

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* Miller): UMA ABORDAGEM COMPARATIVA E MODELAGEM MATEMÁTICA**

**ISABELA CRISTINA PORTO ASSUMPÇÃO**

**2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* Miller): UMA ABORDAGEM COMPARATIVA E MODELAGEM MATEMÁTICA**

**ISABELA CRISTINA PORTO ASSUMPÇÃO**

*Sob a Orientação da Professora Dr<sup>a</sup>.*

**Marisa Fernandes Mendes**

*e Coorientação do Dr.*

**Leonardo Lucchetti Caetano da Silva**

Dissertação submetida como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química,  
Área de concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ

2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca  
Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A851a      Assumpção, Isabela Cristina Porto, 23/04/1996-  
                 Avaliação da Extração do Óleo de Ora-pro-nóbis  
                 (*Pereskia aculeata* Miller): Uma Abordagem Comparativa  
                 e Modelagem Matemática. / Isabela Cristina Porto  
                 Assumpção. - Rio de Janeiro, 2023.  
                 138 f.: il.

Orientadora: Marisa Fernandes Mendes.  
Coorientador: Leonardo Lucchetti Caetano da Silva.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia Química, 2023.

1. Extração com fluido supercrítico. 2. Plantas  
medicinais. 3. Potencial antitumoral. I. Mendes,  
Marisa Fernandes, 1972-, orient. II. Silva, Leonardo  
Lucchetti Caetano da, 1970-, coorient. III  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV.  
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ISABELA CRISTINA PORTO ASSUMPÇÃO**

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de concentração em Tecnologia Química.

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/08/2023**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Fernandes Mendes

(Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ) (Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane de Souza Siqueira Pereira

(Universidade de Vassouras)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Ferreira da Silva Lírio

(IFRJ)



*Emitido em 2023*

**TERMO N° 1220/2023 - PPGEQ (12.28.01.00.00.00.42)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 09/11/2023 10:49 )*

MARISA FERNANDES MENDES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
PPGEQ (12.28.01.00.00.00.42)  
Matrícula: ###224#2

*(Assinado digitalmente em 13/11/2023 21:08 )*

CLÁUDIA FERREIRA DA SILVA LIRIO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.557-##

*(Assinado digitalmente em 20/11/2023 00:41 )*

CRISTIANE DE SOUZA SIQUEIRA PEREIRA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.077-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **1220**, ano: **2023**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **09/11/2023** e o código de verificação: **9b0fda06bf**

*“...o coração não é tão frívolo, tão exterior, tão carnal, quanto se cuida. Há, nele, mais que um assombro fisiológico: um prodígio moral. E o órgão da fé, o órgão da esperança, o órgão do ideal. Vê, por isso, com os olhos d'alma, o que não veem os do corpo. Vê ao longe, vê em ausência, vê no invisível, e até no infinito vê. Onde para o cérebro de ver, outorgou-lhe o Senhor que ainda veja; e não se sabe até onde. Até onde chegam as vibrações do sentimento, até onde se perdem os surtos da poesia, até onde se somem os voos da crença: até Deus mesmo, invisível como os panoramas íntimos do coração, mas presente ao céu e à terra, a todos nós presentes, enquanto nos palpita, incorrupto, no seio, o músculo da vida e da nobreza e da bondade humana...”*

*Rui Barbosa – Oração ao Moços*

*Dedico esta dissertação à Elizabeth Alves Cardoso  
Assumpção (in memorian).*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, pelo dom da minha vida e por todas as benções concedidas. Por ter me permitido chegar mais longe do que teria sido possível imaginar, por ter me guiado além dos limites da minha fé e me auxiliado a vencer as dificuldades encontradas pelo caminho. A Ti pertence também esta vitória “pois dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas.”

Aos meus amados pais, Jaqueline e Vanderlei, alicerces da minha vida, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para viabilizar as condições que tornaram possíveis todas as conquistas que obtive. Não se pode construir uma fortaleza sobre a areia movediça; obrigada por serem a base forte onde eu posso me erguer. Ao meu irmão, Carlos Eduardo, por ser meu exemplo de hombridade e resiliência. À minha família, por serem mais do que eu poderia pedir. Sem o apoio e carinho de vocês eu nada seria.

Ao meu esposo, Rodrigo Borges, por seu amor, compreensão e suporte sem medidas. Obrigada por ter me fortalecido nos momentos de fraqueza, por ter compreendido minhas ausências e por ter dividido comigo seu conhecimento. Sou grata por não ter me deixado desistir e por acreditar em minha capacidade quando eu mesma julguei impossível. Agradeço a Deus sempre por tê-lo em minha vida. Amo-te sem ressalvas.

Aos meus amigos, Jamille Teraoka, Beatriz Salamon, Diego Gonçalves, Bárbara Aceti, Erick Morais e Maky Yudi por se divertirem com meus desesperos e por torcerem pelo meu sucesso. Ao Vinícius Costa, que compartilhou comigo todas as dificuldades do mestrado e foi fundamental para a conclusão dessa etapa. Aos meus tantos outros amigos que eu não seria capaz de nominar aqui, mas que sabem terem sido essenciais para essa conquista. Vocês são os melhores amigos que eu poderia ter.

À minha orientadora, Marisa Mendes, que também se tornou uma amiga, pela paciência, pelas broncas e sugestões; por compartilhar comigo sua sabedoria e me direcionar sempre no caminho da excelência. Ao meu coorientador, Leonardo Lucchetti, pela parceria, pelas conversas enriquecedoras e por toda a contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Dr. André Luiz Franco Sampaio e ao Laboratório de Farmacologia Molecular pela parceria na realização dos experimentos.

Ao grupo do LTAB, em especial à Renata Vilas Bôas, com quem tive o prazer de trabalhar e sempre torceu por meu sucesso. Aos alunos de iniciação científica, Edison Ribeiro e Isaias Surgek, por terem me auxiliado com a execução da pesquisa.

Ao meu *Dream Team*, por apesar das muitas demandas, tornarem os dias de trabalho mais leves e animados. Em especial, ao meu chefe, Chad Wyble, e ao meu amigo, Monthat Suwannakarn, por terem me dado o suporte necessário na reta final do mestrado.

À Elita Scio e seu esposo, pela doação das folhas de ora-pro-nóbis e pela recepção amigável em seu sítio, em Minas Gerais.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da concretização desse sonho. Obrigada! “Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade.”

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. *This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.*

## RESUMO

ASSUMPÇÃO, Isabela Cristina Porto. **Avaliação da Extração do Óleo de Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller): Uma Abordagem Comparativa e Modelagem Matemática.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A *Pereskia aculeata* Miller, também conhecida como ora-pro-nóbis, é uma planta rica em proteínas que integra as PANC (Plantas Alimentícias Não-Convencionais). Ela contém compostos fenólicos, fitosteróis, flavonoides e terpenos, associados a diversos potenciais biológicos, como antioxidante, anticancerígeno e outros. De forma a promover a extração seletiva dos compostos de interesse, a extração supercrítica vem sendo estudada como uma alternativa às técnicas de extração convencionais, baseadas no uso de solventes, devido a sua alta seletividade e obtenção de extratos puros. Todavia, trabalhos na literatura envolvendo essa espécie ainda são raros e, com isso, o presente trabalho teve como objetivo empregar a extração com dióxido de carbono supercrítico para obter extratos de alto valor agregado a partir do óleo essencial de ora-pro-nóbis e investigar a ação antitumoral da espécie. O CO<sub>2</sub> foi empregado como fluido supercrítico e os experimentos foram conduzidos em diferentes condições (200 – 500 bar, 40 – 60 °C), segundo um planejamento do tipo DCCR. Para isso, 10 g de folhas de secas e moídas foram alimentadas a um extrator, o qual foi conectado a uma bomba de alta pressão e um banho termostático. O maior rendimento da extração com CO<sub>2</sub> supercrítico foi obtido para a condição de 456 bar e 74 °C, de 0,23%, enquanto as técnicas de maceração dinâmica, Soxhlet e ultrassom com hexano tiveram rendimentos de 8,5%, 7,47% e 2,4%, na ordem. Foi identificada a presença de hidrocarbonetos nos extratos e, em menor fração, terpenos, flavonoides e fitosteróis como fitol, lupeol, taraxerol e sitosterol. As amostras de maior rendimento foram submetidas a um ensaio *in vitro* para avaliação do potencial antitumoral contra linhagens de câncer de pulmão (A549), leucemia (K562) e câncer de mama (MCF7). Embora nenhuma amostra tenha demonstrado atividade antitumoral significativa, os melhores resultados foram obtidos sob as condições de 244 bar e 46 °C, e 456 bar e 46 °C, com concentração de 150 µg/mL. O processo de extração foi modelado aplicando os modelos de Brunner (1984), Sovová (1994), Esquível *et al.* (1999), Reverchon e Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003). A solubilidade do óleo foi avaliada pelos modelos de Chrastil (1982), del Valle e Aguilera (1988), Adachi e Lu (1983) e Gordillo *et al.* (1999). Para o estudo cinético, o modelo de Sovová (1994) foi o que melhor representou o processo de extração, enquanto o modelo de Gordillo *et al.* (1999) forneceu o melhor ajuste para os dados de solubilidade. Os resultados da simulação para separação dos constituintes do óleo mostrou que, ao empregar 3 flashes associados em série, nas condições de 150 bar e 80 °C, 600 bar e 40 °C e 80 bar e 40 °C foi possível obter correntes enriquecidas com estigmasterol (99,21%), 2,4-ditercbutilfenol (71,92%) e ácido palmítico (27,12%), a partir de uma alimentação equimolar de fitol, β-sitosterol, estigmasterol, 2,4-ditercbutilfenol, taraxerol e ácido palmítico.

**Palavras-Chave:** extração com fluido supercrítico, plantas medicinais, potencial antitumoral.

## ABSTRACT

ASSUMPÇÃO, Isabela Cristina Porto. **Evaluation of Barbados gooseberry Oil Extraction (*Pereskia aculeata* Miller) A Comparative Approach and Mathematical Modeling.** Dissertation (Master's in Chemical Engineering, Chemical Technology). Technology Institute, Chemical Engineering Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

*Pereskia aculeata* Miller, also known as Barbados gooseberry, is a protein-rich plant that belongs to the group of NCFP (Non-Conventional Food Plants). It contains phenolic compounds, phytosterols, flavonoids, and terpenes, associated with various biological potentials such as antioxidant and anticancer properties, among others. In order to promote the selective extraction of the target compounds, supercritical extraction has been studied as an alternative to conventional solvent-based extraction techniques due to its high selectivity and ability to obtain pure extracts. However, literature on studies involving this species remains scarce, thus, the present work aimed to employ supercritical carbon dioxide extraction to obtain high-value extracts from the essential oil of Barbados gooseberry and investigate the species' antitumor action. CO<sub>2</sub> was used as the supercritical fluid, and experiments were conducted under various conditions (200 – 500 bar, 40 – 60 °C), following a CCRD design of experiments approach. For this purpose, 10 g of dried and ground leaves were fed into an extractor, connected to a high-pressure pump and a thermostatic bath. The highest yield of supercritical CO<sub>2</sub> extraction was achieved under the conditions of 456 bar and 74 °C, yielding 0.23%. In comparison, dynamic maceration, Soxhlet, and ultrasound techniques with hexane yielded 8.5%, 7.47%, and 2.4%, respectively. Hydrocarbons were identified in the extracts, along with a smaller fraction of terpenes, flavonoids, and phytosterols such as phytol, lupeol, taraxerol, and sitosterol. The samples with the highest yields were subjected to *in vitro* assays to evaluate their potential antitumor activity against lung cancer (A549), leukemia (K562), and breast cancer (MCF7) cell lines. While no sample exhibited significant antitumor activity, the best results were obtained under the conditions of 244 bar and 46 °C, and 456 bar and 46 °C, with a concentration of 150 µg/mL. The extraction process was modeled by applying the models of Brunner (1984), Sovová (1994), Esquivel *et al.* (1999), Reverchon and Osseo (1994), and Zeković (2003). As for solubility studies, the models of Chrastil (1982), del Valle and Aguilera (1988), Adachi and Lu (1983), and Gordillo *et al.* (1999) were evaluated. In the kinetic study, Sovová's model (1994) best represented the extraction process, while Gordillo *et al.*'s model (1999) provided the best fit for the solubility data. The simulation results for the separation of the constituents of the oil showed that by employing 3 sequentially connected flash units under the conditions of 150 bar and 80 °C, 600 bar and 40 °C, and 80 bar and 40 °C, it was possible to obtain streams enriched with stigmasterol (99,21%), 2,4-diterc-butylphenol (71,92%), and palmitic acid (27,12%) from an equimolar feed of phytol, β-sitosterol, stigmasterol, 2,4-diterc-butylphenol, taraxerol, and palmitic acid.

**Keywords:** supercritical fluid extraction, medicinal plants, antitumor potential.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição geográfica mundial da <i>P. aculeata</i> Mill. Adaptado de CABI (2022). .9
<b>Figura 2</b> – Distribuição geográfica da ora-pro-nóbis no Brasil. Adaptado de SiBBr (2021). .10
<b>Figura 3</b> – Arbustos de ora-pro-nóbis. Fonte: Próprio autor. ....11
<b>Figura 4</b> – Folhas e flores (a) e frutos (b) de OPN. Adaptado de Egea e Pierce (2021). ....12
<b>Figura 5</b> – Folhas de ora-pro-nóbis in natura, secas e moídas. Fonte: Próprio autor. ....30
<b>Figura 6</b> – Esquema representativo da unidade de extração supercrítica. Fonte: Próprio autor. ....33
<b>Figura 7</b> – Etapas do processo de extração supercrítica. Adaptado de SILVA et al. (2016)...39
<b>Figura 8</b> – Fluxograma simplificado do processo de extração e separação supercrítica do software DWSIM. ....49
<b>Figura 9</b> – Curvas cinéticas para todas as condições experimentais. ....54
<b>Figura 10</b> – Curvas cinéticas de extração para as condições de 200, 350 e 500 bar a 60°C. ..54
<b>Figura 11</b> – Curvas cinéticas de extração para as condições de 456 e 244 bar a 46°C. ....55
<b>Figura 12</b> – Curvas cinéticas de extração para as condições de 46 e 244 bar a 74°C. ....55
<b>Figura 13</b> – Curvas cinéticas de extração para as condições de 74 e 46 °C a 456 bar. ....56
<b>Figura 14</b> – Curvas cinéticas de extração para as condições de 46 e 74 °C a 244 bar. ....56
<b>Figura 15</b> – Curvas cinéticas de extração para as condições de 40, 60 e 80 °C a 350 bar. ....57
<b>Figura 16</b> – Gráfico de Pareto para a análise dos fatores do modelo de regressão (rendimento) obtidos pelo planejamento DCCR, considerando 95% de confiança. ....62
<b>Figura 17</b> – Curva de nível do modelo de regressão proposto para correlacionar pressão, temperatura e o rendimento da extração. ....63
<b>Figura 18</b> – Superfície de resposta do modelo de regressão proposto para correlacionar pressão, temperatura e o rendimento da extração. ....64
<b>Figura 19</b> – Ensaio de inibição do crescimento para a linhagem A549 (câncer de pulmão)...65
<b>Figura 20</b> – Ensaio de inibição do crescimento para a linhagem K562 (leucemia). ....66
<b>Figura 21</b> – Ensaio de inibição do crescimento para a linhagem MCF7 (câncer de mama). ..66
<b>Figura 22</b> – Ajuste do modelo de Sovová (1994) para as condições de 350 bar e 40 °C e 200 bar e 60 °C. ....72
<b>Figura 23</b> – Ajuste do modelo de Esquível et al. (1999) para as condições de 350 bar e 40 °C e 200 bar e 60 °C. ....75
<b>Figura 24</b> – Ajuste do modelo de Brunner (1984) para a condição de 456 bar e 46 °C....76

<b>Figura 25</b> – Ajuste do modelo de Reverchon e Osseo (1994) para a condição de 200 bar e 60 °C.	79
<b>Figura 26</b> – Ajuste do modelo de Zeković et al. (2003) para a condição de 200 bar e 60 °C.	79
<b>Figura 27</b> – Solubilidade experimental do óleo de ora-pro-nóbis em CO <sub>2</sub> -SC para todas as condições experimentais.	81
<b>Figura 28</b> – Gráfico de Pareto para a análise dos fatores do modelo de regressão (solubilidade) obtidos pelo planejamento DCCR, considerando 95% de confiança.	84
<b>Figura 29</b> – Curva de nível do modelo de regressão proposto para correlacionar pressão, temperatura e a solubilidade.	86
<b>Figura 30</b> – Superfície de resposta do modelo de regressão proposto para correlacionar pressão, temperatura e a solubilidade.	86
<b>Figura 31</b> – Fluxograma simplificado para a separação de constituintes do óleo de ora-pro-nóbis. Fonte: Próprio autor.	90
<b>Figura 32</b> – Ajuste do Modelo de Sovová (1994) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.	113
<b>Figura 33</b> – Ajuste do Modelo de Esquível et al. (1999) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.	113
<b>Figura 34</b> – Ajuste do Modelo de Zeković et al. (2003) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.	114
<b>Figura 35</b> – Ajuste do Modelo de Reverchon e Osseo (1994) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.	114
<b>Figura 36</b> – Ajuste do Modelo de Brunner (1984) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.	115
<b>Figura 37</b> – Ajuste do Modelo de Sovová (1994) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.	115
<b>Figura 38</b> – Ajuste do Modelo de Esquível et al. (1999) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.	116
<b>Figura 39</b> – Ajuste do Modelo de Zeković et al. (2003) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.	116
<b>Figura 40</b> – Ajuste do Modelo de Reverchon e Osseo (1994) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.	117
<b>Figura 41</b> – Ajuste do Modelo de Brunner (1984) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.	117

<b>Figura 42</b> – Ajuste do Modelo de Sovová (1994) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.	118
<b>Figura 43</b> – Ajuste do Modelo de Esquível et al. (1999) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.	118
<b>Figura 44</b> – Ajuste do Modelo de Zeković et al. (2003) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.	119
<b>Figura 45</b> – Ajuste do Modelo de Reverchon e Osseo (1994) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.	119
<b>Figura 46</b> – Ajuste do Modelo de Brunner (1984) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.	120

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Os tipos de câncer mais incidentes no ano de 2018 .....	5
<b>Tabela 2</b> – Classificação Taxonômica da <i>Pereskia aculeata</i> Mill. ....	8
<b>Tabela 3</b> – Principais classes, constituintes e potenciais biológicos dos metabólitos isolados presentes nos extratos de ora-pro-nóbis.....	13
<b>Tabela 4</b> - Planejamento de experimentos com condições operacionais (pressão e temperatura) expressas em variáveis codificadas e independentes. ....	34
<b>Tabela 5</b> – Correlação entre variáveis independentes e codificadas.....	35
<b>Tabela 6</b> – Características da matéria-prima vegetal .....	50
<b>Tabela 7</b> – Rendimento das extrações por maceração dinâmica, ultrassom e Soxhlet. ....	51
<b>Tabela 8</b> – Condições operacionais, densidade do solvente, massa de óleo extraída, rendimentos e tempos de extração para a extração de OPN com CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	53
<b>Tabela 9</b> – Resultados do teste ANOVA para o rendimento. ....	61
<b>Tabela 10</b> – Parâmetros estimados para o modelo de regressão (rendimento). ....	63
<b>Tabela 11</b> – Condições operacionais, densidade do CO <sub>2</sub> -SC, parâmetros estimados para o modelo de Sovová (1994) e DRM%.....	71
<b>Tabela 12</b> – Condições operacionais, densidade do CO <sub>2</sub> -SC, parâmetros estimados para o modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999) e DRM%.....	74
<b>Tabela 13</b> – Condições operacionais, parâmetros estimados para o modelo de Brunner (1984) e DRM%.....	76
<b>Tabela 14</b> – Condições operacionais, parâmetros estimados para o modelo de Reverchon e Osseo (1994) e DRM%.....	77
<b>Tabela 15</b> – Condições operacionais, parâmetros estimados para o modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003) DRM%.....	78
<b>Tabela 16</b> – Dados de solubilidade para cada condição experimental. ....	80
<b>Tabela 17</b> – Resultados do teste ANOVA para a solubilidade. ....	84
<b>Tabela 18</b> – Parâmetros estimados para o modelo de regressão (solubilidade). ....	85
<b>Tabela 19</b> – Solubilidade experimental e calculada pelos modelos de Chrastil (1982), del Valle e Aguilera (1988), Adachi e Lu (1983) e Gordillo <i>et al.</i> (1999) para todas as condições experimentais e seus desvios relativos. ....	88
<b>Tabela 20</b> – Parâmetros estimados para cada um dos modelos de solubilidade e seus respectivos desvios relativos médios. ....	88

