade por solvente polar, ao contrário da atividade antibacteriana contra os microrganismos testados.

Em trabalho realizado por Pretto et. al (2004) verificou-se que todos os extratos e frações testadas da planta frente a *C. albicans* (ATCC 10231) e a *C. tropicalis* (C131) foram inativos, assim como os compostos isolados (1,5-dihidroxixantona, ácido brasilênsico, ácido gálico, ácido protocatético, (-) epicatequina e friedelina) que apresentaram a CIM maior que 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo assim somente o extrato obtido com diclorometano mostrou-se melhor que o estudo anterior.

Na Tabela 11 estão sumarizados os resultados para os fungos filamentosos da CIM e CFM.

Tabela 11 – Resultados do CIM e CFM para os fungos filamentosos.

Droga	CIM – CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
ESC 109,2 bar/ 40°C	16 – 16	16 – 16
ESC 244,1 bar/ 60°C	16 – 16	16 – 16
ESC 250 bar/ 40°C	62,5 – 62,5	62,5 – 62,5
Soxhlet- n-Hexano	62,5 – 62,5	62,5 – 62,5
Soxhlet - Diclorometano	3,9 – 3,9	7,8 – 6,8
Terbinafina	0,004	0,008

Analisando os dados da Tabela 11 observa-se que todos os extratos apresentaram forte atividade antifúngica frente aos dermatófitos testados, sendo que o extrato obtido com Soxhlet novamente apresentou o menor valor de CIM para os fungos filamentosos, evidenciando novamente que os compostos responsáveis pela atividade antifúngica tem maior afinidade por solvente polar.

Diferente da atividade antibacteriana, nas atividades antifúngicas os extratos das folhas obtidos por extração com fluido pressurizado não apresentaram destacada atividade antifúngica, portanto conclui-se que os extratos obtidos por extração supercrítica apresentam seletividade de ação bacteriana.

Segundo Ito et al. (2002), os principais constituintes da planta *C. brasiliense* são benzofuranos, chalconas, cumarinas, flavonoides e triterpenos. Estudos relatam que as xantonas são compostos que possuem atividade antifúngica (HAY et al., 2003; KHAN; KIHARA; OMOLOSO, 2002; MOREL et al., 2000; REYES-CHILPA et al., 1997; ZHANG et al. 2002;), atividade protetora de câncer (ITO et al., 2002) e imunomodulatória (GONZALEZ et al., 1999).

As xantonas são compostos fenólicos hidroxilados, que se têm mostrado ativos contra microrganismos, devido ao número e posição dos grupamentos OH no anel fenólico. Existem evidências que o aumento de hidroxilações resulta em aumento da toxicidade para a célula microbiana e quanto mais oxidado os compostos, maior é o efeito inibitório. Os mecanismos que podem ser responsáveis pela toxicidade podem, através da oxidação, atuar inibindo processos enzimáticos que pode acontecer em grupamentos sulfidril ou através de interações com proteínas (COWAN, 1999).

A atividade antimicrobiana de flavonoides é devida, provavelmente, a sua habilidade de se complexar com proteínas e com a parede celular do microrganismo, sendo que quanto mais lipofílico for o flavonoide, mais facilmente pode ocorrer a atividade antifúngica (COWAN, 1999; SOMCHIT et al., 2003). O mecanismo de ação antifúngica dos compostos terpênicos está relacionado com a ruptura da membrana. O comportamento anfótero de saponinas, e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolípídeos de membranas, podem ser responsáveis pela ação antimicrobiana, alterando a permeabilidade da membrana, com posterior destruição da mesma (AVATO et al., 1997; COWAN, 1999; GUILLET et al., 2001)

## 5.6 CITOTOXICIDADE

Testaram-se macrófagos da linhagem J774G8 tratados com concentrações de 250; 100; 50; 10; 5 µg/mL dos extratos das folhas *Calophyllum brasiliense* obtidos por extração convencional (diclorometano e n-hexano) e ESC (P = 109,2 bar; P = 244,1 bar;

P = 250 bar). Após 48 horas de incubação, a citotoxicidade foi avaliada pelo método colorimétrico da sulforrodamina B e com base nos resultados foi calculado os valores da concentração citotóxica em 50% dos macrófagos (CC<sub>50</sub>), conforme Tabela 12.

Tabela 12 – Dados da concentração citotóxica em 50% dos macrófagos (CC<sub>50</sub>) para os extratos obtidos por ESC e convencional.

Droga	CC <sub>50</sub> (µg/mL)
ESC 109,2 bar/ 40 °C	21,55 ± 2,2
ESC 244,1 bar/ 60 °C	23,85 ± 3,7
ESC 250 bar/ 40 °C	24,60 ± 1,1
Soxhlet- n-Hexano	26,15 ± 1,1
Soxhlet - Diclorometano	74,50 ± 2,1

O índice de seletividade (IS) dos extratos brutos foi calculado a partir da razão dos valores da concentração citotóxica em 50% dos macrófagos (CC<sub>50</sub>) e a concentração inibitória mínima (CIM) dos fungos e bactérias testados que apresentaram atividade. Foi considerado que se o IS for maior que 1, o agente analisado é mais ativo contra o microrganismo avaliado e menos tóxico para o hospedeiro, e se menor que 1, o agente é mais tóxico para o macrófago J774G8 do que para os microrganismos testados. Os resultados do IS das amostras analisadas são apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores calculados do índice de seletividade (IS) dos extratos obtidos por ESC e convencional para os diferentes microrganismos.