<b>Tabela 21</b> – Composição da corrente de alimentação, correntes de topo e fundo para o flash 1 (150 bar e 80 °C).....	90
<b>Tabela 22</b> – Composição da corrente de alimentação, correntes de topo e fundo para o flash 2 (600 bar e 40 °C).....	91
<b>Tabela 23</b> – Composição da corrente de alimentação, correntes de topo e fundo para o flash 3 (80 bar e 40 °C).....	91
<b>Tabela 24</b> – Tentativa de identificação dos componentes presentes em diferentes extratos de ora-pro-nóbis com seus respectivos tempos de retenção (tr) e quantificação (área %). .....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CABI	<i>Centre of Agriculture and Biosciences International</i>
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>2</sub> -SC	Dióxido de carbono supercrítico
DRM	Desvio Relativo Médio
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EFSC	Extração por Fluido Supercrítico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSC	Fluido supecrítico
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MM	Massa Molecular
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPN	Ora-pro-nóbis
OPN-MD	Extrado produzido por Maceração Dinâmica
OPN-SO	Extrato produzido por Soxhlet
OPN-US	Extrato produzido por Ultrassom
PANC	Plantas Alimentícias Não Convencionais
P <sub>c</sub>	Pressão crítica
P <sub>vap</sub>	Pressão de vapor
SiBBr	Sistemas de Informações sobre a Biodiversidade Brasileira
T <sub>c</sub>	Temperatura crítica
TEB	Taxa de Extração Baixa
TEC	Taxa de Extração Constante
TEQ	Taxa de Extração em Queda
TM	Transferência de Massa
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Plantas Medicinais .....	3
2.2. Câncer no Brasil e no Mundo: Característica e Estatísticas .....	4
2.3. Plantas brasileiras com ação anticancerígena .....	6
2.4. <i>Pereskia acuelata</i> Miller .....	8
2.4.1. Descrição botânica.....	11
2.4.2. Perfil fitoquímico.....	12
2.5. Métodos de Extração.....	14
2.5.1. Métodos Convencionais .....	15
2.5.1.1. Uso de Técnicas Convencionais na Extração do Óleo de Ora-pro-nóbis .....	16
2.5.2. Extração Supercrítica.....	19
2.5.2.1. Fatores que Influenciam no Processo de Extração .....	22
2.5.2.2. Uso do Fluido Supercrítico na Extração do Óleo da Ora-pro-nóbis .....	22
2.6. Potencial Antitumoral dos Extratos de Ora-pro-nóbis .....	25
2.7. Considerações .....	27
3.1. Materiais.....	29
3.1.1. Material vegetal .....	29
3.1.2. Solventes.....	29
3.2. Métodos.....	29
3.2.1. Pré-tratamento das Folhas de Ora-pro-nóbis .....	29
3.2.2. Determinação da densidade aparente e porosidade do leito .....	30
3.2.3. Extração com Soxhlet .....	31
3.2.4. Maceração.....	31
3.2.5. Extração por Ultrassom .....	32
3.2.6. Extração com Fluido Supercrítico .....	32

3.2.6.1. Aparato Experimental .....	32
3.2.6.2. Planejamento de Experimentos.....	33
3.2.7. Rendimentos .....	35
4.2.8. Solubilidade .....	36
3.2.9. Métodos de Análise dos Extratos .....	37
3.2.9.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) .....	37
3.2.9.2. Ensaios de viabilidade celular .....	37
<b>4. MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1. Modelagem cinética .....	39
4.1.1. Brunner (1984) .....	40
4.1.2. Sovová (1994) .....	41
4.1.3. Reverchon e Osseo (1994) e Zeković <i>et al.</i> (2003).....	43
4.1.4. Esquível <i>et al.</i> (1999) .....	44
4.2. Solubilidade .....	45
5.2.1. Solubilidade Experimental .....	45
4.2.2. Modelos de solubilidade .....	45
4.2.2.1. Chrastil (1982) .....	46
4.2.2.2. Adachi e Lu (1983) .....	46
4.2.2.3. del Valle e Aguilera (1988) .....	47
4.2.2.4. Gordillo <i>et al.</i> (1999) .....	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>50</b>
5.1. Caracterização da matéria-prima .....	50
5.2. Extrações convencionais .....	51
5.3. Extração com CO <sub>2</sub> Supercrítico .....	52
5.4. Caracterização dos Extratos .....	58
5.6. Teste de Atividade .....	65
5.7. Modelagem Cinética .....	70

5.8. Solubilidade Experimental.....	80
5.9. Análise Estatística da Solubilidade .....	83
5.10. Modelos de Solubilidade.....	87
5.11. Simulação.....	89

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde mundial que afeta milhões de pessoas anualmente e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2018 foram constatados 18,1 milhões de novos casos da doença e 9,6 milhões de mortes, representando 1 em cada 6 óbitos. As projeções indicam que, até 2040, o número de novos casos por ano deve atingir os 29,4 milhões, tendo maior impacto nas regiões de baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), devido à precariedade dos serviços de saúde. Outro fator agravante para o combate ao câncer é que as terapias atualmente empregadas (antineoplásicas) apresentam diversos efeitos colaterais, dada a baixa seletividade do tratamento, que afeta não apenas as células tumorais, mas também as saudáveis.

Nesse contexto, é necessário ampliar as opções terapêuticas aos pacientes, de modo que o uso de plantas medicinais com ação anticancerígena proporcione melhoria do acesso à saúde de forma segura para a população. Dessa forma, a OMS reconhece o manejo de plantas medicinais desde a década de 90, e o Brasil estimula a bioprospecção de espécies vegetais por meio da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, cujo objetivo é garantir à população brasileira o acesso seguro e racional de plantas medicinais pelo emprego sustentável da biodiversidade nacional.

A literatura contém resultados da ação anticancerígena de diversas espécies vegetais típicas do Brasil, como *Aloe vera*, *Curcuma longa* e *Ruta graveolens L.* (RIBEIRO *et al.*, 2017) Para o presente trabalho, optou-se por trabalhar com a espécie *Pereskia aculeata*, uma vez que a planta é de alta disponibilidade, baixo custo e, portanto, amplamente acessível para a população. Além disso, a literatura mostra que o perfil fitoquímico da planta abrange compostos como flavonoides e terpenos, os quais são largamente associados à ação anticancerígena (PINTO e SCIO, 2014).

A *Pereskia aculeata* Miller, comumente chamada ora-pro-nóbis (OPN) ou “carne dos pobres”, devido ao seu elevado teor proteico, é uma planta da família Cactaceae originária da América Tropical. No Brasil, as ocorrências mais comuns são nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, geralmente em ecossistemas associados à Mata Atlântica, como restingas e matas de brejo. A OPN integra as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), as quais são espécies com potencial alimentício utilizadas localmente, não sendo consumidas em larga escala. Além do uso nutricional da planta, pesquisas têm sido desenvolvidas visando associar o emprego dos

extratos produzidos a partir das folhas de OPN a diversas atividades biológicas, incluindo ação anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticonceptiva, cicatrizante e antitumoral.

O grupo de pesquisa tem estudado o uso da técnica de extração supercrítica como uma alternativa viável, por não necessitar do uso de solventes orgânicos, permitir a obtenção do extrato puro e apresentar elevada seletividade. Desse modo, tornam-se necessários estudos acerca da extração do óleo de *P. aculeata* usando fluido supercrítico, visto que ainda há uma escassez de trabalhos científicos relacionados ao tema.

Nesse cenário, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a extração supercrítica usando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) do óleo de *Pereskia aculeata* Mill., a fim de avaliar o potencial antitumoral da espécie a partir da investigação dos compostos bioativos presentes no extrato de ora-pro-nóbis. Para isso, alguns objetivos específicos foram definidos, tais como:

- Realizar uma comparação entre a extração por fluido supercrítico e os métodos convencionais (Soxhlet, maceração dinâmica e ultrassom);
- Caracterizar o óleo extraído por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas a fim de identificar o perfil fitoquímico do extrato;
- Realizar o estudo estatístico do processo de extração, avaliando a influência das variáveis temperatura e pressão na cinética da extração por fluido supercrítico;
- Estudar a modelagem matemática do processo de extração quanto aos aspectos cinéticos e de solubilidade, empregando diversos modelos e
- Analisar a correlação entre os compostos bioativos presentes no extrato quanto às suas atividades biológicas, via ensaio de atividade antiproliferativa usando diferentes linhagens tumorais.

A dissertação está dividida em 6 capítulos. O Capítulo II aborda a revisão bibliográfica sobre a ora-pro-nóbis, incluindo suas características, descrição botânica, potenciais biológicos e composição química e técnicas de extração utilizadas para o preparo dos extratos de ora-pro-nóbis. No Capítulo III, são descritos os materiais e métodos utilizados, desde a coleta e pré-tratamento da planta até os métodos de extração empregados, análises químicas e cromatográficas, e ensaios de atividade. O Capítulo IV apresenta a modelagem matemática do processo de extração, abrangendo o estudo cinético, de solubilidade e simulação. Os resultados e discussões obtidos são apresentados no Capítulo V e as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros estão no Capítulo VI.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica acerca das plantas medicinais, salientando a importância de seu uso como alternativa viável para o combate contra diversas doenças. A seguir, aprofunda-se a discussão sobre a espécie *Pereskia aculeata* Miller, estudada no presente trabalho, explorando suas características, composição química, aspectos nutricionais e atividade biológica. Ao final, fundamenta-se a problemática do câncer sob um panorama mundial, sendo então evidenciadas as diferentes técnicas de extração convencionais empregadas para obtenção de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais.

### 2.1. Plantas Medicinais

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal é toda espécie vegetal utilizada com a finalidade de tratar patologias, sendo utilizadas por diversas comunidades enquanto remédio, cuja denominação mais comum é o termo medicina popular. Caso a planta medicinal seja submetida a um processo de industrialização, o qual permite a padronização, evita contaminações e promove maior segurança, a esse produto se atribui o termo fitoterápico (BRASIL, 2020).

O manejo de plantas medicinais é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde o início da década de 90, quando entre 65 e 80% dos países subdesenvolvidos usufruíam das mesmas como artifício de zelo primário à saúde ou enquanto forma de tratamento medicinal complementar (BRASIL, 2016).

Essa tendência se justifica, pois as matrizes vegetais apresentam diferentes componentes químicos com diversos potenciais biológicos. Assim, combinado com as vantagens de elevada disponibilidade e menos efeitos citotóxicos, o aproveitamento da ação anticancerígena de constituintes à base de plantas, a princípio, se mostra viável para o controle do câncer (IJAZ *et al.*, 2018; MAJOLO *et al.*, 2019).

Newman e Cragg (2016) mostraram que, no cenário do câncer, por exemplo, cerca de 49% das moléculas aprovadas como medicamentos provinham de fontes naturais e seus derivados. Além disso, a presença de algumas classes de compostos bioativos, como flavonoides e terpenos, que são metabólitos largamente presentes em plantas, tem se mostrado potenciais agentes anticancerígenos. Isso elucida a importância de estudos na área da

farmacognosia, devido a sua proeminente importância para o combate ao câncer (KUMAR e JAITAK, 2019).

No contexto brasileiro, observa-se que o país de maior biodiversidade do mundo, com cerca de 20% do total de espécies do globo, possui alta capacidade de obtenção de extratos ricos em constituintes com atividades biológicas a serem empregados na cura e tratamento de inúmeras doenças. Todavia, apesar das condições propícias para promover o desenvolvimento da etnofarmacologia, a parcela de espécies estudadas para esse fim ainda permanece insignificante (BRASIL, 2016; ELISABETSKY e SHANLEY, 1994).

Considerando então a abundante variedade genética brasileira e o *know-how* das propriedades farmacológicas de diversas plantas, cuja herança deve-se majoritariamente aos costumes dos povos indígenas, o Ministério da Saúde aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos por meio do Decreto nº 5.813, em 22 de junho de 2006, cujo objetivo é garantir o acesso seguro, baseado em evidências científicas e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Além disso, a Política visa o desenvolvimento tecnológico-industrial e a inclusão social, por meio do uso sustentável da biodiversidade brasileira, promovendo assim a valorização e a preservação do conhecimento tradicional de povos indígenas (BRASIL, 2016).

Sendo assim, é necessário avaliar as razões que motivam a demanda por soluções voltadas ao tratamento e cura do câncer, entendendo a problemática da doença, tendências de crescimento, as técnicas de tratamento empregadas na atualidade e quais plantas possuem compostos com ação anticancerígena.

## **2.2. Câncer no Brasil e no Mundo: Característica e Estatísticas**

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer é uma doença ocasionada pelo crescimento desordenado das células, que ocorre nos mais diferentes tecidos e órgãos, podendo ocasionar metástase e atingir outras regiões. Ele surge a partir de uma mutação genética que culmina num processo de carcinogênese, cuja evolução se dá em três estágios – iniciação, promoção e progressão – sendo este último, de fato, a apresentação das células cancerosas na forma de um tumor (INCA, 2020; INCA, 2021). Atualmente, há mais de 600 tipos de câncer listados na Classificação Internacional de Doenças sendo que, dentre eles, os 10 tipos mais comuns são responsáveis por mais de 60% da incidência e mortalidade, conforme Tabela 1 (WHO, 2020).

**Tabela 1** – Os tipos de câncer mais incidentes no ano de 2018.

<b>Tipo</b>	<b>Incidência (%)</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
Mama	11,6	6,6
Pulmão	11,6	18,4
Colorretal	10,2	9,2
Próstata	7,1	3,8
Estômago	5,7	8,2
Fígado	4,7	8,2
Colo do útero	3,2	3,3
Esôfago	3,2	5,3
Tireoide	3,1	0,4
Bexiga	3	2,1
Outros	36,6	34,5

Fonte: Adaptado de WHO (2020).

Conforme observado da Tabela 1, atenção especial deve ser dada aos cânceres de pulmão, mama, colorretal e próstata dentre os demais, que possuem os índices elevados de incidência e mortalidade. Segundo dados do último relatório da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020), uma em cada 6 mortes no mundo é causada pela doença. No ano de 2018, foram constatados 18,1 milhões de novos casos da doença e 9,6 milhões de mortes. A projeção apontada pelo estudo é que até 2040, serão 29,4 milhões de novos casos por ano, representando um aumento de mais de 60% nas próximas duas décadas. Ainda segundo as estatísticas, a doença é a causa de aproximadamente 30% das mortes prematuras entre adultos na faixa etária dos 30 aos 69 anos em 134 países, o que representa mais de 70% do globo.

O crescimento desigual da doença é resultado da disparidade nos recursos disponíveis para seu combate, especialmente em países menos desenvolvidos, que se mostram mais vulneráveis. Além dos fatores culturais e do modo de vida de diferentes sociedades, que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, como o uso de tabaco, consumo de álcool, nível de atividade física e dieta, há também elementos socioeconômicos que explicam a alta taxa de mortalidade em regiões carentes (WHO, 2020; BRAY e PIÑEROS, 2016).

A situação é agravada pelo prognóstico deficiente, elevados riscos de infecção, falta de acesso a tratamentos adequados, escassez de profissionais especializados e dificuldade de acesso ao sistema de saúde para populações em áreas remotas. Essas condições são

determinantes para o alto impacto da doença em nações com baixo e médio Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Além disso, ao analisar a tendência global dos padrões de câncer no mundo, estudos indicam que a principal causa de morte por câncer em países subdesenvolvidos está relacionada aos cânceres associados a infecções, como o de estômago. Nesse contexto, torna-se essencial adotar soluções paliativas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, tendo em vista que o acesso atual a cuidados médicos e medicamentos para alívio da dor é insuficiente (CAMERON *et al.*, 2011; BRAY e PIÑEROS, 2016; VAN DER PLAS, BENJAMENS e KRUIJFF, 2020).

Sabe-se ainda que, atualmente, o emprego de terapias antineoplásicas como a quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia são extensamente utilizadas para o tratamento de pacientes oncológicos. Todavia, observa-se que o uso dessas técnicas está geralmente associado a uma série de efeitos colaterais, decorrentes da baixa seletividade dos métodos, que afetam não apenas as células cancerosas, mas também os tecidos saudáveis. Desse modo, é comum que os pacientes apresentem sintomas como náuseas, fadiga, vômito e estejam vulneráveis à infecções. Esses efeitos adversos não somente desencadeiam diversas complicações no quadro clínico dos pacientes, como podem levar à necessidade de descontinuação do tratamento, dada a elevada agressão sofrida pelo organismo (SOUZA *et al.*, 2013; FERREIRA e FRANCO, 2017).

Nesse contexto, a OMS estabeleceu 10 ações-chave para combater a progressão global do câncer e, dentre elas, destaca-se a 9ª: “otimizar a força de trabalho e o acesso confiável e sustentável a produtos medicinais e de saúde”. Nesse contexto, a pesquisa é um elemento-chave para melhorias no controle da doença, pois atua como um instrumento estratégico para reduzir o efeito global da doença e aumentar a expectativa de vida da população (WHO, 2020).

Desse modo, considerando a crescente demanda e fomento pela busca por plantas com ação antitumoral e, considerando a elevada biodiversidade brasileira, no próximo tópico serão apresentadas algumas espécies utilizadas pela medicina popular para o tratamento do câncer.

### **2.3. Plantas brasileiras com ação anticancerígena**

O cerrado, segundo maior bioma brasileiro que corresponde a cerca de 21% do território nacional, concentra diversas espécies utilizadas devido às suas propriedades antitumorais. Ribeiro *et al.* (2017) listaram 35 espécies vegetais, distribuídas em 21 famílias botânicas, sendo a família Fabaceae a mais representativa, com 8 espécies. Plantas como *Copaifera langsdorffii* Desf., *Hymenaea stigonocarpa* Hayne., *Aloe vera* (L.) Burm.f., *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.

*Pterodon emarginatus* Vogel., *Croton urucurana* Baill., *Brosimum gaudichaudii* Trécul, *Mormodica charantia* L. e *Curcuma longa* L. são algumas das espécies utilizadas pela população ribeirinha do Norte Araguaia (Mato Grosso). Ainda segundo o levantamento, os métodos de preparo mais utilizados são a maceração, infusão e decocção, sendo utilizados em menor escala xaropes, sucos, pílulas e as plantas frescas. Quanto à parte da planta, observou-se que as partes aéreas, folhas e látex são muito utilizadas, mas a casca, frutos e raízes também são aproveitados.

Carvalho *et al.* (2019) também investigaram o potencial farmacológico de espécies provenientes do cerrado para o tratamento de diversas patologias. As espécies *Stryphnodendron adstringens*, *Campomanesia adamantium*, *Saintpaulia velutina*, *Jacaranda decurrens*, *Hancornia speciosa*, *Guazuma ulmifolia* e *Schinus terebinthifolius* foram empregadas em estudos contra diferentes linhagens tumorais como mama, cervical, próstata e leucemia. Acerca dos compostos bioativos identificados nessas espécies, pode-se destacar a presença majoritária de compostos fenólicos, flavonoides e terpenos, por exemplo, chalcona, rutina, kaempferol, ácido gálico, procianidina, catequina, germacreno-B, limoneno,  $\alpha$ -pineno e espatulenol.

A pesquisa conduzida por Melo *et al.* (2011) teve por objetivo verificar quais espécies de plantas medicinais são utilizadas no Brasil enquanto agentes antitumorais. Os autores observaram que, no período entre 1980 e 2008, 84 espécies de plantas foram associadas à prevenção ou ao tratamento do câncer, em que 30,95% foram empregadas para linhagens específicas de tumores. As plantas mais citadas foram *Aloe vera* (L.) Burm. f., *Euphorbia tirucalli* L. e *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl., sendo que espécies como *Sympyrum officinale* L. e *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. também foram recorrentes. Cabe destacar que apenas 35,71% das espécies foram submetidas a estudos farmacológicos, em que destes 14,28% foram ensaios *in vitro*, 21,43% com estudos *in vivo* e *in vitro*, contabilizando 32 moléculas isoladas, das quais 10 foram sujeitas a estudos *in vivo* e apenas 1 chegou à fase de avaliações clínicas.

Silva *et al.* (2016) analisaram o potencial citotóxico de 18 espécies encontradas na Região Nordeste do país. Como resultados, os autores constataram que 8 das espécies apresentaram efeitos citotóxicos significativos contra linhagens de melanoma, fígado e leucemia, sendo elas: *Byrsonima sericea* DC., *Duranta repens* Linn., *Himatanthus bracteatus* (A. DC.), *Ipomoea purga* (Wender.), *Ixora coccinea* Linn., *Mabea piriri* Aubl., *Ocotea longifolia* Kunth. e *Psychotria capitata* Ruiz & Pav.