Microrganismos	Índice de Seletividade				
	Condição de extração				
	ESC 109,2 bar/ 40 °C	ESC 244,1 bar/ 60 °C	ESC 250 bar/ 40 °C	Soxhlet - Diclorometano	Soxhlet- n-Hexano
<i>S. aureus</i>	1,38	0,76	1,57	0,30	0,21
MRSA	5,51	3,05	6,29	ND*	ND*
<i>C. albicans</i>	ND*	ND*	ND*	2,38	ND*
<i>C. glabrata</i>	0,34	0,38	0,79	2,38	0,79
<i>C. parapsilosis</i>	ND*	ND*	ND*	2,38	0,21
<i>T. rubrum</i>	1,35	1,49	0,39	19,10	0,42
<i>T. mentagrophytes</i>	1,35	1,49	0,39	9,56	0,42

ND\* = não determinado

Analisando a Tabela 13, percebe-se resultados interessantes na análise de seletividade com os extratos obtidos via extração supercrítica para as bactérias gram-positivas, na qual os extratos foram de 1,38 à 6,29 vezes mais nocivos para os microrganismos do que para os macrófagos J774G8, com exceção do extrato obtido a 244,1 bar e 60 °C para *S. aureus*.



Ao avaliarmos o índice de seletividade frente aos fungos leveduriformes e filamentosos testados, observa-se resultados interessantes para o extrato obtido pelo método convencional com diclorometano, no qual o extrato foi de 2,38 à 19,10 vezes mais nocivos para os microrganismos do que para os macrófagos.

É indispensável para um tratamento seguro, que os extratos não possuam ação citotóxica sobre as células, seja frente às bactérias ou aos fungos testados.

### 5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos das folhas de *C. brasiliense* foi avaliada pelo método do DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenil-1-picrilidrazila) conforme descrito no item 4.7. Os ensaios foram realizados com os extratos obtidos pela extração com solvente orgânico e os extratos que apresentaram maior e menor rendimento global e o extrato na condição de maior pressão dentre aqueles obtidos com fluido pressurizado. Os resultados de atividade antioxidante (AA%) e ao EC<sub>50</sub> dos extratos foram comparados entre as diferentes técnicas de extração. Os experimentos foram feitos em triplicata.

A Tabela 14 apresenta, para as condições de extração supercrítica e convencional (Soxhlet), os dados médios da porcentagem de atividade antioxidante para as diferentes concentrações de extrato e os valores de EC<sub>50</sub>, que representa a concentração dos extratos necessária para reduzir em 50% o DPPH<sup>\*</sup> da reação. A análise estatística ANOVA foi aplicada ao nível de 5% de significância.

Tabela 14 – Dados de Atividade Antioxidante (%) dos extratos obtidos na ESC e convencional utilizando o método DPPH<sup>\*</sup>.

Condição de Extração	AA% x Média Concentração do extrato (µg/mL)						EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	25	33,33	50	150	250	350	
ESC 109,2 bar/ 40 °C	15,40	18,48	31,22	50,12	69,03	79,54	149,35 <sup>a</sup>
ESC 244,1 bar/ 60 °C	12,44	17,30	21,59	50,09	66,08	78,08	149,13 <sup>a</sup>
ESC 250 bar/ 40 °C	13,60	17,29	28,95	54,91	68,17	76,18	131,73 <sup>a</sup>
Soxhlet - Diclorometano	3,94	9,00	20,66	40,41	58,52	75,60	206,58 <sup>b</sup>
Soxhlet- n-Hexano	8,02	9,39	18,21	39,90	52,34	60,46	242,84 <sup>b</sup>

\* Letras iguais não diferem significativamente entre si.

O valor de EC<sub>50</sub> foi calculado, por regressão linear, na região onde a curva de concentração de extrato (µg/mL) versus AA (%) assemelha-se a uma reta. A Figura 19 apresenta um gráfico com os valores EC<sub>50</sub> para as diferentes condições de extração.

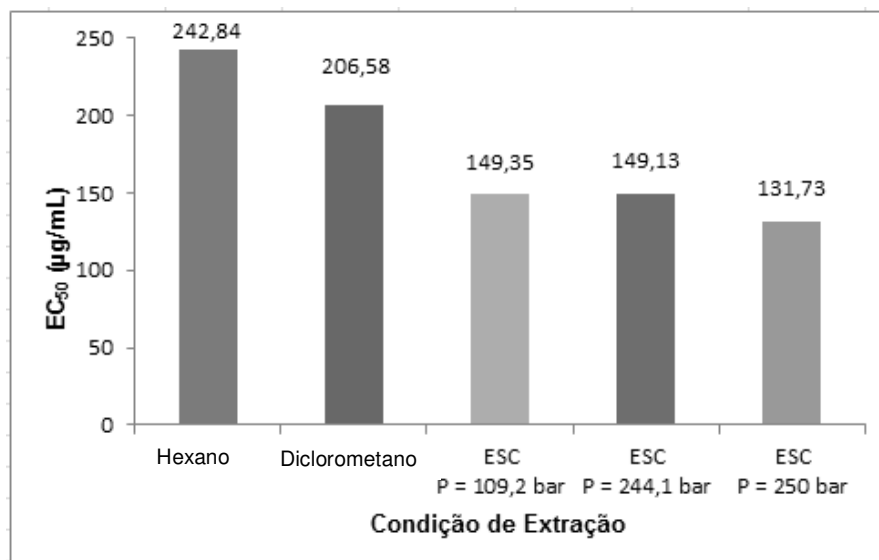


Figura 19 - Gráfico com os valores EC<sub>50</sub> para as diferentes condições de extração

Os extratos obtidos por Soxhlet apresentaram valores do EC<sub>50</sub> superior aos obtidos na ESC. Para os extratos obtidos por extração convencional, a Tabela 14 e a Figura 19 mostra que o extrato obtido com hexano apresentou menor atividade antioxidante quando comparado com o extrato obtido com diclorometano, esse dado reafirma as informações da literatura que diz que a maioria dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante possui mais afinidade por solventes polares.