Das espécies discutidas, apenas *A. vera*, *C. longa*, *S. terebinthifolius* e *M. charantia* integram a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Nesse contexto, observa-se que a bioprospecção de espécies vegetais brasileiras para estudos farmacológicos deve ser estimulada, de modo a estender a lista de opções cientificamente comprovadas como eficazes e seguras. Sendo assim, dentre as plantas brasileiras, optou-se por estudar a espécie *Pereskia aculeata* Miller no presente trabalho, dado seu baixo custo, elevada disponibilidade e carência de pesquisas na literatura com a espécie.

#### **2.4. *Pereskia aculeata* Miller**

De acordo com o *International Cactaceae Systematics Group*, a família Cactaceae abrange quatro subfamílias (Cactoideae, Pereskioideae, Opuntioideae e Maihuenioideae) e possui 127 gêneros, os quais apresentam como característica comum a resistência à escassez hídrica (MENEZES, TAYLOR e LOIOLA, 2013). A *Pereskia*, pertencente à subfamília Pereskioideae, é considerada a maior depositária de caracteres primitivos da família, agrupando 17 espécies (DUARTE e HAYASHI, 2005; PINTO e SCIO, 2014; ESTRADA-CASTILLO *et al.*, 2019). A Tabela 2 apresenta a classificação taxonômica da planta.

**Tabela 2** – Classificação Taxonômica da *Pereskia aculeata* Mill.

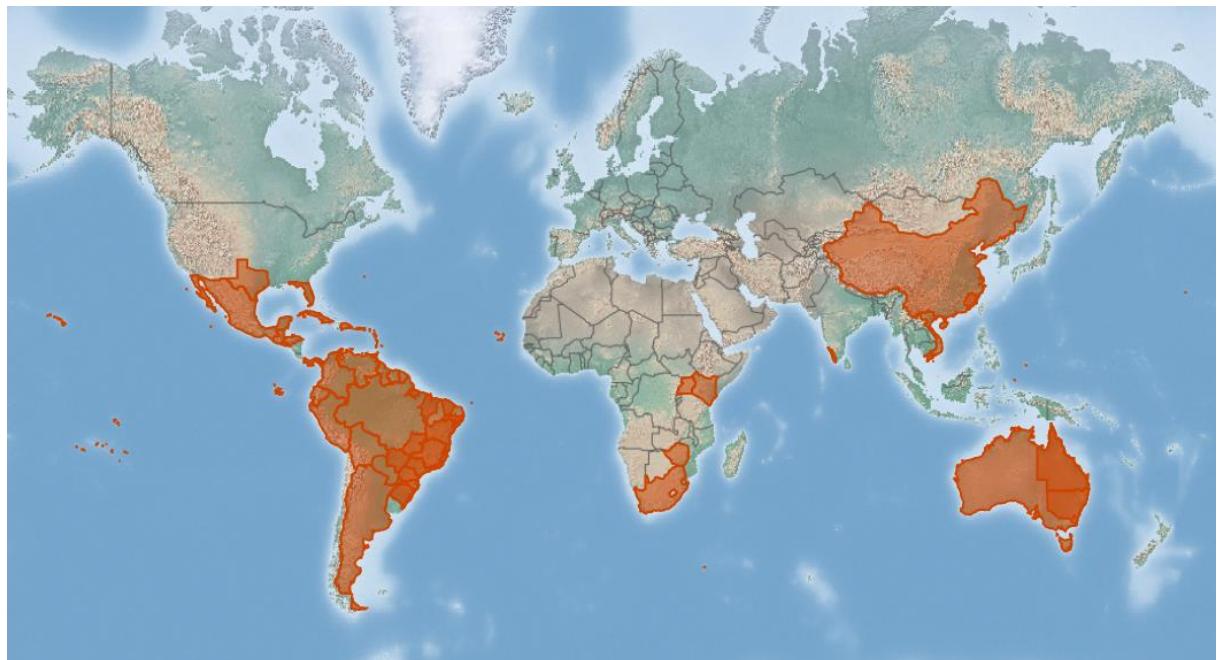
Divisões	Classificação
Domínio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Spermatophyta</i>
Subfilo	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Dicotyledonae</i>
Ordem	<i>Caryophyllales</i>
Família	<i>Cactaceae</i>
Gênero	<i>Pereskia</i>
Espécie	<i>Pereskia aculeata</i>

Fonte: Adaptado de CABI (2019).

O gênero *Pereskia* Mill. é nativo do México, Índias Ocidentais, América Central e América do Sul. Em 1753, Carl Nilsson Linnaeus, também conhecido como Carlos Lineu e

considerado o “pai da taxonomia moderna”, associou o gênero *Pereskia* à família dos cactos. Posteriormente, após a publicação da 4<sup>a</sup> edição do *Gardeners’ Dictionary*, no ano de 1754, por Philip Miller, a *Pereskia* passou então a ser reconhecida enquanto um gênero botânico, tendo sua nomenclatura até hoje associada ao botânico Miller (BRITTON e ROSE, 1919).

A *P. aculeata* é uma planta endêmica dos trópicos e nativa das Américas, presente principalmente na América do Sul. A planta foi posteriormente introduzida em regiões da África, como na Uganda e no Quênia e, atualmente, a espécie também se encontra na Austrália, Filipinas, Bermudas, Califórnia, Havaí, Israel e Índia (JANICK e PAULL, 2008 *apud* CABI, 2019; WITT e LUKE, 2017). O mapa de distribuição da espécie está representado na Figura 1.



**Figura 1** – Distribuição geográfica mundial da *P. aculeata* Mill. Adaptado de CABI (2022).

A partir da Figura 1, pode-se observar a presença da espécie ora-pro-nóbis em grande parte dos continentes. Nesse caso, destacam-se a introdução da espécie em regiões como México, Quênia, África do Sul, China e Austrália, onde a planta é comumente listada como invasora. Já na América do Sul, região de origem da *P. aculeata*, ela se apresenta em praticamente todo o território, com exceção de algumas regiões do Uruguai e Chile (CABI, 2022).

No Brasil, a *Pereskia* (ou *Peireskia*) *aculeata* Miller, internacionalmente conhecida pelo nome *Barbados gooseberry*, possui como principal nome vernáculo o termo ora-pro-nóbis, mas também pode ser chamada de Azedinha, Espinho-de-Santo-Antônio, Lobolôbô, Cipó-Santo, Espinho-preto e Surucucu, nomes comuns especialmente na Região Nordeste. Ela ocorre em todas as regiões, com exceção da Região Norte e sua presença é comum nos biomas da Caatinga, Cerrado, Mata atlântica e nos Pampas. A Figura 2 mostra a distribuição geográfica da planta no Brasil (ZAPPI e TAYLOR, 2020; SiBBr, 2021).



**Figura 2** – Distribuição geográfica da ora-pro-nóbis no Brasil. Adaptado de SiBBr (2021).

Conforme pode ser observado na Figura 2, as ocorrências confirmadas mostram a existência da ora-pro-nóbis (OPN) em todos os Estados das Regiões Sul e Sudeste, em Goiás, no Centro-Oeste, e no Nordeste nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Sergipe, Pernambuco e Maranhão (ZAPPI e TAYLOR, 2020).

#### 2.4.1. Descrição botânica

A ora-pro-nóbis (do latim, roga por nós) é uma das únicas espécies da família *Cactaceae* que apresenta folha desenvolvida, visto que, em geral, os cactos apresentam folhas reduzidas ou modificadas em espinhos para evitar a perda d'água. A Figura 3 mostra os arbustos da espécie, que é um cacto arbustivo ereto, perene, com caules finos e características de trepadeira, mas pode crescer sem a presença de anteparo e atinge, geralmente, entre 2 e 4 m de altura (DUARTE e HAYASHI, 2005; LABNUTRIR, 2017).



**Figura 3** – Arbustos de ora-pro-nóbis. Fonte: Próprio autor.

Ela possui ramos longos, prostrados, com folhas simples, largas, suculentas com pecíolos curtos, comprimento de até 12 cm, alternas, oblanceoladas a estreito-elípticas, de lâmina plana e cor variando do verde-claro ao verde-escuro. No caule, apresenta acúleos (falsos espinhos) curvos aos pares em ramos novos, posteriormente substituídos por espinhos aciculados em ramos maduros. As flores, dispostas em inflorescências, possuem de 20 a 50 mm de diâmetro, com perigônio branco a levemente amarelado; as infrutescências são pendentes, em racemo ou panícula, com frutos redondos, pericarpo amarelo ou alaranjado, possuindo espinhos quando jovem; as sementes são obovadas a elípticas e de cor preta. A Figura 4 mostra as flores, frutos e folhas da *P. aculeata* (MENEZES, TAYLOR e LOIOLA, 2013; LABNUTRIR, 2017; BRASIL, 2010; BOTREL *et al.*, 2017).



(a)



(b)

**Figura 4** – Folhas e flores (a) e frutos (b) de OPN. Adaptado de Egea e Pierce (2021).

#### 2.4.2. Perfil fitoquímico

A composição química da planta inclui cinco principais classes de compostos bioativos, dentre eles: compostos fenólicos, flavonoides, terpenos, carotenoides e fitosteróis. A Tabela 3 resume as principais classes e constituintes presentes no óleo de ora-pro-nóbis, destacando o potencial biológico avaliado para cada grupo de metabólitos.

Conforme apresentado na Tabela 3, o grupo dos compostos fenólicos é representado por constituintes como os ácidos caftárico, p-cumárico, cafeico e ferúlico, que são comumente associados às ações antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, dentre outras. Outra importante classe de constituintes que apresenta esses potenciais biológicos são os flavonoides e terpenos, como rutina, kaempferol, fitol e taraxasterol. Os carotenoides, luteína, caroteno e violaxantina, por exemplo, são associados aos efeitos cardioprotetor, anticancerígeno e anti-hipertensivo, enquanto o campesterol,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, que compõem a classe dos fitosteróis, apresentam potencial antidiabético, neuroprotetor, anti-inflamatório e antitumoral. Sendo assim, observa-se a correlação de diversos constituintes presentes nos extratos de OPN com diversos efeitos biológicos, dentre eles, o antitumoral.

Dessa forma, torna-se necessário avaliar tanto as técnicas de extração empregadas no preparo dos extratos de OPN quanto avaliar os estudos realizados visando explorar o potencial antitumoral da planta, conforme exposto a seguir.

**Tabela 3** – Principais classes, constituintes e potenciais biológicos dos metabólitos isolados presentes nos extratos de ora-pro-nóbis.

Classes	Principais constituintes	Potenciais biológicos	Ref.
Compostos fenólicos	Ácidos cis-caftárico, trans-caftárico, cafeico, ferúlico e p-cumárico	Antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, anticoagulante, anti-hepatite B, antimutagênico, anticancerígeno, neuroprotetor, anticoledsterol	[1], [2], [3], [4], [5], [6]
Flavonoides	Rutina, isoramnetina e kaempferol	Antioxidante, antitumoral, hepatoprotetor, anti-inflamatório, cardioprotetor, antidiabético e anticolinesterásico	[7], [8], [9], [10], [11], [12]
Terpenos	Fitol, farnesilacetona, taraxasterol e taraxerol	Antinociceptivo, antimicrobiano, anti-inflamatório, ansiolítico, anticancerígeno, antioxidante, antialérgico, antiaterosclerótico, cardioprotetor e anticolinesterásico	[13], [14], [15]
Carotenoides	Luteína, $\alpha/\beta$ criptoantina, $\alpha/\beta$ (cis/trans) caroteno, violaxantina e neoxantina	Anticancerígeno, cardioprotetor, antiosteoporose, anti-hipertensivo e anticírrótico	[16], [17], [18]
Fitosteróis	Campesterol, $\beta$ -sitosterol e estigmasterol	Anti-inflamatório, antidiabético, hipocolesterômico, antitumoral, antioxidante, angiogênico, analgésico, antimutagênico, vermicida, genotóxico, imunoregulatório, neuroprotetor, antimicrobiano e antiosteoartrítico	[19], [20], [21], [22], [23], [24], [25]

[1] Tripoli *et al.* (2005), [2] Wang *et al.* (2009), [3] Chao, Hsu e Yin (2009), [4] Yamada e Tomita (1996), [5] Szwajgier (2013), [6] Ou e Kwok (2004), [7] Kumar e Pandey (2013), [8] Raffa *et al.* (2017), [9] Batra e Sharma (2013), [10] Panche, Diwan e Chandra (2016), [11] Dias, Pinto e Silva (2021) e [12] Sarian *et al.* (2017), [13] Santos *et al.* (2013), [14] Islam *et al.* (2018), [15] Pejin, Kojic e Bogdanovic (2014), [16] Rao e Rao (2007), [17] Nishino *et al.* (2009), [18] Chatterjee *et al.* (2012), [19] Methiev e Misharin (2008), [20] Kaur *et al.* (2011), [21] Saeidnia *et al.* (2014), [22] Wang *et al.* (2017), [23] Chai, Kuppusamy e Kanthimathi (2008), [24] Ghosh, Maity e Singh (2011) e [25] Yusuf *et al.* (2018).

## 2.5. Métodos de Extração

O primeiro passo para a obtenção de compostos bioativos a partir de matérias-primas vegetais é a definição da espécie botânica a ser utilizada, sendo fundamental levar em consideração os objetivos do estudo e seu perfil fitoquímico. Em seguida, seleciona-se o método de extração adequado, sendo essa uma etapa fundamental para garantir a obtenção dos compostos de interesse. Finalmente, realiza-se a caracterização e isolamento dos constituintes presentes nos extratos (PATRA *et al.*, 2018; ZHANG, LIN e YE, 2018).

Devido à diversidade de matrizes vegetais, estruturas e propriedades físico-químicas dos compostos bioativos, a etapa de extração pode ser um desafio. O método de extração empregado exerce forte influência sobre a composição química do extrato que, por conseguinte, pode afetar o potencial biológico. Cabe destacar que, no processo de extração, fatores como a origem da planta (condições do clima, solo e outros), tamanho de partícula, tipo de solvente empregado, viscosidade, pureza, miscibilidade em meio aquoso, toxicidade, densidade, razão solvente-sólido, seletividade e temperatura podem interferir na difusividade e solubilidade, modificando assim a eficiência e o rendimento do processo (ZHANG, LIN e YE, 2018; GIACOMETTI *et al.*, 2018; ŽITEK *et al.*, 2020).

As técnicas de extração são comumente divididas em dois grupos: convencionais e alternativas. O primeiro inclui métodos como a maceração, ultrassom, percolação, extração por Soxhlet, infusão e hidrodestilação. Já as técnicas alternativas, muitas vezes denominadas avançadas ou sofisticadas, englobam processos como a extração por fluido supercrítico, micro-ondas, enzimas ou campo elétrico pulsado e extração com líquido pressurizado. Devido ao elevado custo dos equipamentos e pela maior demanda tecnológica envolvida nos métodos alternativos, as técnicas convencionais ainda são amplamente empregadas (ZHANG, LIN e YE, 2018; ŽITEK *et al.*, 2020; HANNA, 2008). As maiores vantagens são a alta reprodutibilidade do método e o uso de aparato experimental simples. Todavia, esses métodos possuem algumas desvantagens evidentes, como o alto consumo de solventes orgânicos, a necessidade de empregar etapas adicionais para purificar o extrato, as dificuldades associadas à recuperação do solvente, a possibilidade de causar degradação térmica pelas altas temperaturas envolvidas no processo e o alto custo envolvido na etapa de purificação (HANNA, 2008; HALOUI e MENIAI, 2017).

Em relação aos métodos não-convencionais, as consideradas técnicas “verdes”, em geral, possuem maior seletividade, menor produção de resíduos, permitem o emprego de

temperaturas mais baixas, e baixo consumo de solventes orgânicos. Em contrapartida, o maior desafio envolvido no uso das técnicas alternativas reside na limitação do processo em larga escala, pelo elevado custo dos equipamentos, sendo adequadas apenas para a obtenção de produtos de alto valor agregado (HANDA, 2008; AZMIR *et al.*, 2013; HALOUI e MENIAI, 2017).

### 2.5.1. Métodos Convencionais

Dentre as diferentes técnicas de extração tradicionais existentes, o presente trabalho focará na maceração dinâmica, ultrassom e extração por Soxhlet.

Melecchi (2005) e Paschoal (2018) discutiram as principais características do processo de maceração. Segundo os autores, a técnica consiste em promover o contato do material vegetal (pulverizado) com o solvente em recipiente fechado, com ou sem agitação. O sistema deve ficar em contato por um período de 2 a 2 semanas o que, geralmente, requer renovação do solvente. A técnica é largamente empregada para extração de princípios ativos termossensíveis, fotossensíveis ou voláteis. O método, portanto, requer uso de temperatura ambiente e de recipientes cor âmbar ou outro que não permita passagem de luz. Enquanto principais desvantagens, tem-se que a maceração é uma técnica não seletiva, com poder extrativo limitado, chances de contaminação e o tempo de extração é elevado.

A técnica de extração por ultrassom, por sua vez, consiste em aplicar ondas sonoras em um espectro que pode variar entre 20 e 2000 kHz sobre o material vegetal misturado ao solvente. As ondas aplicadas se propagam pelo solvente culminando na criação de microbolhas, o que provoca uma constante alteração de seu volume. Após sucessivos aumentos e reduções no tamanho, a força de compressão gerada a partir das microbolhas leva à cavitação do meio e, por consequência, o colapso das bolhas provoca altas tensões de cisalhamento, resultando em um aumento da permeabilidade das paredes celulares da matéria-prima vegetal. Apesar da técnica se destacar pelos tempos de extração relativamente baixos se comparada a outros métodos e pelo baixo impacto ambiental, a liberação de grande quantidade de energia decorrente da cavitação pode causar a volatilização de alguns compostos pelo calor gerado (HANDA *et al.*, 2008; OHJA *et al.*, 2020; VERNÈS, VIAN e CHEMAT, 2020).

A extração por Soxhlet, apesar de ter sido desenvolvida com foco na extração de lipídeos, é largamente empregada na extração de produtos naturais. O método consiste em

alocar uma pequena quantidade de matéria-prima no extrator, o qual é conectado em um balão de destilação que contém o solvente e, que na parte superior é adaptado a um condensador. Quando se atinge o nível do *overflow*, o sifão atua direcionando a solução para o balão de destilação, o que confere à técnica de extração por Soxhlet a característica de ocorrer sob refluxo, também sendo chamada de extração semicontínua (AZMIR *et al.*, 2013).

Nesse caso, o processo de extração também não é seletivo e fatores como a temperatura de extração e a natureza do solvente são determinantes para sua eficácia (MELECCHI, 2005). Enquanto característica da extração por Soxhlet, tem-se o elevado tempo de extração e o consumo de solventes orgânicos que, do ponto de vista ambiental, causa diversos problemas pela toxicidade dos solventes (TATKE e RAJAN, 2014). Cabe ainda destacar que a extração por Soxhlet é considerada como um método de referência, sendo usado para avaliar o êxito de outras técnicas por comparação (AZMIR *et al.*, 2013).

### **2.5.1.1. Uso de Técnicas Convencionais na Extração do Óleo de *Ora-pro-nóbis***

Dentre as técnicas relatadas, serão discutidos os trabalhos encontrados na literatura que abordaram a temática da extração convencional do óleo de *P. aculeata*. Cabe destacar que a revisão incluiu ainda outras espécies do gênero *Pereskia*, como a *P. bleo* e *P. grandifolia*, devido à escassez de informações sobre a extração da espécie estudada no presente trabalho.

Carvalho *et al.* (2014) realizaram o preparo de extratos hidroalcólicos aplicando uma turbo extração com 55 g de folhas de *P. acuelata* frescas e 100 mL de etanol (95% v/v) por cerca de 5 min. O conteúdo fenólico da amostra foi determinado pelo método clássico de Folin-Ciocalteau. Para os estudos de atividade, os autores calcularam a ação antioxidante utilizando o método DPPH e avaliaram as propriedades curativas do extrato por meio de um ensaio *in vitro* com células L929 (fibroblastos de rato). Os rendimentos obtidos variaram entre 8,9 e 11% (m/m), enquanto o conteúdo fenólico dos substratos como equivalentes de ácido gálico (GAC) variou de 108,2 a 121,1 mg GAC/L. Como conclusão, os autores observaram potencial curativo e antioxidante para os extratos produzidos.

Souza (2014) realizou a extração do óleo essencial de espécies vegetais como a *P. aculeata* e a *P. grandifolia*. A autora realizou o procedimento em triplicata, submetendo 100 g de folhas liofilizadas e cortadas em pequenos pedaços ao processo de destilação à vapor, durante 3 horas. Em seguida, o óleo foi dissolvido em n-hexano, sendo então adicionado sulfato

de sódio anidro; o material foi filtrado e armazenado a 4°C, em recipiente com vidro âmbar e sob atmosfera de N<sub>2</sub>, até sua utilização. Os rendimentos da extração de óleo essencial foram de, respectivamente, 0,03% e 0,09% para a *P. aculeata* e *P. grandifolia*. A composição dos extratos, avaliada por cromatografia gasosa, permitiu a identificação de 30 e 15 componentes, na ordem. Os componentes majoritários do óleo de *P. aculeata* foram fitol e o ácido hexadecanoíco e, para a *P. grandifolia*, óxido de manoil e fitol. Por fim, a autora observou que todos os extratos apresentaram um bom potencial antioxidante e atividade moderada contra bactérias patogênicas gram-positivas.

No trabalho de Martin *et al.* (2017), folhas de *P. aculeata* foram submetidas à imersão em etanol durante 72 h para remoção de lipídeos e pigmentos. Em seguida, o material foi submetido à extração por Soxhlet com etanol e, posteriormente, o extrato foi centrifugado a fim de remover a fração insolúvel. Os sobrenadantes foram combinados e os polissacarídeos precipitados em dois volumes de 99% etanol e secos a 25 °C, a fim de obter a mucilagem de ora-pro-nóbis, obtendo rendimento da extração de 1,6% (m/m). Os autores realizaram ainda uma análise de polissacarídeos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e por um método não-destrutivo, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, observando assim a presença de galactose, arabinosa, ramnose, fucose e ácido galacturônico parcialmente esterificado.

Pinto *et al.* (2016) estudaram folhas de *P. aculeata* quanto às suas propriedades curativas. Nesse caso, as folhas foram secas em temperatura ambiente durante 15 dias. O material vegetal (cerca de 1 kg) foi então pulverizado em moinho de facas e extraído por maceração com metanol até a exaustão. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo, obtendo extrato bruto (140 g) metanólico, com posterior fracionamento em hexano (38 g). Os autores não discutiram a composição do óleo, todavia, observaram que ambos os extratos aceleraram a cura nas feridas de pele dos ratos, sendo o extrato da fração de hexano o melhor resultado.

Johari e Khong (2019) utilizaram 926 g de folhas moídas de *Pereskia bleo* no estudo do conteúdo fenólico e análise dos potenciais antioxidante e antibacteriano. Para isso, os autores empregaram o método de extração a frio, com intervalos de 24 h, usando metanol como solvente. Em seguida, o solvente foi removido por uso de um rotaevaporador à pressão reduzida, obtendo assim 39,1371 g de extrato bruto de metanol, o posterior fracionamento com hexano e clorofórmio resultou em rendimentos de 0,334 g e 5,8916 g, na ordem. Os autores não

avaliaram a composição dos extratos, todavia, o conteúdo fenólico foi avaliado pelo método de Folin-Ciocalteau. O extrato metanólico apresentou o maior conteúdo fenólico e exibiu melhor resultado nos ensaios de atividade antioxidante e antibacteriano (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Dentre as frações, o extrato produzido com clorofórmio foi o segundo melhor na atividade antibacteriana, enquanto o extrato hexanoico se destacou quanto à atividade antioxidante.

Conforme observado no trabalho Mohd-Salleh *et al.* (2020), os extratos das folhas de *P. bleo* foram produzidos por maceração e infusão (extrato aquoso). A maceração iniciou com a secagem e moagem das folhas da planta, e 10 g do material vegetal foram imersos em 500 mL de hexano, acetato de etila e metanol, sucessivamente, por cerca de 30 dias. A infusão produziu as amostras pela fervura de 10 g de folhas moídas em 450 mL de água a 50 °C, até a redução de 1/3 do volume inicial. Todos os extratos foram estocados a -20 °C e caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, não sendo discutidos os rendimentos das extrações. No extrato hexanóico, notou-se a presença majoritária de esteróis ( $\gamma$ -sítosterol) e compostos fenólicos ( $\beta$ - e  $\gamma$ - tocoferol). Já para o extrato de acetato de etila, a principal classe encontrada foi de terpenoides (fitol), enquanto para os extratos metanólico e aquoso, houve maior presença de ácidos graxos. O extrato de acetato de etila mostrou um potente efeito citotóxico contra linhagens de câncer cervical (HeLa) e mama (MDA-MD-231), dados os menores IC<sub>50</sub>; a ação biológica foi correlacionada ao seu perfil fitoquímico.

Massocatto *et al.* (2021) realizaram uma investigação acerca do potencial farmacológico das espécies *P. aculeata* e *P. grandifolia*. Para isso, os autores utilizaram duas partes da planta: folhas frescas (250 g) e frutas frescas (400 g). O material foi lavado, seco (40 °C) e moído e foi submetido à maceração durante, respectivamente, 12 e 7 dias, empregando etanol e água deionizada na proporção 1:3 para a produção dos extratos. Todos os extratos foram concentrados em evaporador rotativo e mantidos a -20 °C até o uso, não sendo apresentados os resultados das extrações. Apesar de não realizarem a determinação do perfil fitoquímico, os autores informaram que, segundo a literatura, compostos fenólicos, carotenoides, alcaloides e fitosteróis são classes de compostos comuns à *P. aculeata*, sendo o fitol, o principal componente do óleo essencial. Já para a *P. grandifolia*, é comum a presença de fitosteróis, ésteres, ácidos graxos, carotenoides e alcaloides, de modo que o óxido de manool e fitol são majoritariamente encontrados no óleo obtido a partir de suas folhas, enquanto nas frutas há presença de ácido oleanólico e saponinas.

Cruz *et al.* (2021) realizaram um estudo com o objetivo de otimizar a extração de componentes fenólicos a partir das folhas de *P. acuelata* por meio de uma mistura de solventes (água, etanol e acetona). Para isso, um planejamento experimental do tipo centroide simplex foi empregado, resultando em 10 experimentos. A extração foi realizada a 45 °C, sob agitação constante, durante 30 min, usando uma proporção de massa para solvente igual a 1:20, não sendo discutidos os resultados sobre o rendimento. O melhor conteúdo fenólico foi extraído para 60% água e 40% etanol, sendo observados pela primeira vez a presença de ácidos chicórico, cafeoil-hexárico e cumaroil-hexárico. O extrato otimizado apresentou atividade antioxidante, mas não foi observado efeito de citotóxico *in vitro* contra células tumorais ou saudáveis (A-549, HepG2, Caco-2 e IMR90).

Após a análise das técnicas convencionais de extração, é pertinente ampliar a perspectiva para outras metodologias de extração. Nesse contexto, tem-se a extração por fluido supercrítico como uma abordagem de destaque. Com isso, serão abordados os aspectos teóricos associados a essa técnica, juntamente com uma revisão dos principais trabalhos da literatura que abordam a extração supercrítica do óleo de ora-pro-nóbis.

### **2.5.2. Extração Supercrítica**

A extração supercrítica vem sendo utilizada nos setores alimentício, farmacêutico e nutracêutico. No ramo da extração de compostos bioativos a partir de produtos naturais, diversas matérias-primas podem ser utilizadas, como ervas moídas, frutos, sementes, folhas, raízes, caule e flores (PEREIRA e MEIRELES, 2010; WRONA *et al.*, 2017). Além de ser extensamente empregada para extração de óleo essencial, que é uma pequena fração da composição da planta rica em hidrocarbonetos e compostos oxigenados, a extração supercrítica também é utilizada para síntese de polímeros, nucleação de partículas, extração de cátions de metal ou ainda no setor de cosméticos (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

O fluido supercrítico, conforme apontado por TERRON (2009) é caracterizado como qualquer substância que se encontre acima de suas condições críticas de temperatura e pressão. A temperatura,  $T_c$ , é a maior temperatura na qual um gás pode ser transformado em líquido pelo aumento da pressão. Por outro lado, a pressão crítica,  $P_c$ , é a maior pressão na qual um líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura. Assim,  $P_c$  e  $T_c$  são a maior pressão e a maior temperatura nas quais se observa que existe uma espécie pura em equilíbrio vapor/líquido. Dessa forma, um fluido supercrítico apresenta propriedades intermediárias entre

os líquidos e os gases (SMITH, VAN NESS e ABBOTT, 2007; HEDRICK, MULCAHEY e TAYLOR, 1992).

Dentre as substâncias empregadas na extração supercrítica, o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é majoritariamente utilizado. Isso se justifica pois o CO<sub>2</sub> é atóxico, altamente disponível, de baixo custo, inerte e apresenta condições supercríticas amenas (73,8 bar e 31 °C), o que confere facilidade de operação e evita a degradação de compostos termolábeis. Em adição, o CO<sub>2</sub> possui alta difusividade, conferindo à substância um elevado poder de solvatação, que, associado à facilidade de remoção durante a etapa de descompressão, conferem ao dióxido de carbono características que o tornam um solvente ideal (MAUL, 1999; POURMORTAZAVI e HAJAMIRSADEGHI, 2007; HERRERO *et al.*, 2010).

Maul (1999), aponta que o uso da tecnologia de extração por fluido supercrítico (EFSC) em escala industrial surgiu na Alemanha com o objetivo de realizar a remoção da cafeína presente no café, no final da década de 70, todavia, Sapkale *et al.* (2010) indicam que um dos fatores para o interesse na investigação da técnica foi devido ao uso de tolueno supercrítico objetivando o refinamento de petróleo e óleo de xisto na mesma década.

O crescente interesse pela tecnologia nos últimos anos deve-se, principalmente, à seletividade, facilidade e capacidade de separação, que permite solubilizar os compostos de interesse evitando o uso de solventes orgânicos, que são prejudiciais ao meio ambiente. Como consequência, torna-se viável a obtenção de uma diversidade de compostos que, dificilmente seriam possíveis por métodos convencionais ou necessitariam de um robusto processo de purificação, em geral, altamente custoso (BALDINO e REVERCHON, 2018; AHMAD *et al.*, 2019). Além disso, o fluido supercrítico permite uma diversidade de aplicações, cobrindo áreas como extração de produtos naturais, alimentos, farmacêutica e outros (HERRERO *et al.*, 2010).

Dentre os principais motivos para o sucesso da técnica, pode-se citar:

- Elevado poder de penetração nos poros da matriz vegetal sólida, potencializando a transferência de massa e levando a menores tempos de extração (LANG e WAI, 2001);
- A passagem de fluido “fresco”, em contínuo refluxo, pelo material a ser extraído, permite extrair completamente os constituintes presentes na matéria-prima (LANG e WAI, 2001; AZMIR *et al.*, 2013);

- Evita a produção de resíduos e problemas relacionados ao descarte de solventes orgânicos (CLIFFORD e WILLIAMS, 2000);
- A modelagem da extração supercrítica permite obter informações valiosas para promover a otimização do processo (LANG e WAI, 2001);
- Uso de temperaturas relativamente baixas associado à ausência de incidência luminosa e da passagem de ar durante a extração previne a ocorrência de degradação dos compostos lábeis, de modo que a EFSC oferece condições adequadas para o processo de extração (TATKE e RAJAN, 2014; BRUSOTTI *et al.*, 2014).
- A técnica é altamente seletiva, de modo que a modificação das condições de processo (pressão e temperatura) alteram significativamente o poder de solvatação do CO<sub>2</sub> (AZMIR *et al.*, 2013);
- Enquanto as técnicas convencionais demandam consumo de cerca de 20 a 100 g de matéria-prima por extração, a extração supercrítica é capaz de extrair mais de 100 constituintes usando apenas 1,5 g de material (LANG e WAI, 2001);
- O fluido supercrítico pode ser reciclado permitindo o uso da tecnologia em larga escala (LANG e WAI, 2001) e
- O equipamento de extração supercrítica apresenta a possibilidade de ser acoplado diretamente com um cromatógrafo, permitindo quantificar de forma mais simples os compostos extraídos (LANG e WAI, 2001).

Apesar das vantagens da técnica, os processos supercríticos requerem investimentos significativos devido ao uso de vasos de pressão. Embora haja um amadurecimento em relação à exploração da técnica para diferentes materiais, sua implementação em escala industrial ainda é limitada. Além disso, os estudos de viabilidade econômica da extração com CO<sub>2</sub> supercrítico encontrados na literatura pouco discutem sobre a seletividade ou abordagens para superar as limitações do processo. Enquanto a unidade supercrítica demanda investimentos mais altos, as plantas de pressão atmosférica necessitam de etapas extras para separação do solvente. Assim, a viabilidade financeira e operacional da unidade supercrítica é possível. Contudo, a principal desvantagem reside nos extratos produzidos, que frequentemente contêm excesso de compostos devido à coextração de componentes indesejados e à baixa solubilidade dos compostos de interesse no CO<sub>2</sub> supercrítico (BARDINO e REVERCHON, 2017).

### **2.5.2.1. Fatores que Influenciam no Processo de Extração**

Do ponto de vista do processo, são diversos os aspectos que podem afetar a capacidade do solvente em extrair o soluto da matriz sólida. Assim, o conhecimento de fatores como o mecanismo de transferência de massa, os parâmetros cinéticos e a correlação entre as variáveis de operação (T, P) com modelos teóricos para descrição da cinética da extração são fundamentais para compreender e avaliar a extração por fluido supercrítico (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Em geral, tem-se que, além das condições operacionais de processo, o tamanho da partícula e o fluxo de solvente também são cruciais para o rendimento do processo. Observa-se ainda que o teor de umidade, o tempo de extração e a adição de cosolventes podem influenciar a eficácia da extração (PAPAMICHAIL e MAGOULAS, 2000; FERREIRA e MEIRELES, 2002; MEZZOMO, MARTÍNEZ e FERREIRA, 2009; NAGY e SIMÁNDI, 2008; MARKOM *et al.*, 2021).

### **2.5.2.2. Uso do Fluido Supercrítico na Extração do Óleo da *Ora-pro-nóbis***

A revisão da literatura com foco no uso do fluido supercrítico com relação à espécie em questão mostrou uma escassez de estudos. Pois isso, ampliou-se a revisão para outras espécies do gênero *Pereskia*, como a *Pereskia bleo* e *Pereskia grandifolia*.

Sharif *et al.* (2015) produziram extratos via extração por fluido supercrítico e maceração utilizando as folhas de *P. bleo* e, posteriormente, caracterizaram os extratos empregando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As folhas foram secas e moídas (<1 mm) e foram então submetidas aos processos de extração. Para a maceração, 10 g de folhas foram submetidas à extração com 300 mL de solvente após 30 min de sonificação (40 kHz e 30 °C). A maceração, feita com metanol e água, ocorreu durante 24 h; em seguida, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo a vácuo sob temperatura de 40 °C. O rendimento obtido para a maceração com metanol foi de 6,50 g/100g, enquanto o resultado usando água como solvente foi de 4,6 g/100g. No extrato metanólico foi observada a presença de elevadas quantidades  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e ácido palmítico; já no extrato aquoso, notou-se a presença mio-inositol e  $\alpha$ -tocoferol.

Para a extração supercrítica, utilizou-se o CO<sub>2</sub> como solvente e 15 g de folhas moídas. Nesse estudo, os autores utilizaram etanol como cosolvente, em quantidade apropriada para o

extrator de volume igual a 50 mL. Após a coleta do extrato pela despressurização do sistema, N<sub>2</sub> foi bombeado para remover o solvente. As condições de extração utilizadas foram: temperatura de 40 a 60 °C, pressão de 25 a 45 MPa, tempo de extração de 1 a 5 h, vazão de CO<sub>2</sub> de 1 a 5 mL/min e volume de cosolvente de 0 a 90% (v/m de material seco). O rendimento mais baixo foi observado para as condições de 40 °C, 25 MPa, 1 h de extração, vazão de CO<sub>2</sub> de 1 mL/min e sem adição de cosolvente, cujo valor foi de 0,85%. Enquanto isso, o maior rendimento foi de 5,60%, na condição de 60 °C, 45 MPa, durante 5 h de extração, usando vazão de solvente igual a 1 mL·min<sup>-1</sup> e 90% de cosolvente. No que diz respeito à composição do extrato, observou-se a presença de cholest-5-en-3-ol (3β), ácidos oleico e palmítico. Quanto aos esteróis, apenas o β-sitosterol foi observado nesse extrato. Todavia, os autores discutiram como a adição de etanol como cosolvente na EFSC pode aumentar o poder de extração de esteroides, auxiliando na obtenção de extratos ricos em antioxidantes (SHARIF *et al.*, 2015).

Os autores realizaram ainda um estudo estatístico avaliando a influência dos 5 fatores no rendimento da extração, com o objetivo de otimizar o processo empregando o estudo experimental do tipo *Box-Behnken*. Sharif *et al.* (2015) foram capazes de otimizar 3 fatores significantes do processo de extração (temperatura, pressão e volume de cosolvente), concluindo, após otimização, que as condições ótimas da extração seriam 52 °C, 36 MPa e 31% (v/m) de etanol, correspondente à adição de cosolvente igual a 1,5% do conteúdo total de CO<sub>2</sub>. Nessa condição, o rendimento foi cerca de 4,1%, próximo ao da maceração com água (4,6%).

Torres *et al.* (2022a) empregaram três métodos – extração por Soxhlet, extração por líquido pressurizado e extração por fluido supercrítico – para avaliar o efeito neuroprotetor das folhas de *Pereskia aculeata*. As condições da EFSC foram definidas a partir de pesquisas anteriores do grupo utilizando diferentes matérias-primas (cacau e café), sendo também baseado no trabalho de Sharif *et al.* (2015). Os autores empregaram 20 g de folhas moídas e mantiveram a pressão e a vazão do solvente (CO<sub>2</sub>) constantes durante o experimento, a 25 MPa e  $3,33 \times 10^{-4}$  kg·s<sup>-1</sup>. A temperatura foi avaliada sob as condições de 40, 50 e 60 °C. O tempo de extração foi fixado em 120 min, condição apontada a partir de um estudo cinético prévio realizado a 50 °C e mesmas condições de pressão e vazão de solvente.

Na extração por Soxhlet, Torres *et al.* (2022a) utilizaram 150 mL de hexano com 5 g de folhas moídas durante 6 h. Já na extração por líquido pressurizado (ELP), etanol e água destilada foram usadas como solventes. Os ensaios foram conduzidos a 10 MPa, com vazão de solvente igual a 4 mL·min<sup>-1</sup> e temperaturas de 50, 80 e 110 °C. O estudo cinético foi realizado

para a condição de temperatura de 80 °C, contabilizando 36 min de extração, ao passo que para as demais extrações, o tempo foi fixado em 15 min, tempo aproximado para obtenção de cerca de 90% do extrato. Na ELP, os autores usaram 8 g de material vegetal e 60 g de pérolas de vidro para formar o leito de extração.

A extração por Soxhlet apresentou rendimento de 4,66% e 15,08% com hexano e etanol, respectivamente, indicando a presença de grande quantidade de compostos polares na espécie. No caso da extração por fluido supercrítico, as extrações realizadas durante 120 min, 25 MPa e temperaturas de 40, 50 e 60 °C apresentaram rendimentos de, respectivamente, 1,78, 1,69 e 1,68%. Já a extração por líquido pressurizado teve como melhor resultado o rendimento de 13,09%, na condição de 10 MPa, 110 °C, empregando etanol como solvente durante 15 min de extração. Para a identificação dos componentes presentes nos diferentes extratos, a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi empregada. Os extratos obtidos por Soxhlet com hexano e FSC foram avaliados, apresentando majoritariamente o  $\gamma$ -sitosterol. Cabe destacar que, para os extratos produzidos via extração supercrítica, em geral, observou-se que o aumento da temperatura favoreceu a extração da maioria dos metabólitos (TORRES *et al.*, 2022a).

Em outro trabalho do grupo de Torres *et al.* (2022b), aplicaram uma série de técnicas verdes para realizar a extração das folhas de ora-pro-nóbis. O processo, que consistiu em 2 ou 3 passos, combinou as técnicas de extração com Soxhlet, extração por líquido pressurizado e extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, com o objetivo de propor uma alternativa ao fracionamento de compostos de alto valor obtidos das folhas de ora-pro-nóbis. No primeiro passo, observou-se que a extração com solvente de maior polaridade, ELP com etanol – realizada a 80 °C, 10 MPa e vazão de solvente de 4 mL·min<sup>-1</sup> durante 15 min – produziu o maior rendimento, de 13% (m/m). Todavia, apesar de, na primeira etapa a ELP com etanol ter apresentado a melhor performance, a combinação das técnicas de EFSC, ELP com etanol e ELP com água forneceu o maior rendimento acumulado, igual a 18,82%. Quanto à caracterização das amostras, observou-se a presença majoritária de flavonoides e ácidos orgânicos.