Na Tabela 14 e na Figura 19 encontram-se os resultados do EC<sub>50</sub> para os extratos obtidos por ESC. O menor resultado do EC<sub>50</sub> foi observado na temperatura de 40°C e 250 bar, que conseqüentemente apresentou maior atividade antioxidante, em relação aos demais extratos testados. A tendência no aumento da atividade antioxidante em temperaturas menores sugere que os compostos dos extratos são termosensíveis (HU; HUH; XU, 2005). O efeito da temperatura sobre esses resultados parece ter exercido menor influência do que o da pressão, visto que a 250 bar e 40°C (131,73 µg/mL), a atividade antioxidante foi maior do que em todas as outras condições. Este resultado indica que aumento da pressão e, conseqüente aumento da densidade do fluido supercrítico, aumenta a concentração dos compostos extraídos com atividade antioxidante presentes nos extratos supercríticos.

Aplicando o teste de análise de variância com 95% de confiança observa-se que não houve diferença significativa entre os extratos obtidos com fluido pressurizado, assim como não houve diferença significativa entre os extratos obtidos com solvente orgânico, porém entre os extratos obtidos por ESC e os extratos obtidos por Soxhlet houve diferença significativa.

Segundo Reynertson et al. (2005), um extrato cujo valor de EC<sub>50</sub> é menor que 50 µg/mL é considerado muito ativo, fato não observado para todos os extratos de C.

*brasiliense*. Embora os extratos obtidos por ESC não tenham sido ativos, os mesmos apresentaram resultado significativamente melhor, ao nível de 5% de significância, que os extratos obtidos pelo método convencional.

Os altos valores do  $EC_{50}$  obtidos por este método podem ter sido causados por alguns fatores como, a inexistência de substâncias doadoras de hidrogênio ou de elétrons nos extratos da planta, como as cumarinas e biflavonóides; a presença de uma grande variedade de compostos nestes extratos que interagem com o meio contendo radicais DPPH<sup>•</sup> e, quando puras estas substâncias podem ser capazes de doar hidrogênio ou elétrons entre si, como, por exemplo, as xantonas e isocumarinas. Quando compõem uma mistura complexa podem ser incapazes de fazê-lo, pois em sistemas complexos o estado de excitação das moléculas interfere diretamente na AA.

Portanto, a atividade antioxidante detectada para materiais vegetais, pode ser causada por várias classes de constituintes, e também pelo sinergismo e interações entre eles a partir da mistura complexa, resultando em uma atividade antioxidante dependente da composição do extrato.

## 5.8 TEOR DE FENÓIS TOTAIS

O método de Folin-Denis foi empregado para avaliar a quantidade de fenólicos totais presentes nos extratos obtidos, segundo a metodologia citada no item 4.8. Este método baseia-se na redução em meio alcalino do reagente Folin-Denis pelos fenóis promovendo a alteração da coloração de esverdeada para azul, que é medido a 760 nm.

O reagente de Folin-Denis, detecta todos os fenóis, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos presentes em uma matriz embora não seja específico para uma determinada classe de metabólitos. Sendo assim 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).

O ácido gálico foi utilizado como padrão. A Figura 20 apresenta a curva padrão obtida e na Tabela 15 estão apresentadas, para as ESC e solvente orgânico (Soxhlet), as quantidades de fenólicos totais em miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato.

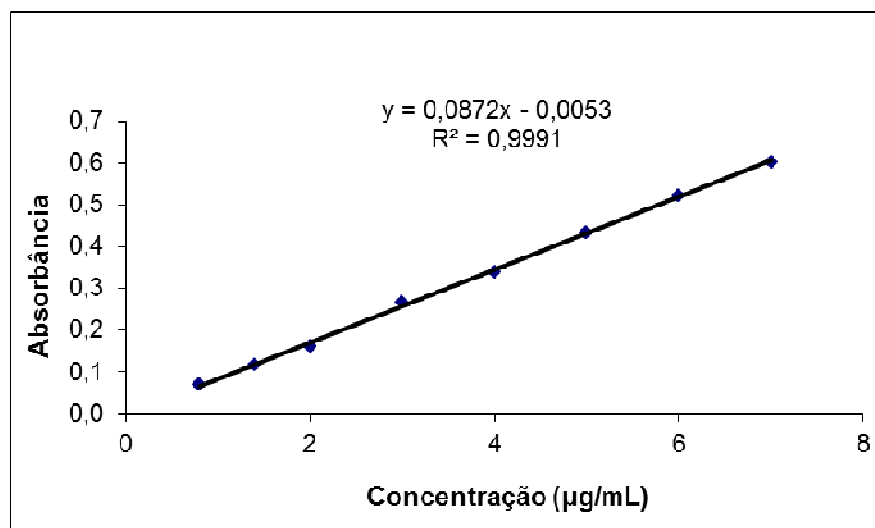


Figura 20 - Curva de calibração do padrão ácido gálico.

Tabela 15 – Dados de fenóis totais (EAG) para as extrações com fluido pressurizado e solvente orgânico.