Torres *et al.* (2022c) avaliaram ainda uma sequência de extrações utilizando fluido comprimidos verdes em ordem crescente de polaridade para o fracionamento de compostos bioativos de *P. aculeata*. Nesse caso, a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico foi a primeira técnica a ser utilizada. Os autores empregaram 80 g de folhas secas e moídas com esferas de vidro em um extrator de 300 mL. O experimento foi conduzido a 250 bar e 40 °C e a vazão de CO<sub>2</sub> foi

de 5 L/min. As amostras foram coletadas a cada 10 min durante a primeira hora, a cada 15 min até os 210 min e, finalmente foram empregues coletas a cada 30 min até atingir os 270 min de extração. O resíduo desse passo foi submetido a extrações subsequentes com outras técnicas, como extração por líquido pressurizado, extração com líquido pressurizado (ELP) e em água subcrítica (EAS). O rendimento da extração supercrítica foi de 1,87% e, segundo o esquema do processamento *downstream* sugerido pelos autores, a técnica de EFSC é utilizada para obtenção de terpenoides, enquanto a ELP com etanol fornece carotenoides e compostos fenólicos e, por fim, EAS permite o enriquecimento do conteúdo de proteínas e carboidratos.

## **2.6. Potencial Antitumoral dos Extratos de *Ora-pro-nóbis***

De posse das informações sobre o potencial farmacológico dos metabólitos presentes na *ora-pro-nóbis* e das técnicas de extração comumente utilizadas para produção dos extratos, serão apresentados os estudos disponíveis na literatura que tenham sido realizados com o objetivo de avaliar o efeito anticancerígeno da espécie. Cabe destacar que, devido à escassez de estudos com a *Pereskia aculeata*, serão também inclusas na revisão as espécies *Pereskia bleo* e *Pereskia grandifolia*.

De acordo com o estudo de Valente *et al.* (2007), o efeito anticancerígeno dos extratos de *Pereskia aculeata*, produzidos com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /metanol 1:1 e  $\text{H}_2\text{O}$  a 60 °C, foram investigados na concentração de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , utilizando as linhagens celulares murinas SP2/0 (mieloma), Neuro-2A (neuroblastoma), J774 (sarcoma), Ehrlich, BW (linfoma) e P3653 (mieloma). O extrato aquoso inibiu o crescimento de 4 das 6 células tumorais utilizadas (J774, SP2/0, P3653 e BW), sendo o melhor resultado observado para inibição de BW, igual a 72,4%. Enquanto isso, o extrato orgânico só foi eficaz contra o carcinoma de Ehrlich, cuja inibição foi de 46,2%, não sendo avaliado para a linhagem Neuro-2A. Os autores não discutiram a composição nem o rendimento dos extratos.

Malek *et al.* (2008) investigaram a atividade citotóxica da *Pereskia bleo* contra as células tumorais humanas KB (nasofaringe), CasKi (cervical), HCT-116 (cólon) e MCF-7 (mama), sendo a linhagem celular normal MRC-5 (fibroblasto) também empregada. Nesse estudo, os extratos foram produzidos por maceração com metanol à temperatura ambiente por 3 dias, após etapas de secagem e moagem das folhas (752,92 g) de *P. bleo*. O excesso de solvente foi evaporado sob pressão reduzida em rotaevaporador, resultando no extrato bruto, cujo rendimento foi de 10,6%. Esse extrato foi posteriormente fracionado em hexano, de modo

que a fração insolúvel foi submetida novamente ao fracionamento com acetato de etila e água (1:1). Os rendimentos obtidos nas etapas de fracionamento com hexano, acetato de etila e água foram de, respectivamente, 6,52%, 2,95% e 54,02%. Os autores identificaram a presença de 4 compostos nos extratos da espécie, sendo eles: fitol,  $\beta$ -sitosterol, 2,4-di-terc-butilfenol e vitamina E, os quais foram isolados. Quanto ao efeito antitumoral, o extrato metanólico apresentou citotoxicidade para todas as linhagens tumorais, com destaque para o melhor resultado com a linhagem KB (6,5  $\mu$ g/mL). As frações com hexano e acetato de etila foram eficazes contra as linhagens MCF-7 e KB, respectivamente, com atividades de 25  $\mu$ g/mL e 4,5  $\mu$ g/mL, sendo que o extrato aquoso não foi capaz de inibir o crescimento das células tumorais. Em todos os casos, a linhagem saudável não foi danificada, mostrando que a ação antitumoral foi seletiva.

Outro estudo que avaliou o potencial anticancerígeno da *Pereskia bleo* foi o de Wahab *et al.* (2009), em que os extratos foram produzidos via extração com Soxhlet, utilizando diversos solventes, dentre eles hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, cujos rendimentos foram de 3,42%, 1,54%, 1,87% e 7,61%, sucessivamente. O ensaio de atividade (MTT) foi realizado com duas linhagens tumorais, MCF-7 (mama) e HT-29 (cólon), sendo que, em divergência com os resultados obtidos anteriormente, nenhum dos extratos apresentou efeito antitumoral para as células utilizadas, tendo em vista que o IC<sub>50</sub> foi superior a 30  $\mu$ g/mL. Em decorrência de não ter sido observada a ação anticancerígena do extrato, os autores sugeriram que o mesmo possui diferentes constituintes químicos, impactando assim no potencial biológico, todavia, não realizaram a identificação do perfil fitoquímico.

Pinto *et al.* (2012) investigaram o efeito citotóxico dos extratos das folhas de *Pereskia aculeata* contra células tumorais MCF-7 (mama) e HL-60 (leucemia) por MTT. Os extratos foram obtidos pela técnica de maceração com metanol até a exaustão, obtendo o extrato bruto que, posteriormente, foi fracionado com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol; os autores não apresentaram o rendimento do processo. O conteúdo fenólico foi determinado pelo método de Folin-Denis, enquanto a caracterização fitoquímica do extrato metanólico e suas frações foi realizada por cromatografia em camada fina. Como resultado, observou-se a presença majoritária de fenóis, além de outros compostos como triterpenos e esteroides. Dentre os extratos, a fração de diclorometano apresentou maior conteúdo de fenóis e flavonoides. Por fim, todas as amostras exibiram efeitos citotóxicos moderados contra as células leucêmicas, ao passo que apenas as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e o precipitado mostraram ação contra as células de câncer de mama. Dessa forma, foi possível associar a

presença de compostos fenólicos com a redução de estresse oxidativo, que normalmente está associado ao desenvolvimento de câncer e outras doenças, de modo que esses constituintes podem estar associados ao potencial antitumoral. Em adição, nenhum efeito foi observado para as células não tumorais, comprovando a ação seletiva dos extratos.

Massocatto *et al.* (2021) avaliaram diferentes potenciais biológicos para os extratos produzidos através da maceração hidroalcóolica das folhas e frutos de *P. aculeata* e *P. grandifolia*, dentre elas, a ação anticancerígena. Todavia, os autores não avaliaram o perfil fitoquímico dos extratos. Os autores estabeleceram segundo o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, em que um extrato com uma média de log GI<sub>50</sub> maior do que 1,5 é considerado inativo. Adicionalmente, os pesquisadores empregaram o critério de Fouche *et al.* (2008), que considera a concentração necessária para inibir completamente a proliferação celular, e o dividiram em quatro categorias: inativa ( $TGI > 50 \mu\text{g/ml}$ ), atividade fraca ( $15 \mu\text{g/ml} < TGI < 50 \mu\text{g/ml}$ ), atividade moderada ( $6,25 \mu\text{g/ml} < TGI < 15 \mu\text{g/ml}$ ) e atividade potente ( $TGI < 6,25 \mu\text{g/ml}$ ). Os extratos receberam nomenclaturas segundo as espécies estudadas, *Pereskia aculeata* e *Pereskia grandifolia*, PA e PG, respectivamente, seguidos das letras L ou F, indicando extratos produzidos a partir das folhas (*leaves*) ou frutos.

Pelo primeiro critério, de todos os extratos, somente PGF mostrou atividade moderada para inibir a proliferação das células de leucemia (K562), além de um efeito fraco contra todas as demais linhagens, exceto melanoma (UACC-62). Já considerando o critério de Fouche *et al.* (2008), todos os extratos foram ativos contra leucemia, com os extratos PAL, PGL e PGF exibindo atividade potente e PAF com atividade fraca (MASSOCATTO *et al.*, 2021).

Apesar de haver indicações do potencial antitumoral de espécies do gênero *Pereskia*, nota-se a baixa quantidade de trabalhos que tratem, especificamente, da *Pereskia aculeata*. Em todas as pesquisas reportadas, os extratos foram produzidos a partir de técnicas convencionais de extração, baseadas no uso de solventes, sendo necessárias investigações empregando também técnicas alternativas de extração, como é o caso da extração por fluido supercrítico.

## 2.7. Considerações

A partir da revisão da literatura englobando aspectos como as diversas técnicas de extração empregadas para obtenção dos extratos de ora-pro-nóbis, o perfil fitoquímico, rendimento e potencial biológico, foi possível observar alguns pontos, como:

- As classes de metabólitos secundários presentes nos extratos de OPN estão associados a diversos potenciais biológicos, dentre eles, a ação anticancerígena;
- O uso de técnicas baseadas no uso de solventes, como a maceração e o Soxhlet, ainda são extensamente utilizadas para o preparo de extratos de espécies do gênero *Pereskia*;
- A técnica de extração, bem como o solvente empregado, afeta o perfil fitoquímico do extrato e, por consequência, seu potencial biológico;
- O metanol é um solvente extensamente utilizado na produção de extratos das folhas de ora-pro-nóbis;
- Há indícios do potencial anticancerígeno dos extratos de ora-pro-nóbis produzidos a partir de técnicas convencionais, principalmente contra linhagens de câncer de mama e leucemia;
- A extração com FSC, em geral, leva à obtenção de um extrato rico em componentes de baixa polaridade;
- O uso de etanol como cosolvente nos processos de extração supercrítica auxilia na obtenção dos constituintes de frações mais polares;
- Não foram encontrados trabalhos na literatura correlacionando o potencial antitumoral com extratos de *Pereskia aculeata* obtidos a partir de extração com fluido supercrítico;
- Os trabalhos realizados com fluido supercrítico não avaliaram o estudo cinético da extração;
- Pouco se discute sobre a modelagem do processo de extração das folhas de ora-pro-nóbis e
- Até o momento, apenas o grupo de trabalho de Torres *et al.* (2022) estudou a extração supercrítica da *Pereskia aculeata*.

Isso mostra que mais estudos no campo da química verde e uso de técnicas limpas de extração são necessárias. Além disso, nota-se também a necessidade de trabalhos que invistam na avaliação do potencial anticancerígeno da espécie, bem como a realização da modelagem matemática do processo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo, serão apresentados os materiais utilizados nos experimentos para a extração do óleo de ora-pro-nóbis. Serão abordados desde o pré-tratamento e coleta das folhas até o processo de extração, com destaque para a unidade disponível no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (LTAB) e as análises cromatográficas, realizadas em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Material vegetal**

As folhas de *Pereskia aculeata* foram coletadas em Juiz de Fora (Minas Gerais, Brasil), em agosto de 2021, na região de Terras do Comendador, coordenadas geográficas 21°66'7775"S e 43°29'5569"W, durante o período da manhã. Uma amostra da espécie (No. 57539) foi identificada e depositada no Herbário Leopoldo Krieger, da Universidade Federal de Juiz de Fora, para evidência futura.

##### **3.1.2. Solventes**

O dióxido de carbono empregado na extração supercrítica foi adquirido da White Martins (RJ), com pureza mínima 99,998%. O hexano P.A (mistura de isômeros) foi fornecido pela JT Baker (lote E07W72 – Avantor Sciences, Xalostoc, México) e álcool etílico P.A. (pureza de 99,8%) foi adquirido CAS Química (RJ).

### **3.2. Métodos**

##### **3.2.1. Pré-tratamento das Folhas de Ora-pro-nóbis**

Aproximadamente 7 kg de folhas de ora-pro-nóbis foram secas, primeiramente, em local ventilado à temperatura ambiente (cerca de 25 °C) durante 15 dias. Devido à existência de folhas nos diversos estágios de desenvolvimento e, com isso, com teores de umidade distintos, após a etapa inicial de secagem, as folhas foram levadas para estufa (Estufa Digital Timer SSD

7Lab) a 40 °C por 8 h, visando atingir um teor de umidade na faixa de 4 a 14%, conforme discutido por Pereira e Meireles (2010).

O teor de umidade da amostra foi aferido em uma balança de umidade (Marte, modelo ID50), em que 1 g das folhas secas e moídas foram alimentadas à balança que, após 30 min, atingiu 106 °C, resultando na massa seca do material. A umidade é, portanto, calculada conforme Equação 1, dado pela razão entre a massa seca ( $M_{seca}$ ) pela massa alimentada na balança ( $M_{úmida}$ ). A metodologia aplicada foi realizada em triplicata.

$$Umidade(\%) = 1 - \left( \frac{M_{seca}}{M_{úmida}} \right)$$
 Equação 1

Em seguida, as folhas secas foram moídas em um liquidificador doméstico, visando atingir o tamanho ideal de partícula, para posterior extração. A transformação das folhas *in natura* até a obtenção do material moído está representada na Figura 5. Finalizadas as etapas de secagem e moagem, cerca de 1 kg do material foi submetido à análise granulométrica, utilizando peneiras de #10 a #65 Mesh, para determinação do diâmetro de Sauter, indicando o tamanho da amostra contendo as folhas.



**Figura 5** – Folhas de ora-pro-nóbis *in natura*, secas e moídas. Fonte: Próprio autor.

### 3.2.2. Determinação da densidade aparente e porosidade do leito

A densidade da amostra foi determinada por picnometria utilizando água (24 °C), conforme Equações 2 e 3. Já a porosidade do leito, foi calculada pela Equação 4 que, por definição, determina os espaços vazios do meio em que se dá a extração.

$$\rho_{eq} = \frac{m_{p+s} - m_p}{(m_{p+l} - m_p) - (m_{p+s+l} - m_{p+s})} \quad \text{Equação 2}$$

$$\rho_{eq} = \frac{\rho_{sólido}}{\rho_{água}} \quad \text{Equação 3}$$

$$\varepsilon = \frac{V_{extrator} - V_{amostra}}{V_{extrator}} \quad \text{Equação 4}$$

Em que as massas do picnômetro vazio, do picnômetro com o material vegetal, do picnômetro com material vegetal e água e, por fim, apenas do picnômetro com água são dadas por  $m_p$ ,  $m_{p+s}$ ,  $m_{p+s+l}$  e  $m_{p+l}$ , respectivamente. A densidade real do sólido é dada por  $\rho$ , enquanto a densidade equivalente é dada pela razão entre a densidade do sólido e da água a 24 °C (0,977 g/cm<sup>3</sup>), que são representadas por  $\rho_{sólido}$  e  $\rho_{água}$ . A porosidade do leito e o volume são representados por  $\varepsilon$  e  $V$ .

### 3.2.3. Extração com Soxhlet

Na extração utilizando o método de Soxhlet, foram adicionados 20 g do material vegetal (balança Mettler Toledo PM200) previamente moído e seco a um cartucho no extrator Soxhlet, o qual foi conectado a um condensador. Um balão contendo 500 mL de hexano P.A foi conectado ao extrator e posicionado sobre uma placa de aquecimento e o processo de extração ocorreu ao longo de 6 h. Ao final do processo, o solvente foi recuperado, possibilitando a coleta do óleo extraído para posterior determinação da massa. A amostra resultante foi identificada como OPN-SO.

### 3.2.4. Maceração

A extração por maceração dinâmica foi conduzida utilizando 20 g da planta previamente triturada e seca, pesada em balança Mettler Toledo PM200. À massa, foram adicionados 200 mL de hexano P.A., e ao longo de uma semana foi realizada a renovação diária do solvente para maximizar o rendimento da extração. Durante todo o processo, uma agitação constante foi mantida a uma velocidade de 150 rpm. Após a conclusão do período de maceração, os volumes

resultantes foram coletados e a mistura obtida foi vertida em um filtro para separar o resíduo sólido. Em seguida, o resíduo foi submetido a uma etapa de secagem sob pressão reduzida em um evaporador rotatório e o extrato obtido por maceração foi denominado OPN-MD.

### **3.2.5. Extração por Ultrassom**

Para a extração pelo método de ultrassom, inicialmente, utilizou-se 20 g das folhas secas e moídas de ora-pro-nóbis (balança Metler Toledo PM200) e 200 mL de hexano P.A. O processo de extração foi realizado sem réplicas em dois ciclos, empregando banho ultrassônico Branson (3510R-MTHz 50 – 60 Hz) e shaker IKA-Werker (KS501), cada um com a duração de uma hora. A solução resultante foi coletada e submetida à secagem para a remoção do solvente remanescente, sendo a amostra produzida via ultrassom intitulada OPN-US.

### **3.2.6. Extração com Fluido Supercrítico**

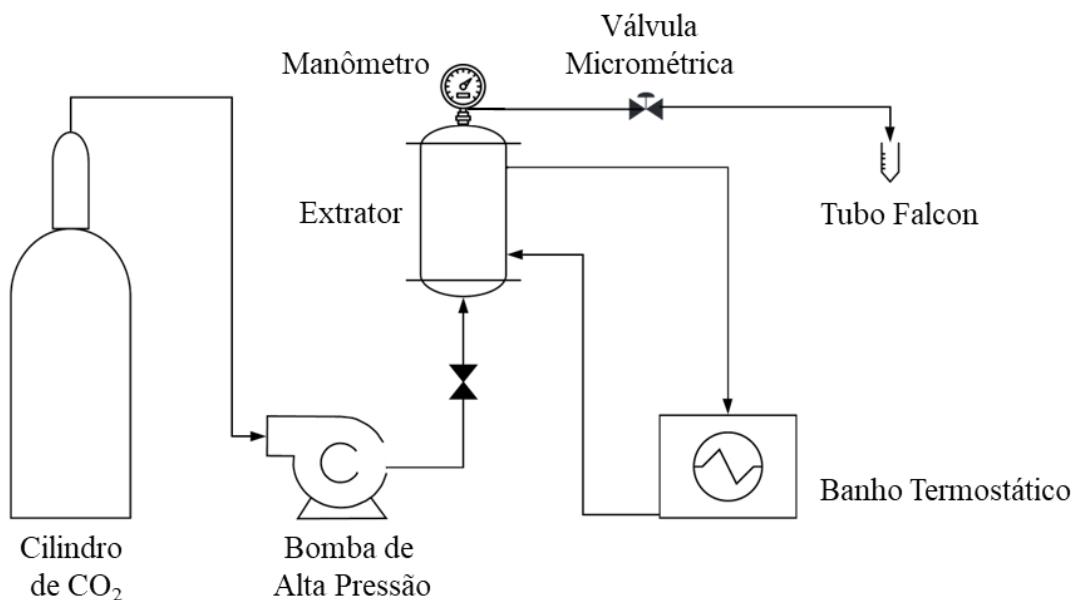
Para a extração com fluido supercrítico, foi empregado o aparato experimental presente no LTAB, conforme já mencionado em outras publicações do grupo de pesquisa, como Sartori *et al.* (2017), Paschoal (2018) e Bessa *et al.* (2020).

#### **3.2.6.1. Aparato Experimental**

A unidade experimental, representada na Figura 6, foi empregada para a realização dos ensaios para a extração supercrítica das folhas de ora-pro-nóbis. Inicialmente, o material vegetal moído foi adicionado ao extrator de aço inoxidável 316S de 42 mL, onde foram utilizadas duas vedações nas extremidades do diâmetro interno do extrator, visando evitar o carreamento do material vegetal moído. O extrator foi conectado à linha de CO<sub>2</sub>, pressurizada pela ação de uma bomba de alta pressão (modelo Palm G100) e ao banho de circulação (Thermo HAAKE K10, adaptado com um controlador digital com precisão de  $\pm 0,02$  °C, com o propósito de manter constante a temperatura durante o experimento. A coleta das amostras foi realizada pela abertura da válvula micrométrica (Whitney, modelo SS-31RS4), sem haver queda de pressão no extrator, sob uma vazão de aproximadamente 6,04 mL/min.

Desse modo, no início do processo, 10 g de material moído foram alimentados ao extrator com esferas de vidro, a fim de promover maior homogeneização do meio e evitar a formação de “caminhos preferenciais” durante a extração. Em seguida, o extrator foi acoplado

à linha pressurizada pela bomba de alta pressão e mantido sob temperatura constante pela ação de um banho termostático, nas condições previstas de acordo com o planejamento de experimentos. O CO<sub>2</sub> entra em contato com o material vegetal por um movimento ascendente, promovendo a extração do material. O óleo foi coletado em tubo Falcon (polipropileno) em intervalos de 10 minutos, sendo pesado após cada coleta em balança analítica (marca BEL, modelo M214Ai, e = 1 mg e d = 0,1 mg). O experimento foi realizado até a saturação da amostra, observada pela obtenção de 3 pontos consecutivos com mesma massa, aferindo-se desse modo a massa de óleo extraída acumulada para cada condição experimental.