Condição de extração	Absorbância média	Fenóis totais (mg de EAG/ g de extrato)
ESC 109,2 bar/ 40°C	0,126 ± 0,01	15,06
ESC 244,1 bar/ 60°C	0,230 ± 0,02	26,98
ESC 250 bar/ 40°C	0,285 ± 0,01	33,29
Soxhlet - Diclorometano	0,360 ± 0,01	41,89
Soxhlet- n-Hexano	0,159 ± 0,01	18,84

Analisando a Tabela 15, conclui-se que dos extratos estudados, o que apresentou maior teor de fenóis em EAG, foi o extrato obtido por Soxhlet com diclorometano, no caso da ESC o extrato obtido na condição de 250 bar e 40°C apresentou resultado superior aos demais. Estes resultados indicam que as substâncias responsáveis pelo teor de fenóis totais são polares, portanto, tem maior afinidade por solventes polares. Os resultados obtidos revelam, no caso da ESC, uma relação da temperatura e pressão na quantidade de fenólicos (em EAG) obtida, em uma isoterma o aumento da pressão aumentou o teor de fenóis totais, já em uma isobárica o aumento da temperatura diminuiu este teor, isto pode ser devido esses compostos serem termosensíveis ou devido ao fenômeno de retrogradação.

Os resultados do teor de fenóis totais dependem da natureza química e estrutura dos compostos fenólicos presentes no extrato (DORMAN et al., 2003). Uma vez que as plantas do gênero *Calophyllum* são constituídas de substâncias como cumarinas, biflavonóides e xantonas, era realmente esperado que o teor de fenóis totais fosse elevado. Segundo Zheng e Wang (2001), devido a diversidade e complexidade das

misturas naturais de compostos fenólicos no extrato herbáceo, é difícil caracterizar e comparar suas atividades antioxidantes.

### 5.9 MODELAGEM MATEMÁTICA

As curvas cinéticas de extração usando CO<sub>2</sub> supercrítico dos compostos bioativos de *C. brasiliense* foram modeladas utilizando o modelo empírico de segunda ordem, em que os valores da constante cinética  $k$  foram calculados utilizando os dados experimentais das curvas cinéticas minimizando a função objetivo definida pela equação (7).

Na Tabela 16 encontram-se os valores dos parâmetros de transferência de massa e os valores estimados da constante  $k$  utilizados para a modelagem matemática de acordo com cada condição de extração. Para o ajuste dos parâmetros foi desenvolvido um programa computacional em Linguagem FORTRAN, o método numérico de otimização univariável da seção áurea foi utilizado.

Tabela 16 – Parâmetros de transferência de massa e constante  $k$  utilizados para a modelagem matemática de acordo com cada condição de extração.

Parâmetros	Condição de extração				
	P= 109,2 bar T=40 °C	P=150 bar T=40 °C	P=176,7 bar T=60 °C	P=244,1 bar T=60 °C	P=250 bar T=40 °C
$Q_f$ (cm <sup>3</sup> /min)	3	3	3	3	3
$m_b$ (g)	20,0681	20,0057	20,0136	20,0035	20,0028
$\varepsilon$	0,87	0,85	0,85	0,85	0,85
$P_{CO_2}$ (g/cm <sup>3</sup> )	0,6813	0,7811	0,6813	0,7811	0,8802
$P_{leito}$ (g/cm <sup>3</sup> )	0,1169	0,1165	0,1166	0,1165	0,1165
$u$ (cm/min)	0,5405	0,5533	0,5533	0,5533	0,5533
$C_{eq}$ (g/cm <sup>3</sup> )	$7,768 \times 10^{-4}$	$1,271 \times 10^{-3}$	$1,385 \times 10^{-3}$	$2,007 \times 10^{-3}$	$2,739 \times 10^{-3}$
$k$ estimado (cm <sup>3</sup> /g * min)	3,5874	3,2675	3,7271	6,1209	3,1965

O parâmetro  $k$  do modelo matemático está relacionado com a velocidade da extração. Observa-se na Tabela 16 que os compostos bioativos presentes nas folhas é extraído com maior facilidade à 244,1 bar e 60°C, sendo o parâmetro  $k$  bastante próximos nas demais condições. Nas extrações dos compostos bioativos das folhas de *C. brasiliense* quando a temperatura é mantida constante observa-se que a pressão teve influência neste parâmetro, sendo mais significativa para a isoterma de 60°C onde o aumento da pressão aumentou significativamente o valor do parâmetro  $k$ . Já na isoterma de 40°C o aumento da pressão causou a diminuição nos valores do parâmetro  $k$  do

modelo. Ao analisarmos o efeito da temperatura verificamos que com aumento da temperatura há também o aumento do parâmetro  $k$ .

As cinéticas de extração dos compostos bioativos experimentais e modeladas para as folhas de *C. brasiliense* são apresentadas na Figura 21 para todas as condições experimentais com fluido pressurizado realizadas com o material vegetal de mesh 30.

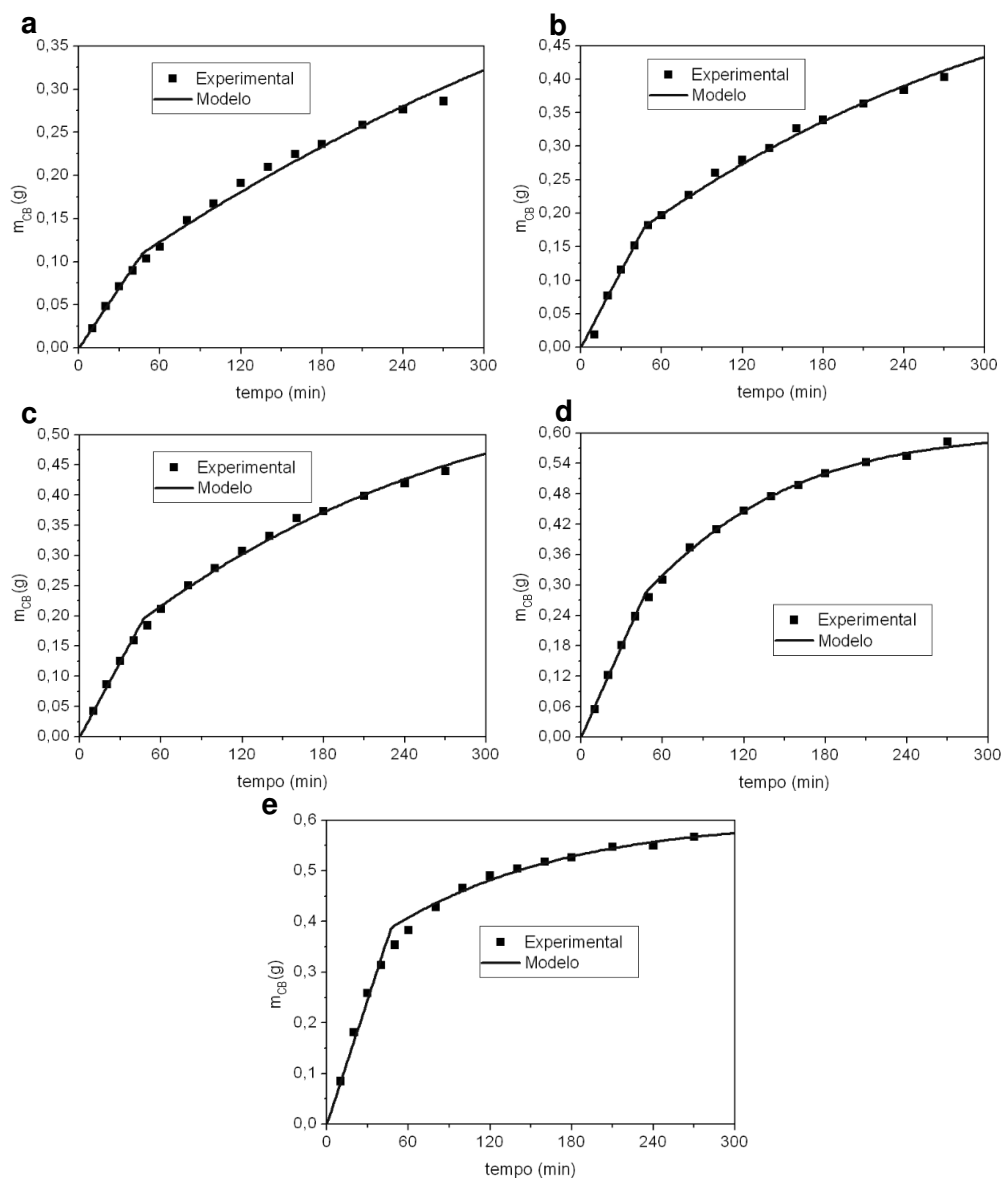


Figura 21 – Cinéticas de extração experimentais e modeladas para as folhas de mesh 30 de *Calophyllum brasiliense*. (a)  $P = 109,2$  bar,  $T = 40^\circ\text{C}$ ; (b)  $P = 150$  bar,  $T = 40^\circ\text{C}$ ; (c)  $P = 176,7$  bar,  $T = 60^\circ\text{C}$ ; (d)  $P = 244,1$  bar,  $T = 60^\circ\text{C}$ ; (e)  $P = 250$  bar,  $T = 40^\circ\text{C}$ .

Na Figura 21 encontram-se as curvas cinéticas calculadas empregando o modelo de segunda ordem proposto. Observa-se que o modelo representa satisfatoriamente as cinéticas de extração em todas as condições investigadas. Vale ressaltar que a modelagem das curvas de extração dos dados experimentais é importante para a

otimização de projetos como a definição do volume do extrator, assim como para a predição do comportamento da extração ao longo do processo (tempo total da extração para uma condição de operação específica).

## 6 CONCLUSÃO

É relatado na literatura especializada disponível cerca de 510 trabalhos relacionados ao gênero *Calophyllum*, dos quais aproximadamente 108 são de *Calophyllum brasiliense*, porém nenhum destes estudos está relacionado à extração supercrítica de compostos bioativos de *Calophyllum brasiliense* e posterior análises biológicas desses extratos.

Através do estudo realizado foi possível concluir que a hipótese foi justificada pela tese. Os extratos obtidos por ESC, embora tenham apresentados menores rendimentos, foram mais seletivo quanto a (-) mammea A/BB, apresentando maiores teores do composto. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para verificar se com a utilização de co-solventes o rendimento e os teores de (-) mammea A/BB se elevam.

Embora a AA pelo método DPPH<sup>•</sup> não tenha apresentado bons resultados, os extratos obtidos via ESC foram mais antioxidantes que os extratos obtidos via Soxhlet, já que apresentou menores valores do CE<sub>50</sub>. Todos os extratos apresentaram altos teores de compostos fenólicos, o que é justificado pela composição química de *Calophyllum brasiliense* como xantonas, cumarinas e biflavonóides. A análise antioxidante é inédita para este material vegetal, portanto ainda serão necessários novos estudos aplicando outras metodologias de análise.