**Figura 6** – Esquema representativo da unidade de extração supercrítica. Fonte: Próprio autor.

### 3.2.6.2. Planejamento de Experimentos

O Planejamento de Experimentos do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de 2<sup>a</sup> ordem foi empregado para definir as condições experimentais estudadas. A escolha por esse tipo de planejamento teve por objetivo otimizar a quantidade de experimentos realizados e permitir a construção de uma superfície de resposta, visando avaliar a influência da modificação dos parâmetros de processo, pressão (P) e temperatura (T), na investigação da condição experimental ótima. A partir da revisão da literatura, optou-se por trabalhar com a pressão na faixa de 200 a 500 bar e a temperatura de 40 a 80 °C. A matriz do planejamento de experimentos é apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4** - Planejamento de experimentos com condições operacionais (pressão e temperatura) expressas em variáveis codificadas e independentes.

Experimento	Variáveis independentes		Variáveis codificadas	
	T [°C]	P [bar]	T	P
1	46	244	-1	-1
2	46	456	-1	+1
3	74	244	+1	-1
4	74	456	+1	+1
5	40	350	-1,414	0
6	60	200	0	-1,414
7	80	350	+1,414	0
8	60	500	0	+1,414
9	60	350	0	0
10	60	350	0	0
11	60	350	0	0

Conforme pode ser observado na Tabela 4, são no total 11 experimentos, sendo 9 distintos e 3 referentes a uma triplicata no ponto central. Visando esclarecer as correspondências entre as variáveis codificadas e independentes para P e T, a Tabela 5 exibe a correlação entre os 5 níveis trabalhados, sendo 0 o ponto central, 1 e -1 os pontos cúbicos e 1,4142 e -1,4142 os pontos axiais. Cabe destacar que o ponto axial ( $\alpha$ ) possui o valor de 1,4142 em função do número de variáveis independentes ( $k = 2$ ), dado que o valor de  $\alpha$  é comumente calculado segundo a Equação 5, visando conferir ortogonalidade e particularizando o DCCR, de modo a minimizar os desvios da superfície de resposta não-quadrática ou conferir ao delineamento a propriedade rotacional (MATEUS, BARBIN e CONAGIN, 2001).

$$\pm\alpha = \pm\sqrt[4]{2^k}$$

Equação 5

Da Tabela 5 é possível observar que, por exemplo, o ponto central é composto pelo par 60 °C e 350 bar. Além disso, as condições mínimas e máximas avaliadas para a temperatura e a pressão são alocadas nos pontos axiais,  $\pm\sqrt{2}$ . Por fim, T e P são variáveis independentes e as variáveis de resposta estudadas abrangem o rendimento das extrações e a solubilidade.

**Tabela 5** – Correlação entre variáveis independentes e codificadas.

Variável codificada	Variáveis independentes	
	T [°C]	P [bar]
1,4142	80	500
1	74	456
0	60	350
-1	46	244
-1,4142	40	200

### 3.2.7. Rendimentos

Para a determinação do rendimento da extração, diferentes cálculos podem ser empregados. Desse modo, serão apresentados os métodos de cálculo para determinação dos rendimentos **R**, **e** e **Y**. O rendimento **R**, é dado pela razão entre a massa de óleo extraída em um tempo ( $M_{oe}$ ) e a massa total alimentada ao extrator ( $M_a$ ), de acordo com a Equação 6.

$$R = \frac{M_{oe}}{M_a}$$

Equação 6

Já o rendimento **e**, determinado pela Equação 7, é o rendimento em base livre de soluto, obtido por uma relação entre a massa extraída em um tempo pela massa total alimentada em base livre de soluto, calculado pela Equação 8. A massa em base livre de soluto depende da

quantidade de óleo presente nas folhas. Essa massa de óleo foi calculada levando-se em consideração a extração com Soxhlet, visto que é um método exaustivo de extração.

$$e = \frac{100M_{oe}}{M_{abls}}$$

Equação 7

$$M_{abls} = \left( \frac{1 - M_a}{100} \right) R_{Soxhlet}$$

Equação 8

Por fim,  $Y$  é rendimento normalizado, determinado a partir de uma razão entre a massa extraída em um tempo ( $M_{oe}$ ) e a massa total extraída ( $M_{t,extraída}$ ), conforme Equação 9.

$$Y = \frac{M_{oe}}{M_{t,extraída}}$$

Equação 9

#### 4.2.8. Solubilidade

A solubilidade experimental, calculada pela Equação 10, permite estabelecer uma relação entre a massa de óleo ou de um determinado constituinte presente no soluto extraído com a quantidade de solvente empregada na extração.

$$S = \frac{m}{Q_{T,P}t}$$

Equação 10

Em que  $S$  é a solubilidade do óleo na condição experimental,  $m$  é a quantidade de massa extraída em um tempo  $t$  e  $V_z$  é a vazão do  $CO_2$ -SC, determinada pela Equação 11.

$$Q_{T,P} = \frac{Q_{atm} \rho_{atm}^{CO_2}}{\rho_{T,P}^{CO_2}}$$

Equação 11

Desse modo, observa-se que a vazão do CO<sub>2</sub> em determinada condição T e P (Q<sub>T,P</sub>), é calculada pela razão entre o produto da vazão volumétrica do CO<sub>2</sub> (Q<sub>atm</sub>) e sua massa específica nas condições ambientes (ρ<sub>atm</sub><sup>CO<sub>2</sub></sup>) pela massa específica na condição da extração (ρ<sub>T,P</sub><sup>CO<sub>2</sub></sup>).

### **3.2.9. Métodos de Análise dos Extratos**

#### **3.2.9.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS)**

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo Agilent modelo 6890N, acoplado a um detector de massas Agilent modelo 5973. Foram empregadas duas configurações distintas para as análises, utilizando um injetor tipo *split* com diferentes divisões de vazões. A coluna utilizada foi uma SUPELCO 28471, modelo 58092-04A, do tipo SLB-5MS, com dimensões de 33 m x 250 μm x 0,25 μm. O gás de arraste utilizado foi o hélio a uma vazão constante. O sistema de auto injeção PAL GC Sampler 120 foi empregado.

Na primeira análise, utilizou-se uma divisão de vazão do injetor *split* de 50:1, com vazão de 50 mL/min e gás carreador com uma vazão de 1 mL/min. Foi injetado um volume de 1 μL, e a programação do forno teve início a 40 °C. A análise foi realizada ao longo de 45,5 minutos, utilizando um perfil de aquecimento em duas etapas. A primeira etapa foi realizada a uma taxa de 3 °C/min, alcançando 145 °C. A segunda etapa foi conduzida a uma taxa de 10 °C/min, atingindo uma temperatura final de 250 °C.

Na segunda análise, a divisão de vazão do *split* foi de 10:1, a uma vazão de 8 mL/min, mantendo o volume de injeção. Nesse caso, a temperatura inicial do forno foi ajustada para 60 °C. O tempo total de análise foi de 26,5 minutos, com uma taxa constante de aquecimento de 10 °C/min, alcançando uma temperatura final de 325 °C.

#### **3.2.9.2. Ensaios de viabilidade celular**

O efeito dos extratos de ora-pro-nóbis sobre a proliferação de linhagens de câncer de pulmão (A549), leucemia humana (K562) e câncer de mama (MCF7) foram conduzidos conforme Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Farmacologia Molecular POP.FAR.RPT11M.201.0011.

As células tumorais foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo, e mantidas em fase log de crescimento. Vinte e quatro horas antes do tratamento com as amostras, 100  $\mu$ L da suspensão celular ( $5 \times 10^4$  células/mL) foram adicionados a poços de placas de 96 poços e mantidas em estufa com atmosfera 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C.

As amostras OPN-1, OPN-2, OPN-3 e OPN-4, fornecidas pelo Laboratório TECBio de Farmanguinhos, foram recebidas e solubilizadas em DMSO (40 mM no caso de substância pura e 60 mg/mL no caos de fração ou extrato). As amostras foram conservadas a -20 °C até o dia do experimento quando foram diluídas, imediatamente antes do uso, em meio de cultivo celular DMEM, suplementado com 10% soro bovino fetal e acrescido de 100 U/L penicilina, 0,1 mg/L estreptomicina e 110 mg/L de piruvato de sódio.

O tratamento com as amostras recebidas foi realizado em múltiplas concentrações (0,015  $\mu$ g/mL, 0,015  $\mu$ g/mL, 1,5  $\mu$ g/mL, 15  $\mu$ g/mL e 150  $\mu$ g/mL), em triplicata. Staurosporina (SIGMA, código S4400; 0,467  $\mu$ g/mL = 1  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo de inibição.

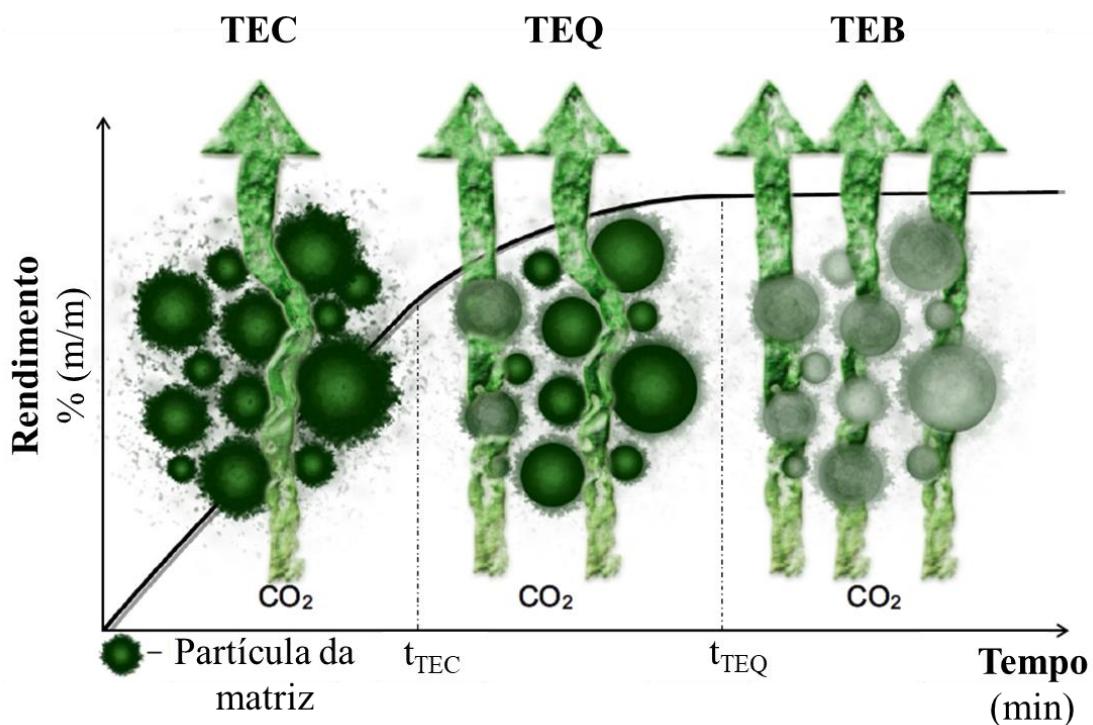
Decorridas 48 h de exposição ao tratamento, foi adicionado o azul de tiazolil (MTT; SIGMA código M5655) e a placa mantida em estufa de CO<sub>2</sub> por 4 h. Finalizado o tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e os cristais de farmazan, formados pela atividade celular, foram solubilizados com DMSO (SIGMA, código D4540). Após completa solubilização, foi realizada a determinação da densidade óptica em leitor de microplacas a 570 nm (Synergy H1MF; BioTek).

## 4. MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

O presente trabalho abrange duas modelagens relacionadas ao processo de extração, conforme será visto adiante: a modelagem cinética das curvas de extração e o estudo de solubilidade. Em ambos os casos, diversos modelos são utilizados para descrever as curvas de extração nas diferentes condições experimentais e predizer os dados de solubilidade.

### 4.1. Modelagem cinética

O comportamento da extração com fluido supercrítico é observado a partir de um estudo cinético, dado pela representação gráfica da massa acumulada extraída pelo tempo. Nesse contexto, diversos são os fatores que podem afetar essas curvas cinéticas, como o fluxo de solvente, a polaridade do solvente, o tamanho do leito de partículas, as condições da extração (pressão e temperatura) e a matéria-prima vegetal utilizada. Todavia, em geral, as curvas cinéticas apresentam um comportamento bem definido, onde podem ser identificadas três regiões distintas, conforme representado na Figura 7 (SILVA *et al.*, 2016).



**Figura 7** – Etapas do processo de extração supercrítica. Adaptado de SILVA *et al.* (2016).

Assim, observa-se na Figura 7 a mudança na disponibilidade das partículas na matriz vegetal com a evolução da extração, marcada pelos períodos TEC, TEQ e TEB, conforme descritos a seguir.

- TEC – Taxa de Extração Constante: a convecção controla a transferência de massa e o soluto está facilmente acessível, uma vez que a etapa de moagem expõe o óleo, o qual passa a se localizar na superfície do material vegetal;
- TEQ – Taxa de Extração em Queda: período em que se observa a competição entre os fenômenos de difusão e convecção, cuja extração ocorre tanto a partir do óleo remanescente na superfície do material vegetal, quanto do óleo contido dentro da partícula sólida e
- TEB – Taxa de Extração Baixa: a extração é controlada pela difusão dentro das partículas sólidas e se torna mais difícil acessar o soluto.

As diferenças de comportamento nas diferentes partes da curva de extração se justificam pois, inicialmente, o soluto está mais disponível na matriz vegetal e, posteriormente, localiza-se em regiões intracelulares, de mais difícil acesso para o solvente. A fim de contornar essa dificuldade decorrente da localização do soluto na matriz vegetal, torna-se necessário promover a redução da resistência à transferência de massa (TM) realizando um pré-tratamento do material vegetal, sendo a moagem muito utilizada visando melhorar a eficácia da extração (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

Segundo a literatura, diversos autores se dedicaram ao desenvolvimento de modelos para descrever a cinética da extração com fluido supercrítico para diferentes matérias-primas. Assim, considerando trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (SARTORI *et al.*, 2017; BESSA *et al.*, 2020; PASCHOAL, 2018), optou-se por utilizar os seguintes modelos: Brunner (1984), Sovová (1994), Reverchon e Osseo (1994), Zeković *et al.* (2003) e Esquível *et al.* (1999). Dessa forma, o grupo de pesquisa poderá comparar o comportamento frente às diferentes matérias-primas.

#### **4.1.1. Brunner (1984)**

O modelo de Brunner (1984) foi desenvolvido, originalmente, para a modelagem cinética da extração com fluido supercrítico de sementes de colza e descafeinação de grãos de café. De acordo com o autor, o processo de extração, que ocorre em um leito fixo de esferas, se

dá em duas etapas: transporte das substâncias do material sólido para a interface sólido-gás e transição e transporte das substâncias no gás. Para isso, considerou-se que a transferência de massa é instável e a principal força motriz do processo é a concentração, cuja variação depende da transferência de massa e tempo, ponderando ainda sobre a influência da vazão do gás.

A Equação 12 exibe uma simplificação para a equação proposta ao modelo, que é originado a partir de equações diferenciais, sendo aproximado pelo primeiro termo da série de Fourier.

$$R = x_o [1 - e^{-kt}]$$

Equação 12

Assim, o rendimento (R), calculado pela Equação 12, é função da taxa constante de extração (k) e do tempo (t).

#### 4.1.2. Sovová (1994)

O modelo de Sovová, proposto em 1994, foi concebido para a modelagem de curvas cinéticas de extração supercrítica de vegetais moídos, baseado nas seguintes premissas:

- o solvente flui axialmente com velocidade superficial sobre o leito de plantas moídas em um extrator cilíndrico;
- o solvente é livre de soluto na entrada do extrator ( $L = 0$ );
- $T$  e  $P$  são constantes durante o processo;
- o leito sólido é homogêneo, tanto em relação ao tamanho de partículas quanto à distribuição inicial de soluto;
- parte do soluto fica diretamente exposta ao solvente devido ao rompimento das células vegetais durante a moagem, configurando a etapa rápida de extração e
- há uma etapa mais lenta de extração, dado que parte do material é de difícil acesso ao solvente (sóluto contido dentro das células não rompidas).

Nesse contexto, o autor propõe três equações, visando representar os diferentes períodos de extração, conforme Figura 7, previamente apresentada. Com isso, as Equações 13 a 15 representam a modelagem dos três estágios da extração, cujo limite de cada período é dado por  $q_m$  e  $q_n$ , calculados conforme Equações 16 e 17.

$$e = qy_r \left[ 1 - e^{-z} \right], q < q_m \quad \text{Equação 13}$$

$$e = y_r \left[ q - q_m e^{z_m - z} \right], q_m \leq q < q_n \quad \text{Equação 14}$$

$$e = x_o - \frac{y_r}{W} \ln \left\{ 1 + \left[ e^{\frac{W \frac{x_o}{y_o}}{y_r}} - 1 \right] e^{W(q_m - q)} \frac{x_k}{x_o} \right\}, q \geq q_n \quad \text{Equação 15}$$

$$q_m = \frac{x_o - x_k}{y_r Z} \quad \text{Equação 16}$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \left[ \frac{x_k + (x_o - x_k) e^{\frac{W \frac{x_o}{y_r}}{y_r}}}{x_o} \right] \quad \text{Equação 17}$$

Em que  $e$  é o rendimento em base livre de soluto (Equações 13 a 15),  $\varepsilon$  é a porosidade do leito,  $q$  é a vazão de solvente,  $\rho$  é a densidade do solvente,  $y_r$  é a solubilidade,  $x_o$  é a quantidade inicial de soluto na amostra,  $x_k$  é a quantidade de soluto facilmente acessível e  $Z$  e  $W$  são, respectivamente, os parâmetros do período de extração rápida e lenta. Todavia, é possível observar que, para o cálculo de  $q_m$  e  $q_n$ , limites de intervalo entre as diferentes etapas de extração, torna-se necessário determinar outros termos, os quais são obtidos pela resolução das Equações auxiliares Equação 18 a Equação 21.

$$\frac{Z}{Z} = \frac{y_r}{Wx_o} \ln \left[ \frac{x_o e^{W(q - q_m)} - x_k}{x_o - x_k} \right] \quad \text{Equação 18}$$

$$Z = \frac{k_f a_o \rho}{\dot{q}(1 - \varepsilon) \rho_s} \quad \text{Equação 19}$$

$$W = \frac{k_s a_o}{\dot{q}(1 - \varepsilon)} \quad \text{Equação 20}$$

$$q = \frac{Q}{N}$$

Equação 21

Em que  $k_f$  e  $k_s$  são, na ordem, os coeficientes de transferência de massa das fases fluida e sólida,  $\rho_s$  é a densidade do sólido,  $Q$  é a massa de solvente,  $N$  é a massa da fase sólida livre de soluto,  $\dot{q}$  é a taxa de fluxo de massa do solvente relacionada à  $N$  e  $Z_w$  é  $Z$  na coordenada do limite entre a extração rápida e lenta. Cabe destacar que  $k_f$  está relacionado à etapa rápida da extração, enquanto o  $k_s$  está atrelado à fase lenta e, com isso, por definição, tem-se que  $k_f$  é maior que  $k_s$ .

#### 4.1.3. Reverchon e Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003)

Reverchon e Osseo (1994) estabeleceram um modelo cinético considerando a contribuição dos fenômenos da transferência de massa por convecção e difusão para a extração supercrítica do óleo de manjericão. Para isso, os autores adotaram enquanto hipóteses que a partícula esférica e porosa é formada por uma matriz insolúvel e um soluto uniformemente distribuído. Além disso, o processo de extração ocorre em 3 estágios consecutivos. No primeiro, ocorre a difusão de  $\text{CO}_2$  no filme ao redor da partícula, seguido da penetração e difusão na partícula. Em seguida, há a solubilização dos compostos no solvente supercrítico e, por fim, a difusão através da partícula.

Nesse contexto, é realizado um balanço material em coordenadas esféricas para uma partícula. Todavia, uma vez que todas as partículas no interior do leito apresentam a mesma forma, tamanho e comportamento, o modelo pode ser estendido a todo o extrator. Através do emprego da primeira lei de Fick e da transformada de Fourier para a resolução analítica do sistema de equações, obtém-se a Equação 22.

$$Y = 100 \left[ 1 - \exp \left( \frac{-k_p t}{\frac{(1-\varepsilon)V\rho}{W} + k_p t_i} \right) \right]$$

Equação 22

Conforme indicado pelos autores, considera-se que o tempo de extração ( $t_i$ ) é muito maior que o tempo de residência ( $V\rho\epsilon/W$ ), o que leva à versão final do modelo (Equação 23).

$$Y = 100 \left[ 1 - e^{-\frac{t}{t_i}} \right]$$

Equação 23

Em que  $Y$  é o rendimento normalizado (Equação 23),  $\epsilon$  é a porosidade do leito,  $\rho$  é a densidade do fluido,  $V$  é o volume do extrator,  $W$  é a vazão do solvente,  $t$  é o tempo da extração,  $t_i$  é o tempo de difusão interna e  $k_p$  é o coeficiente de partição volumétrica do extrato entre as fases sólida e fluida no equilíbrio.

Zeković *et al.* (2003), ao estudarem a modelagem cinética da extração com fluido supercrítico do óleo de tomilho, sugeriram uma modificação ao modelo inicialmente desenvolvido por Reverchon e Osseo (1994). Nesse caso, os autores consideraram que o termo  $t_i$  poderia ser aproximado por uma constante, originando um novo modelo, conforme Equação 24. Nesse caso,  $a$  é uma constante que representa o tempo de difusão interna e,  $b$ , é o parâmetro de correção.

$$Y = 100 \left[ 1 - e^{at+b} \right]$$

Equação 24

#### 4.1.4. Esquivel *et al.* (1999)

A modelagem cinética do processo de extração supercrítica do óleo da casca de oliva foi realizada por Esquivel *et al.* (1999). Enquanto hipóteses, os autores consideraram o uso de uma equação empírica simples para representar o rendimento *versus* o tempo de extração, de modo que a variação do rendimento com o tempo predito por esse modelo é similar à variação de massa adsorvida com a pressão do adsorvato dado pela isoterma de Langmuir. Nesse caso, o modelo não é capaz de considerar as interações entre o soluto e matriz sólida ou o fracionamento do óleo durante o processo. A Equação 25 representa o modelo proposto.

$$e = e_{\text{lim}} \frac{t}{b+t}$$

Equação 25

Em que  $e$  é o rendimento em base livre de soluto,  $e_{\text{lim}}$  é o rendimento máximo para um tempo de extração infinito e  $b$  é o parâmetro relacionado à vazão mássica, pressão e temperatura.

## 4.2. Solubilidade

A solubilidade de substâncias em um sistema é influenciada por diversos fatores, incluindo as condições de temperatura (T) e pressão (P). Além disso, características como polaridade, massa molecular (MM) e pressão de vapor ( $P_{vap}$ ) dos componentes também desempenham um papel significativo nesse processo. Um aspecto notável é o impacto complexo da temperatura, visto que o aumento de T tende a reduzir a solubilidade, todavia, aumenta a  $P_{vap}$  dos componentes, o que melhora a solubilidade do FSC (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

Em paralelo à aplicação de modelos cinéticos para prever o comportamento da extração ao longo do tempo, a investigação da solubilidade assume um papel crucial. A compreensão do equilíbrio de fases e das características de solubilidade é fundamental para o planejamento de processos de separação eficazes. Com isso, a seguir serão discutidas a metodologia para o cálculo da solubilidade experimental bem como os modelos empregados para previsão dos dados.

### 5.2.1. Solubilidade Experimental

A solubilidade experimental ( $S$ ) é calculada através da razão entre a massa de óleo extraída ( $m$ ) em determinada condição operacional e o volume de solvente, que por sua vez é calculado pelo produto da vazão de solvente ( $V_z$ ) e o tempo da extração ( $t$ ), conforme Equação 26.

$$S = \frac{m}{V_z t}$$

Equação 26

### 4.2.2. Modelos de solubilidade

Os modelos de solubilidade são empregados a fim de predizer dados a partir de distintas condições operacionais. Dentre os modelos utilizados pelo grupo de trabalho, conforme apontado por Bessa (2018), destacam-se: Chrastil (1982), Adachi e Lu (1983), del Valle e Aguilera (1988) e Gordillo *et al.* (1999).

#### 4.2.2.1. Chrastil (1982)

Chrastil (1982) tinha por objetivo determinar a solubilidade de líquidos e sólidos, como os ácidos oleico e esterárico, colesterol e  $\alpha$ -tocoferol em dióxido de carbono supercrítico a diferentes condições de temperatura e pressão. Isso se justifica pois o perfil de solubilidade dos componentes muda significativamente de acordo com as condições operacionais do sistema.

O desenvolvimento do modelo proposto pelo autor teve como base associações entre leis de entropia, visando correlacionar a solubilidade diretamente com a densidade do gás, de modo a evitar o emprego de equações de estado que, além de complexas, resultam em elevados desvios dos dados experimentais. Assim, os principais passos para o desenvolvimento do modelo de Chrastil (1982), foram:

- Calcular a concentração de equilíbrio  $K = \frac{[AB_k]}{([A][B])^k}$  entre um soluto **A**, associado a **k** moléculas de um gás **B**, que forma uma molécula de complexo solvato **AB<sub>k</sub>**;
- Aproximar  $[A]$  pela equação de Clausius-Clapeyron  $\ln[A] = \frac{\Delta H_{solv}}{RT} + q_v$ , em que  $\Delta H_{solv}$  é o calor de solvatação e  $q_v$  é uma constante e
- Considerar que  $[A] \ll [AB_k]$ , uma vez que a maior fração de A está na forma do complexo  $AB_k$ .

Por fim, o modelo proposto por Chrastil (1982) está representado na Equação 27, em que **S** é a solubilidade calculada pelo modelo, **p** a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico, **T** a temperatura e **k, a e b** são os parâmetros a serem estimados.

$$S = \rho^k \exp\left(\frac{a}{T} + b\right)$$

Equação 27

#### 4.2.2.2. Adachi e Lu (1983)

Após a publicação da abordagem desenvolvida por Chrastil (1982) e o sucesso do autor em correlacionar os dados modelados com resultados experimentais, Adachi e Lu (1983)

propuseram uma modificação para o modelo original. O objetivo de Adachi e Lu (1983) era correlacionar a solubilidade de sólidos e líquidos em CO<sub>2</sub> supercrítico e etileno em 37 sistemas distintos. Para alcançar esse objetivo, eles consideraram o parâmetro *k* como dependente da densidade, conforme a Equação 35. Com a aplicação dessa mudança na Equação 28, obtém-se o modelo de Adachi e Lu (1983), representado pela Equação 29, em que *e*<sub>1</sub>, *e*<sub>2</sub>, *e*<sub>3</sub>, **a** e **b** são os parâmetros do modelo.

$$k = e_1 + e_2 \rho + e_3 \rho^2 \quad \text{Equação 28}$$

$$S = \rho^{(e_1 + e_2 \rho + e_3 \rho^3)} \exp\left(\frac{a}{T} + b\right) \quad \text{Equação 29}$$

Cabe destacar que, no presente trabalho, a equação de Adachi e Lu (1983) é truncada no termo *e*<sub>2</sub>, de modo que *e*<sub>3</sub> vale zero. Os autores notaram uma significativa melhora nos desvios obtidos entre a equação original de Chrastil (1982) e sua modificação por Adachi e Lu (1983). Por exemplo, no sistema CO<sub>2</sub>-difenilamina, foi constatada uma redução no desvio de mais de 50%.

#### 4.2.2.3. del Valle e Aguilera (1988)

O modelo proposto por Chrastil (1982) serviu de base para o estudo de del Valle e Aguilera (1988), que buscavam prever a solubilidade de óleos vegetais em dióxido de carbono supercrítico como função da temperatura e da densidade. Para isso, os autores propuseram uma modificação no modelo original, incluindo um termo adicional na exponencial, conforme apresentado na Equação 30, cujos parâmetros a serem estimados são *k*, **a**<sub>1</sub>, **a**<sub>2</sub> e **b**.

$$S = \rho^k \exp\left(\frac{a_1}{T} + \frac{a_2}{T^2} + b\right) \quad \text{Equação 30}$$

Os autores validaram o modelo proposto para uma ampla faixa de temperaturas (293 – 353 K) e pressões (150 – 880 atm) para os óleos vegetais de soja, girassol e algodão. Desse modo, os autores concluíram que o modelo era adequado para representar a solubilidade

de óleos vegetais em dióxido de carbono supercrítico e obtiveram boa concordância entre os valores previstos e os valores experimentais medidos.

#### 4.2.2.4. Gordillo *et al.* (1999)

Gordillo *et al.* (1999) trataram duas abordagens normalmente utilizadas para a predição de dados de solubilidade: os modelos empíricos e semiempíricos. No presente trabalho, a primeira abordagem será discutida, uma vez que os modelos semiempíricos possuem elevada complexidade, como uso de equações de estados, um elevado esforço computacional e propriedades físicas de difícil obtenção.

Em seu trabalho, Gordillo *et al.* (1999) discutiram a aplicação dos modelos empíricos desenvolvidos por Chrastil (1982), del Valle e Aguilera (1988) e Yu *et al.* (1994) para modelar a solubilidade da penicilina G (antibiótico) em CO<sub>2</sub> supercrítico em condições de temperatura variando de 313,15 a 333,15 K e pressões entre 100 e 350 bar. Todavia, os autores observaram que todos os modelos apresentaram elevados desvios; os modelos Chrastil e del Valle e Aguilera, apresentaram os maiores desvios, ambos de 32,4%, enquanto o melhor resultado foi obtido pelo modelo de Yu *et al.*, cujo desvio foi de 22,9%.

Tendo em vista a necessidade de obter uma melhor correlação para modelar os dados de solubilidade da penicilina G em CO<sub>2</sub>-SC, Gordillo *et al.* (1999) propuseram uma modificação ao modelo de Yu *et al.* (1994), visando reduzir os desvios entre os valores experimentais e preditos. As Equações 31 e 32 mostram o modelo original de Yu *et al.* (1994) e a mudança proposta por Gordillo *et al.* (1999).

$$S = c_0 + c_1 P + c_2 P^2 + c_3 PT(1-S) + c_4 T + c_5 T^2 \quad \text{Equação 31}$$

$$\ln S = c_0 + c_1 P + c_2 P^2 + c_3 PT + c_4 T + c_5 T^2 \quad \text{Equação 32}$$

Gordillo *et al.* (1999) usaram a Equação 32 e observaram que o modelo modificado apresentou uma correlação satisfatória entre os dados preditos e experimentais. Os autores conseguiram reduzir significativamente o desvio apresentado pelo modelo original de Yu *et al.* (1994) em mais de 37%, alcançando um desvio de apenas 14,4%.

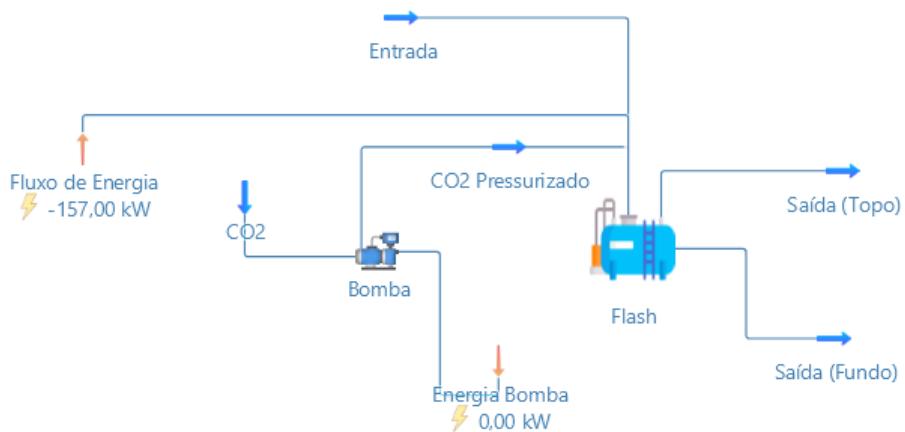
### 4.3. Desvio Relativo Médio (DRM%)

A variação entre dados preditos e calculados pelos diferentes modelos foi realizada a partir do desvio relativo médio, denominado DRM%, conforme Equação 33, em que  $N_{\text{exp}}$  é o número de pontos experimentais.

$$DRM \% = \frac{100}{N_{\text{exp}}} \sum \left| \left( \frac{(\text{Experimental}) - (\text{Calculado})}{(\text{Experimental})} \right) \right| \quad \text{Equação 33}$$

### 4.4. Simulação

A simulação da separação em condições supercríticas dos componentes observados nos extratos de ora-pro-nóbis foi realizada empregando o software DWSIM, com o pacote de propriedades Soave-Redlich-Kwong. O objetivo dessa simulação foi de permitir o mapeamento prévio das melhores condições de processo visando a extração dos compostos de interesse, conforme fluxograma apresentado na Figura 8.



**Figura 8** – Fluxograma simplificado do processo de extração e separação supercrítica do software DWSIM.

Conforme mostrado na Figura 8, de forma concisa, o CO<sub>2</sub> é pressurizado pela ação de uma bomba e a corrente de entrada alimentada ao Flash. Do Flash, são originadas as correntes de saída do sistema, ou seja, as correntes de topo de fundo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais para as diferentes técnicas de extração empregadas, como rendimento e composição. Além disso, serão abordadas a análise estatística da extração com fluido supercrítico, modelagem matemática das curvas cinéticas de extração e a predição da solubilidade.

### 5.1. Caracterização da matéria-prima

Tendo em vista a necessidade de utilização de algumas características do material vegetal para o estudo de modelagem e, considerando que fatores como tamanho de partícula, teor de umidade e porosidade do leito influenciam no processo de extração supercrítica, a

Tabela 6 resume as principais características da matéria-prima vegetal.

**Tabela 6** – Características da matéria-prima vegetal.

Densidade do sólido (g/cm <sup>3</sup> )	Teor de umidade (%)	Porosidade	Diâmetro de Sauter (mm)
0,556	5,84 ± 0,15	0,571	0,604

Da análise dos dados apresentados na Tabela 6, observa-se que a matéria-prima apresentou teor de umidade de 5,84% e diâmetro de partícula medindo 0,604 mm. É importante ressaltar que a presença de umidade exerce uma influência negativa sobre o processo de extração, podendo comprometer a vida útil do extrato. Durante a etapa de extração supercrítica, a umidade pode ainda potencializar o risco de ocorrência de reações de hidrólise e/ou ionização dos constituintes. Isso é devido à possível formação de gelo causada pelo fenômeno do Efeito Joule-Thompson durante a despressurização. Já no que diz respeito ao tamanho de partículas, a literatura recomenda que sejam utilizados materiais entre 0,25 e 1,8 mm. Esta faixa é indicada pois apesar de a cominuição do material aumentar a área superficial soluto-solvente, também pode ocasionar o empacotamento do leito, o que reduz a velocidade do leito fluidizado e o rendimento do processo (PEREIRA e MEIRELES, 2010). Quanto à densidade do sólido e porosidade do leito, não há uma recomendação expressa sobre quais faixas adotar.

É importante destacar que a literatura disponível aborda pouco sobre as características da matéria-prima vegetal. Por exemplo, Silva (2022) utilizou folhas secas e moídas de *Pereskia*

*aculeata*, com um diâmetro médio de 500  $\mu\text{m}$ , porosidade de 0,8199 e densidade do sólido de 1,4737  $\text{g}/\text{cm}^3$ , obtidas através da técnica de picnometria a gás. No entanto, no estudo de Torres *et al.* (2022a; 2022b), não foi realizada uma avaliação da caracterização do material vegetal. Além disso, nos demais trabalhos que empregaram a ora-pro-nóbis como matéria-prima e utilizaram técnicas convencionais de extração, não foram encontrados dados sobre a caracterização do material.

## 5.2. Extrações convencionais

A Tabela 7 resume os rendimentos obtidos em cada método empregado.

**Tabela 7** – Rendimento das extrações por maceração dinâmica, ultrassom e Soxhlet.

Método	Rendimento	
	$M_{\text{extraída}} (\text{g})$	$R (\%)$
Maceração dinâmica	$1,7052 \pm 0,0001$	$8,5000 \pm 0,0002$
Ultrassom	$0,4795 \pm 0,0001$	$2,4000 \pm 0,0002$
Soxhlet	$1,4945 \pm 0,0001$	$7,4700 \pm 0,0002$

Com base nos dados fornecidos na Tabela 7, pode-se observar que, entre as técnicas convencionais, a maceração dinâmica demonstrou o maior rendimento (8,5%), seguida do método Soxhlet (7,47%) e ultrassom (2,4%). Embora apresentem rendimentos elevados, é importante ressaltar que, tanto a técnica de maceração quanto a extração por Soxhlet, não são seletivas. Pelo contrário, essas técnicas são consideradas exaustivas, já que resultam na obtenção de extratos brutos. Além disso, não se pode garantir para nenhuma das técnicas convencionais a remoção completa do solvente.

Observa-se ainda que o rendimento da extração por Soxhlet levou à obtenção de uma massa de óleo de 1,4945 g, correspondendo a um rendimento de 7,47%. Esse rendimento é frequentemente adotado como um padrão para determinar a quantidade de massa livre de soluto em modelagens. Essa escolha é justificada pelo fato de que a extração por Soxhlet seja capaz de extrair todo o óleo presente na matéria-prima, permitindo considerar que os 7,47% correspondem à presença de óleo nas folhas de ora-pro-nóbis.

Ao comparar os resultados experimentais com os dados da literatura relacionados ao uso de hexano como solvente, observa-se que a extração por ultrassom (2,4%) está em concordância com os resultados de Silva (2022) para a extração por ultrassom com hexano, cujo rendimento foi de 2,47%. Além disso, os rendimentos da extração por maceração (8,5%) estão dentro da faixa dos valores observados por Torres *et al.* (2022b) e Wahab *et al.* (2009), cujos rendimentos foram, respectivamente, 11,04% e 3,42%. Por outro lado, a extração por Soxhlet (7,74%) apresentou um rendimento maior do que os resultados reportados na literatura, ultrapassando os 4,66% obtidos por Torres *et al.* (2022a).

As discrepâncias nos rendimentos entre o presente trabalho e os estudos da literatura podem ser justificadas pelas variações nas condições abióticas (como incidência solar, tipo de solo e fase de crescimento da planta) e pelas características da matéria-prima, tais como porosidade, densidade e tamanho de partícula. A influência desses fatores no rendimento da extração já é bem conhecida, conforme reportado por Morais (2009).

Vale ressaltar, de acordo com os resultados encontrados na literatura, que o aumento da polaridade do solvente tem um efeito positivo sobre o rendimento da extração, devido à presença de compostos polares na matriz vegetal. Isso é evidenciado pelo fato de que os extratos produzidos com metanol apresentaram rendimentos mais elevados em comparação com aqueles obtidos com hexano.

### **5.3. Extração com CO<sub>2</sub> Supercrítico**

Ao todo, foram realizadas 11 extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico, sendo que a triplicata no ponto central é apresentada como a média dos valores observados. Os resultados são apresentados na Tabela 8, que resume as condições operacionais, densidade do CO<sub>2</sub>, massa de óleo extraída, tempos de extração e os rendimentos, R% e e%.

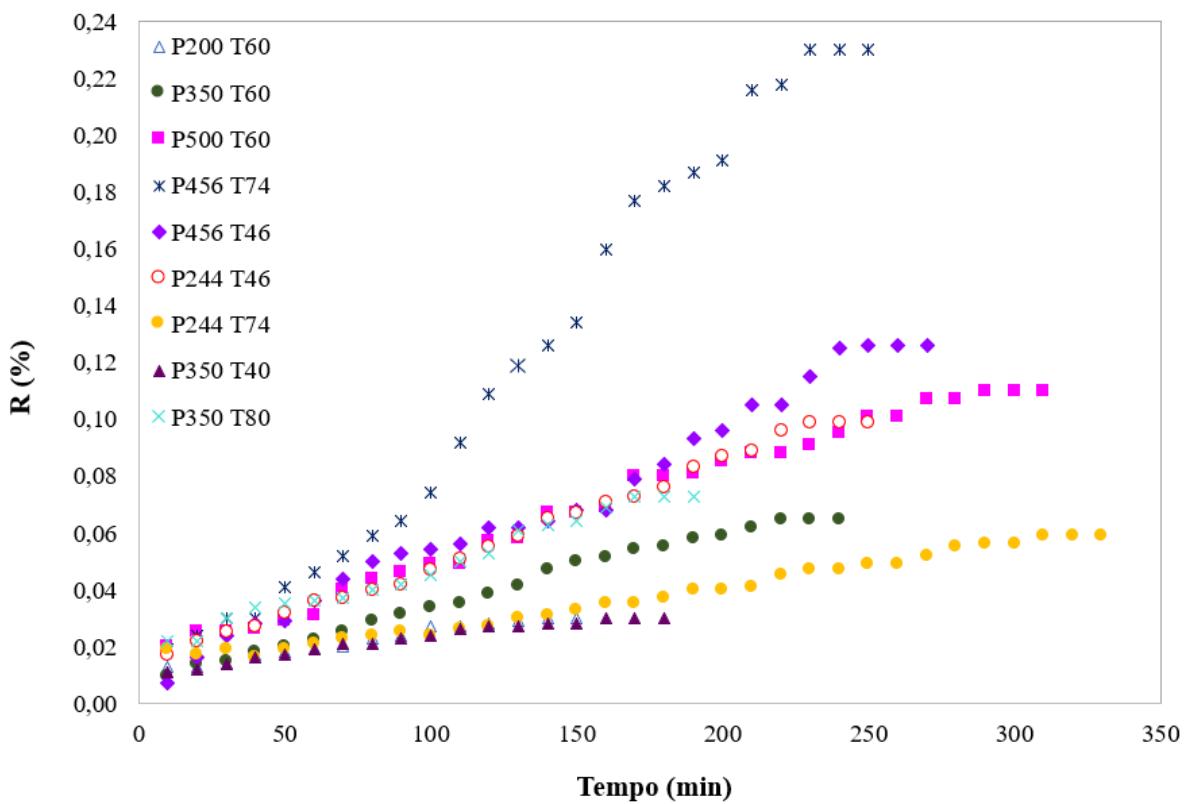
A partir dos dados expostos na Tabela 8, é possível constatar que, em geral, os melhores resultados da extração foram observados para as pressões mais altas. O maior rendimento, igual a 0,23% foi obtido na condição de 456 bar e 74°C, para um tempo de extração de 250 min. Em contrapartida, a condição a 200 bar e 60 °C foi a de menor rendimento, de 0,033% após 190 min de extração. Isso se justifica devido ao aumento da densidade do CO<sub>2</sub> provocado pelo aumento da pressão, cuja consequência é um efeito positivo sobre a solubilidade do solvente, levando aos maiores rendimentos.