Os extratos supercríticos foram seletivos para as bactérias Gram-positivas e se mostraram fortemente ativos contra os fungos filamentosos. Em análise *in vitro*, as concentrações superiores (1,38 à 6,29 vezes) àquelas que exercem ação tóxica sobre os microrganismos são tóxicas aos macrófagos J774G8. É indispensável para um tratamento seguro, que os extratos não possuam ação citotóxica sobre as células, sendo assim estudos *in vivo* serão fundamentais para utilização desses extratos na medicina tradicional.

O modelo matemático de segunda ordem utilizado para descrever as curvas cinéticas da extração, representou adequadamente os dados experimentais em todas as condições avaliadas, entretanto, um estudo da viabilidade técnica e econômica para instalação de uma planta de ESC supercrítica de *Calophyllum brasiliense* é necessário.



## REFERÊNCIAS

- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; HUERTA-REYES, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Fukuoka, v.27, n. 1, p. 141-143, Jan. 2004.
- ALI, M.S.; MAHMUD, S.; PERVEEN, S.; AHMAD, V.; RIZWANI, G. Epimeers from the leaves of *Calophyllum inophyllum*. **Phytochemistry**, n. 50, p. 1385-1389, 1999.
- ALVES D. L.; SILVA C. R. **Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal**. São Paulo: Atheneu, 2002.
- AVATO, P.; VITALI, C.; MONGELLI, P.; TAVA, A. Antimicrobial activity of polyacetylenes from *Bellis perennis* and their synthetic derivatives. **Planta médica**, v. 63, p. 503-507, 1997.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v. 28, n. [s/n], p. 25-30, 1995.
- BRENZAN, M. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves. **Parasitology Research**, Springer- Verlag, v. 101, p. 715-722, May, 2007.
- BRENZAN, M. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C. M.; MITSUI, M. L.; CORTEZ, D. A. G. Quantitative and Qualitative Analyses of (-) mamea A/BB Coumarin in Extracts of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae) by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, n. 2, p. 283-295, Dec. 2010.
- BRUNNER, G. **Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and application to separation process**, Steinkopff, New York, 1994.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21-33, 2005.
- CARDOZO-FILHO L. **Modelagem da extração supercrítica de óleos essenciais**. 1999, Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, 1999.
- CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.
- CHARPENTIER, B. A.; SEVENANTS, M. R. **Supercritical Fluid Extraction and Chromatography**, American Chemical Society, Washington, DC, 1988, 253p.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, document M07-A8; approved standard, 8<sup>th</sup> ed., Wayne, Pennsylvania, 2009, 65 p.

- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-First Informational Supplement, document M100-S21. CLSI, Wayne, PA, 2011, 165 p.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-First Informational Supplement, document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, 2011, 165 p.
- 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.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, v. 3, p. 388, 1978.
- COTTIGLIA, F.; DHANAPAL, B.; STICHER, O.; HEILMANN, J. New Chromanone Acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. **Journal of Natural Products**, Zurich, v. 67, p. 537-541, Feb. 2004.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- CRANK, J. **The mathematics of diffusion**. Oxford: Clarendon, 1975, 414 p.
- CROMBIE, L.; JONES, R. C. F.; PALMER, C. J. Synthesis of the *Mammea* Coumarins. Part 1. The Coumarins of the *Mammea* A, B and C Series. **Journal Chemical Society**, v. 26, p. 317-331, 1987.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981, p. 337-340.
- CUSACK, D.; MONTAGNINI, F. The role of native species plantations in recovery of understory woody diversity in degraded pasturelands of Costa Rica. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 188, p. 1-15, 2004.
- DHARMARATNE, H. R.; WIJENGHE, W. M.; THEVANASEM, V. Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 66, n. 3, p. 339-342, 1999.
- DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441-2469, 2006.
- DORMAN, H. J. D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M. J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 255-262, 2003.
- DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 527-529, 2001.
- DUKE, J. A.; MARTINEZ, R. V. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**, CRC Press Ed., Maryland, 1994.
- DWECK, A. C.; MEADOWS, T. Tamanu (*Calophyllum inophyllum*) – the African, Asian, Polynesian and Pacific Panacea. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, p. 341 – 348, 2002.

EDITORIAL. Pharmaceuticals from plants: great potential, few funds. **The Lancet**. Boston, v. 343, n. 8912, p.1513-1515, Jun. 1994.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis:UFSC, 2003. cap.16, p. 91-103.

EMENDORFER, F.; EMENDORFER, F.; BELLATO, F.; NOLDIN, V. F.; NIERO, R. CECHINEL-FILHO, V. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 63-68, 2005.

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, p. 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, p. 129-138, 1999b.

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

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, p. 131-138, 2009.

GASPAROTTO-JUNIOR, A.; BREZAN, M. A.; PILOTO, I. C.; FERREIRA, A. G.; CORTEZ, D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 28, n.4, p. 575-578, agosto, 2005.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

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**, p. 1315-1321, 1947.

GOH, S. H.; JANTAN, I.; GRAY, A. I.; WATERMAN, G. Xanthenes prenylated from *Garcinia opaca*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1383-1386, 1992.

GONZALEZ, M. J.; NASCIMENTO, M. S. J.; CIDADE, H. M.; PINTO, M. M. M.; KIJJOA, A.; ANANTACHOKE, C.; SILVA, A. M. S.; HERZ, W. Immunomodulatory activity of xanthenes from *Calophyllum teysmanii* var. inyphylloide. **Planta Médica**, v. 65, p. 368-371, 1999.

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

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG, O.; TEMELLI, F. Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 31, n. 3, p. 235-253, novembro, 2004.

GUILLET, D.; HÉLESBEUX, J. J.; SÉRAPHIN, D.; SÉVENET, T.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Novel Cytotoxic 4-Phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 5, p. 563-568, 2001.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n.2, p. 3864-3874, 1991.

HANCOCK, R. E. W.; BELL, A. Antibiotic uptake into Gram-negative bacteria. **European Journal Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, p. 713-720, 1998.

HAY, A. E.; GUILLET, D.; MOREL, C.; LARCHER, G.; MACHEREL, D.; LE RAY, A. M.; LITAUDON, L.; RICHOMME, P. Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seeds and new xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. **Planta Médica**, v. 69, n. 12, p. 1130-1135, 2003.

HERNANDEZ-PEREZ, M.; LÓPEZ-GARCIA, R. E.; RABANAL, R.M.; DARIAS, V.; ARIAS, A. Antimicrobial activity of *Visnea mocanera* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 115-119, 1994.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HONDA, P. A.; FERREIRA, I. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; AMADO, C. A. B.; SILVEIRA, T. G. V.; BREZAN, M. A.; LONARDONI, M. V. C. Efficacy of componentes from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonenses*, **Phytomedicine**, v. 17, p. 333-338, 2010.

HU, Q.; HUH, Y.; XU, J. Free radical-scavenging activity of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.85-90, 2005.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M. C.; ABE, F.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 9, p. 1471-1475, setembro, 2004.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M. C.; LOZADA, L. JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, México, v.27, n. 6, p. 916-920, 2004.

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

ISAIAS, D. E.; NIERO, R.; NOLDIN, V. F.; CAMPOS-BUZZI, F. YUNES, R. A.; DELLE-MONACHE, F. CECHINEL-FILHO, V. Pharmacological and phytochemical investigation os different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). **Pharmazie**, v. 59, n. 11, p. 879-881, novembro, 2004.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL-FILHO, V.; ENJO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliensis*: Structure of Three New Coumarins and Cancer Chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 66, n. 3, p. 368-371, 2003.

- ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL-FILHO, V.; MUKAIANAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliensis*: Structure Elucidation of Seven New and Their Cancer Chemopreventive Activity. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 65, n. 3, p. 267-272, 2002.
- ITOIGAWA, M.; ITO, C.; TAN, H.T.W.; KUCHIDE, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive agents 4- phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. **Cancer Letters**, v. 169, p. 15-19, 2001.
- KASHMAN, Y.; GUSTAFSON, K. R.; FULLER, R. W.; CARDELLINA, J. H.; MCMAHON, J. B.; CURRENS, M. J.; BUCKHEIT, R. W.; HUGHES, S. H.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. The Calanolides, a Novel HIV-Inhibitory Class of Coumarin Derivatives from the Tropical Rainforest Tree, *Calophyllum lanigerum*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 2735-2743, 1992.
- KHAJEH, M.; YAMINI, Y.; SEFIDKON, F.; BAHRAMIFAR, N. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. **Food Chemistry**, v. 86, p. 587-591, 2004.
- KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Calophyllum soulattri*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 741-743, 2002.
- KIJOA, A.; GONZALEZ, M. J.; AFONSO, C. M.; PINTO, M. M. M.; ANANTACHOKE, C.; SILVA, A. M. S.; HERZ, W. Xanthones from *Calophyllum teysmannii* var. inophylloide. **Phytochemistry**, v. 55, p. 833-836, 2000.
- KÖHLER, T.; PECHÈRE, J. C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 771-778, 1999.
- LEWIS, W. H. **Medical botany** – Plants affecting man's health. John Wiley & Sons, New York. 1977.
- LOIK, M. E.; HOLL, K. D. Photosynthetic responses to light for rain forest seedlings planted in abandoned pasture, Costa Rica. **Restoration Ecology**, Malden, v. 7, n. 4, p. 382-391, 1999.
- LORENZI, H. *Calophyllum brasiliense* In: LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992, 352p.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum. São Paulo: Nova Odessa, 2002.
- LOULI, V.; FOLAS, G.; VOULTAS, E.; MAGOULAS, K. Extraction of parsley seed oil by supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 30, p. 163-174, 2004.
- MACKEE, T. C.; COVINGTON, C. D. Pyrano coumarins from tropical species of the genus *Calophyllum*: a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute Collection. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1252-1256, 1998.
- 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, p. 1057-1063, 2003.

MARQUES, M. C. M.; JOLY, C. A. Estrutura e dinâmica de uma população de *Calophyllum brasiliense* Camb. em floresta higrófila do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 107-112, 2000.

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

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**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MEIRELES, M. A. A. **Extracting bioactive compounds for foods product: theory and applications**. CRC press, 2009.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid process desing data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, p. 321-330, 2003.

MESÍA-VELA, S.; SANCHEZ, R. I.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; ALAVEZ-SOLANO, D.; TORRES-SOSA, C.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R.; KAUFFMAM, F. C. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: novel inhibitors of sulfotransferases, SULT 1A1 and SULT 2A1. **Phytomedicine**, Jena, v. 8, n. 6, p. 481-488, 2001.

MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANIB, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p.131-138, 2005.

MOREL, C.; SERAPHIN, J.; OGER, J.M.; LITAUDON, M.; SEVENET, T.; RICHOMMME, P.; BRUNETON, J. New xanthones from *Calophyllum caledonicum*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1471-1474, 2000.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 33, p. 1831-1836, 1989.

NIKAIDO, H. Prevention of drugs acess to bacterial targets: permeability barrier and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382-388, 1994.

OJALA, T.; REMES, S.; HAANSUU, P.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; HAAHTELA, K.; VUORELA, P. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 299-305, 2000.

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, p. 1104-1117, 2011.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; EGGLESTON, D. S.; HALTIWANGER, R. C.; BEAN, M. F.; TAYLOR, M. J. C., BREEN, A. L.; BARTUS, H. R.; JOHNSON, R. K.; HETZBERG, R. P.; WESTLEY, J. W. The Inophyllums, Novel Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase Isolated from the Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 36, n. 26, p. 4131-4138, Dec. 1993.

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

- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PIOTTO, D.; MONTAGNINI, F.; UGALDE, L.; KANNIEN, M. Growth and effects of thinning of mixed and pure plantations with native trees in humid tropical Costa Rica. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 177, n. 1-3, p. 427-439, 2003.
- POOLE, K. Bacterial multidrug resistance emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 34, p. 453-456, 1994.
- PRETTO, J. B.; CECHINEL-FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R.; ISAIAS, D. E.; CRUZ, A. B. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Journal Naturforsch**, v. 59, n. 9-10, p. 657-662, Sep-Oct. 2004.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- 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**, v. 8, n. 5, p. 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, p. 951-958, 1989.
- REVERCHON, E.; MARRONE, C.. Modeling and simulation of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of vegetable oils. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, p. 161-175, 2001
- REVERCHON, E.; MARRONE, C. Supercritical extraction of clove bud essential oil: Isolation and mathematical modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 52, p. 3421-3428, 1997.
- REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; APAN, T. R.; AMEKRAZ, B.; AUMELAS, A.; JANKOWSKI, C. K.; VÁZQUEZ-TORRES, M. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. **Life Sciences**, México, v. 75, p. 1635-1647, 2004.
- REYES-CHILPA, R.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; ESTRADA-MUÑIZ. Antifungal Xanthones from *Calophyllum brasiliensis* Heartwood. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 7, p. 1901-1911, 1997.
- REYNERTSON, K.A.; BASILE, M. J. B.; KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 3, p. 25-35, 2005.
- RUTTER, R.A. **Catálogo de Plantas Útiles de la Amazonia Peruana**. Yarinacocha: Instituto Lingüístico de Verano, 1990, 349 p.
- SARTORI, N. T.; CANAPELLE, D.; DE SOUSA JR, P. T.; MARTINS, D. T. O. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliensis* Camb. Bark on experimental gastric lesions in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 67, p. 149-156, 1999.

- SARTORI, M. R. K.; PRETTO, J. B.; BELLA CRUZ, A.; BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S. A.; CECHINEL FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Pharmazie**, v. 58, p. 567-569, 2003.
- SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**, 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.
- SAUCEAU, M.; LETOURNEAU, J. J.; FREISS, B.; RICHON, D.; FAGES, J. Solubility of eflucimible in supercritical carbon dioxide with and without a co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 31, p. 133-140, 2004.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis:UFSC, 2003. cap.15, p. 371-400.
- 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.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.
- SIHVONEN, M.; JÄRVENPÄÄ, E.; HIETANIEMI, V.; HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide Technologies. **Trends in Food Science & Technology**. v. 10, p. 217-222, 1999.
- SILVA, K. L.; SANTOS, A. R.; MATTOS, P. E.; YUNES, R. A.; DELLEMONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. **Therapie**, Stuttgart, v. 56, n. 4, p. 431-434, 2001.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: UFRGS. 2000
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIEO, 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**, v. 82, p. 1107-1118, 1990.
- SKOOG, D.A.; LEARY, J.J., **Principles of Instrumental Analysis**. 4th ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, 1995, p. 670-671.
- SOMCHIT, M.N.; REEZAL, I.; NUR, I.E.; MUTALIB, A. R. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 1-4, 2003.



- 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**, v. 47, p. 182-187, 2008.
- SOUZA, M. C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; REAL, V. V.; SANTOS, R. A. N.; RAO, V. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T.O. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* of *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 452-458, 2009.
- SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 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, p. 409-414, 1994.
- STEVENS, P. F. A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 61, p. 117-699, 1980.
- TAN, C.; LIOU, D. Modeling of desorption at supercritical conditions. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 35, p. 1029-1031, 1989.
- TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2 ed. Atheneu: São Paulo, 1999. 792 p.
- VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 51, p. 1067 – 1077, 2003.
- VASQUEZ, M. R. **Useful plants of Amazonian Peru**. Filled with USDA's National Agricultural Library Ed. 1990.
- VIEIRA, A. R. R.; FEISTAUER, D.; SILVA, V. P. Adaptação de espécies arbóreas nativas em um sistema agrossilvicultural, submetidas a extremos climáticos de geada na região de Florianópolis. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 627-634, 2003.
- YASUNAKA, K.; ABE, F.; NAGAYAMA, A. OKABE, H.; LOZADA-PÉREZ, L.; LÓPEZ-VILLAFRANCO, E.; MUNIZ, E. E.; AGUILAR, A. REYES-CHILPA, R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 293-299, 2005.
- ZANCAN, K. C.; M. O. M. MARQUES, A. J.; PETENATE; MEIRELES, M.A.A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO<sub>2</sub> and co-solvents: A study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 57-76, 2002.
- ZENTSCH, W.; DIAZ, Y. Investigations on the germination of *Calophyllum brasiliense*. **Beitr. Forstwirtschaft**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 73-74, 1977.
- ZHANG, Z. Z.; ELSOHLY, H. N.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. **Planta Médica**, v. 68, n. 1, p. 49-54, 2002.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

ZOZEL, K. **Process for recovering caffeine.** U.S. Patent No. 03806619. 1974.