**Tabela 8** – Condições operacionais, densidade do solvente, massa de óleo extraída, rendimentos e tempos de extração para a extração de OPN com CO<sub>2</sub> supercrítico.

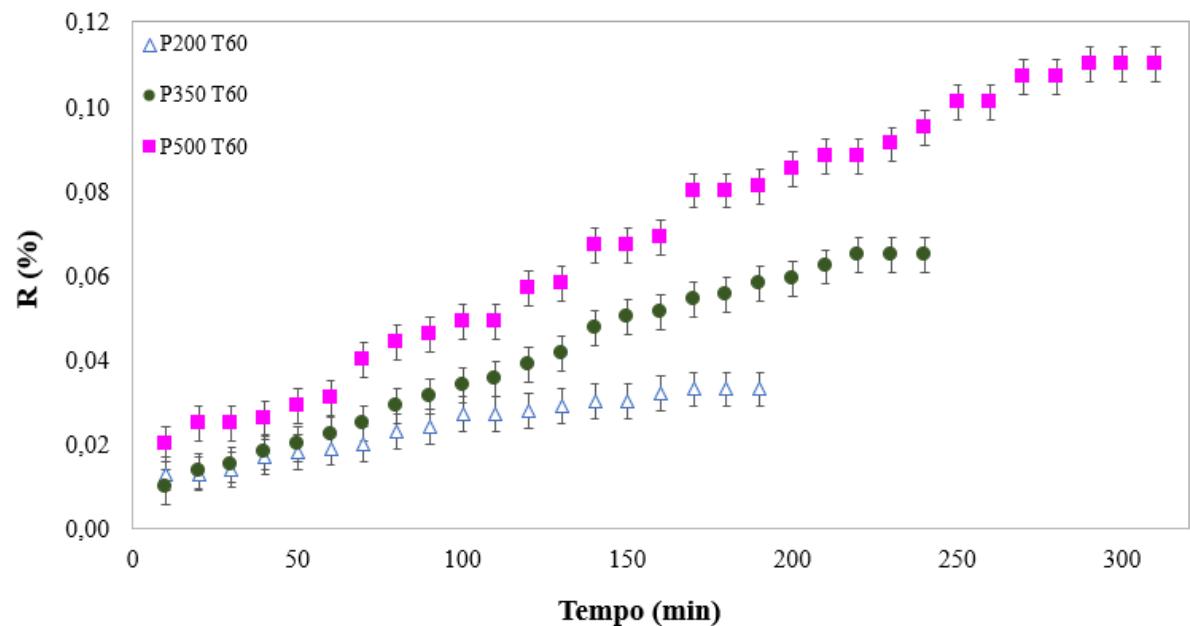
Ensaio	T (°C)	P (bar)	M <sub>óleo</sub> (g)	R (%)	e (%)	pCO <sub>2</sub> (kg/m <sup>3</sup> )	t (min)
1	60	200	0,00330	0,0330	0,0357	720,10	190
2	74	456	0,02300	0,2300	0,2486	873,50	250
3	80	350	0,00730	0,0730	0,0789	789,79	200
4	46	456	0,01300	0,1260	0,1362	959,00	270
5	46	244	0,00990	0,0990	0,1070	847,01	250
6	40	350	0,00300	0,0300	0,0324	935,94	180
7	74	244	0,00590	0,0590	0,0638	706,90	330
8	60	500	0,01100	0,1100	0,1189	934,15	310
9	60	350	0,00650	0,0650	0,0702	862,86	240
10	60	350	0,00690	0,0690	0,0746	862,86	240
11	60	350	0,00600	0,0600	0,0648	862,86	240

A Figura 9 ilustra as curvas cinéticas de extração variando pressão e temperatura em diferentes condições do experimento. Nessa figura, as barras de erros foram suprimidas para facilitar a visualização dos dados. Ela destaca a condição de melhor rendimento obtida a 456 bar e 74 °C, e apresenta os comportamentos das demais condições experimentais.

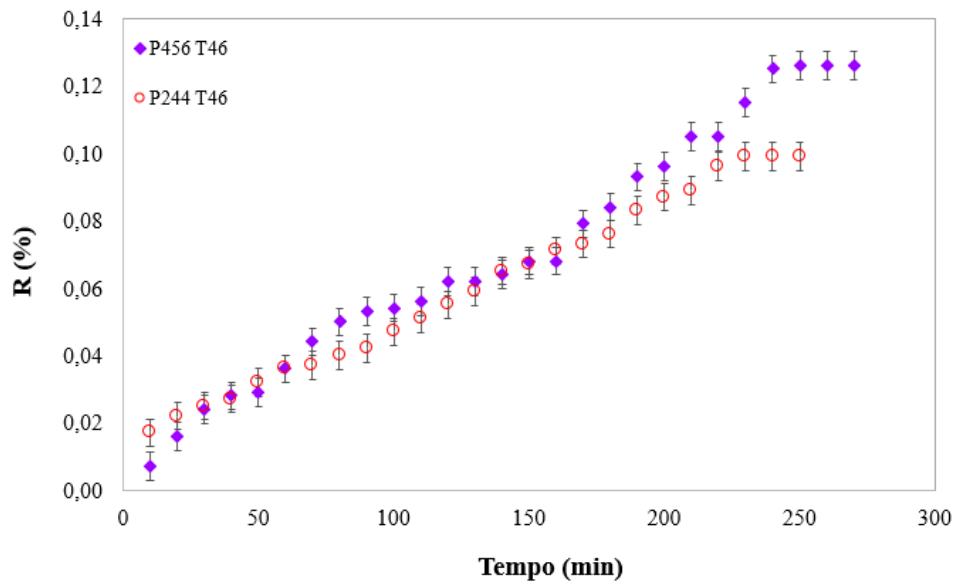
Contudo, devido ao grande número de experimentos, houve sobreposição dos dados, dificultando a visualização dos comportamentos individuais. Para solucionar essa questão, as Figuras 10 a 12 ilustram as curvas cinéticas agrupadas por temperatura similares, enquanto nas Figuras 13 a 15 a pressão é mantida constante.



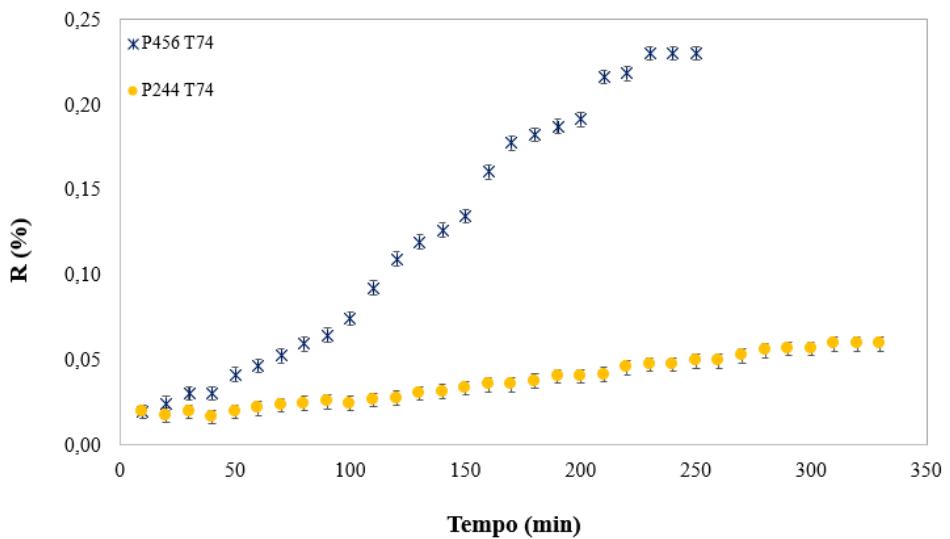
**Figura 9** – Curvas cinéticas para todas as condições experimentais.



**Figura 10** – Curvas cinéticas de extração para as condições de 200, 350 e 500 bar a 60°C.

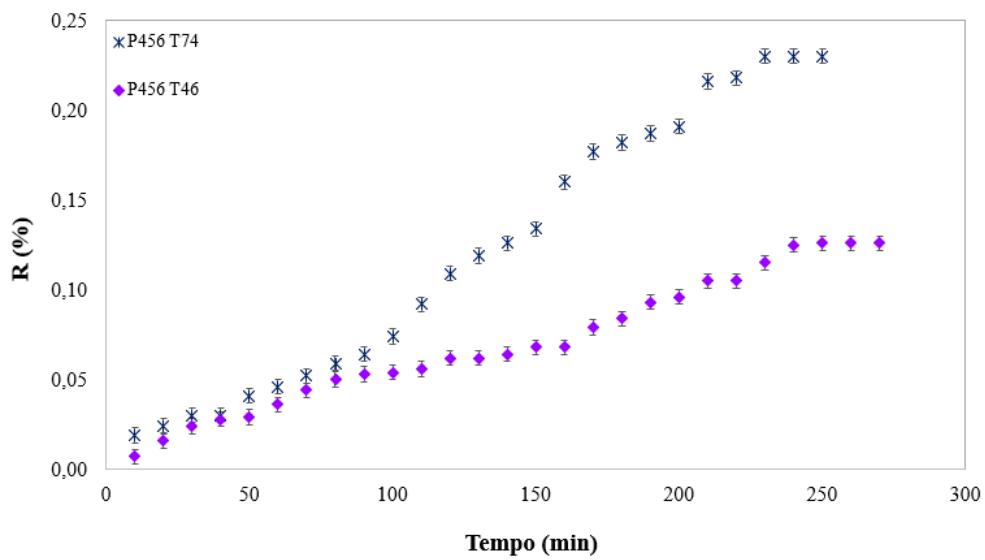


**Figura 11** – Curvas cinéticas de extração para as condições de 456 e 244 bar a 46°C.



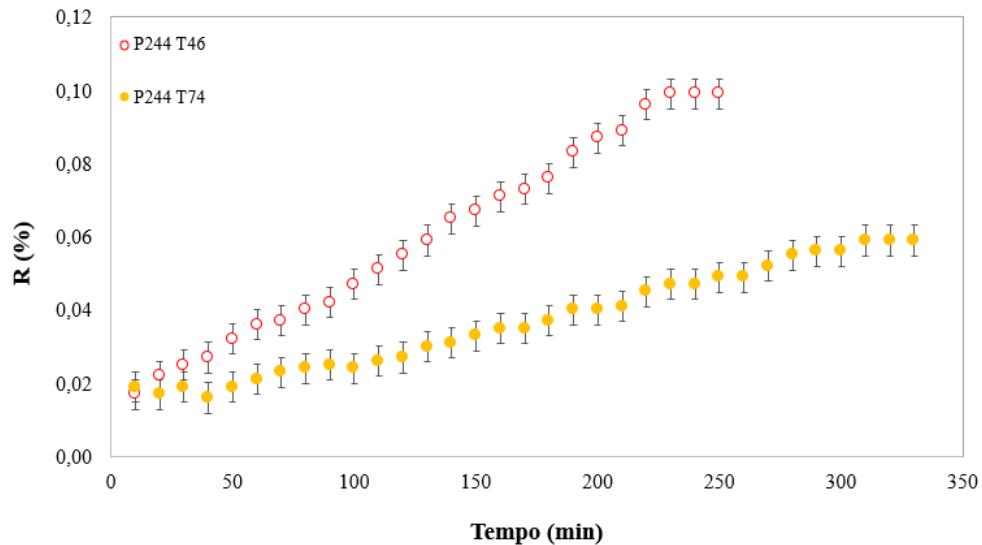
**Figura 12** – Curvas cinéticas de extração para as condições de 46 e 244 bar a 74°C.

As Figura 10 e Figura 12 evidenciam que o aumento da pressão está diretamente relacionado ao aumento do rendimento. Já na Figura 11, observa-se que não há diferença significativa entre os resultados obtidos a 244 bar e 46 °C, e a 456 bar e 46 °C, até que se atinja os 200 min de extração, momento em que a condição de maior pressão demonstra um rendimento superior. Esse comportamento pode ser justificado pelo fato de que o aumento da pressão também resulta em maior densidade do CO<sub>2</sub>, conferindo ao solvente um maior poder de solvatação (BENITO-ROMÁN *et al.*, 2018).



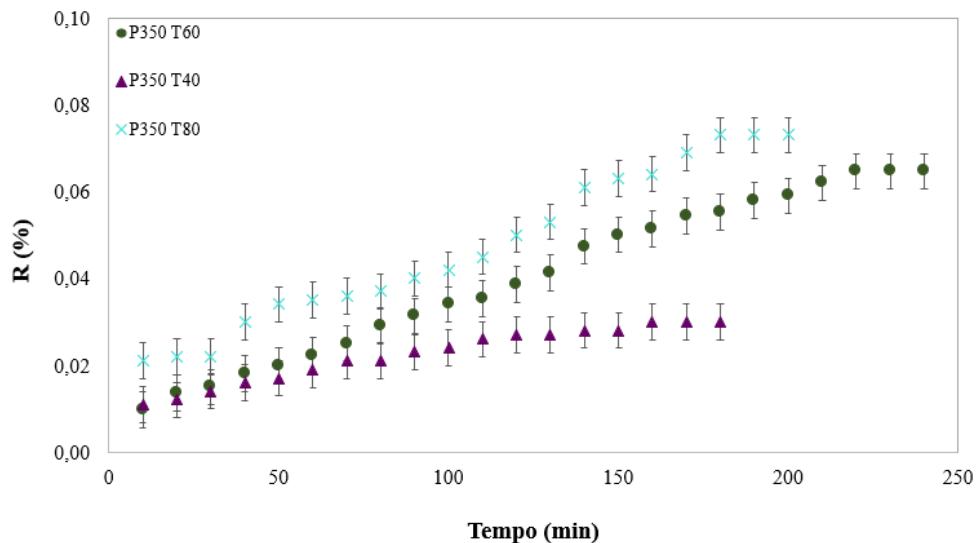
**Figura 13** – Curvas cinéticas de extração para as condições de 74 e 46 °C a 456 bar.

De forma similar ao que foi observado na Figura 11, a Figura 13 também mostra uma região onde não há diferença estatística significativa no efeito da temperatura sobre o rendimento obtido na extração. Todavia, a partir dos 80 min a curva cinética obtida a 74 °C começa a se “descolar” daquela a 46 °C, indicando que a maior temperatura favoreceu o maior rendimento.



**Figura 14** – Curvas cinéticas de extração para as condições de 46 e 74 °C a 244 bar.

O mesmo comportamento é percebido na Figura 15, onde a condição de 80 °C superou as condições de 60 °C e 40 °C, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que, para os cenários de pressões mais elevadas (350 e 456 bar), o aumento da temperatura tem um efeito positivo no rendimento. Em contrapartida, na Figura 14, a condição de 244 bar e 46 °C é superior à de 244 bar e 74 °C. Isso mostra que, para a pressão mais baixa a menor temperatura favorece a extração.



**Figura 15** – Curvas cinéticas de extração para as condições de 40, 60 e 80 °C a 350 bar.

O comportamento da variação do rendimento com a temperatura pode ser justificado visto que, em condições isobáricas, o aumento da temperatura leva à diminuição da densidade do CO<sub>2</sub>, exercendo um efeito negativo sobre o rendimento. Ao mesmo tempo, o aumento da temperatura provoca o aumento da pressão de vapor dos componentes presentes no óleo, o que favorece a extração. Logo, o fator dominante no rendimento dependerá das condições de temperatura e pressão, podendo ser a densidade do CO<sub>2</sub> ou a pressão de vapor dos componentes. (GÜCLÜ e TEMELLI, 2000).

Comparando o resultado experimental com outros estudos da literatura, Silva (2022) avaliou o rendimento da extração de *Pereskia aculeata* com CO<sub>2</sub> supercrítico nas condições de 110 bar e 40 °C, 140 bar e 50 °C e 170 bar e 60 °C, obtendo rendimentos de 0,122%, 0,363% e 0,83%, respectivamente. Ambos os estudos mostraram que o aumento da pressão e temperatura favoreceu a obtenção de rendimentos mais altos. No entanto, é importante ressaltar que as

diferenças na origem da matéria-prima, sua caracterização, bem como aquelas relacionadas ao equipamento e condições operacionais utilizadas podem justificar as variações quantitativas dos resultados. Além disso, a faixa de investigação para pressão e temperatura também foi diferente, impossibilitando uma comparação quantitativa direta com o resultado do autor.

Torres *et al.* (2022a) estabeleceram a pressão em 250 bar, o tempo de extração em 120 min e a vazão de solvente em 1,2 kg/h, avaliando o rendimento da extração nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C. O melhor resultado foi obtido a 40 °C, com rendimento de 1,78%, porém, com pouca diferença significativa em relação às condições de 50 °C e 60 °C, que obtiveram rendimentos de 1,69% e 1,68%, respectivamente. O presente trabalho registrou rendimentos inferiores aos reportados por Torres *et al.* (2022a), contrariando as expectativas de desempenho da extração. É relevante mencionar que, além das diferenças nas configurações das unidades experimentais e condições de operação, como vazão do solvente (22 – 26 mL/min), produtos naturais também possuem perfis fitoquímicos distintos devido às condições do ambiente.

#### **5.4. Caracterização dos Extratos**

Através de análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, empreendeu-se uma tentativa de identificar os compostos presentes em diferentes extratos da planta ora-pro-nóbis. Os extratos foram obtidos por meio da extração supercrítica sob diversas condições: 244 bar e 74 °C, 350 bar e 60 °C, 350 bar e 80 °C, e 500 bar e 60 °C. Adicionalmente, foram avaliados os extratos produzidos pelas técnicas de Soxhlet (OPN-SO), ultrassom (OPN-US) e maceração dinâmica (OPN-MD).

A Tabela com os componentes, tempo de retenção ( $t_r$ ) e quantificação está presente no Anexo I. Observa-se que o perfil fitoquímico foi diverso considerando os diferentes extratos, com a presença de uma grande quantidade de hidrocarbonetos, sendo essa a classe majoritária presente nos extratos. Contudo, também houve presença de terpenos, flavonoides, fitosteróis e ésteres de ácidos graxos, em menor quantidade.

A partir das diferentes amostras investigadas, foi possível observar nenhum extrato produzido por técnicas convencionais apresentou ácido palmítico, composto que foi identificado para as condições de 60 °C e 80 °C a 350 bar. Além disso, na mesma condição se observou a presença de ésteres de ácidos graxos derivados dos ácidos palmítico, esteárico, linoleico e oleico, como o etil oleato, que não foram identificados nos extratos OPN-SO, OPN-

US e UPN-MD. No extrato OPN-SO, não se observou a presença de compostos fenólicos ou fitosteróis e, dentre os terpenos, foi possível identificar apenas o fitol e o esqualeno. Os extratos OPN-US e OPN-MD apresentaram perfis fitoquímicos similares, sendo observada a presença de fitol, lupeol,  $\gamma$ -sitosterol e esqualeno. Apenas OPN-US apresentou ainda taraxerol e lup-20(29-en-3-one. Já nos extratos produzidos com CO<sub>2</sub>-SC, foi possível identificar todos esses constituintes e, de modo geral, observou-se uma variedade maior de estruturas nessas amostras.

Avaliando o perfil fitoquímico da *Pereskia aculeata* a partir de estudos disponíveis na literatura, foi possível observar que o presente trabalho não obteve o conteúdo de flavonoides e compostos fenólicos conforme trabalho de Garcia *et al.* (2019). Nesse caso, os autores produziram extratos hidroetanólicos, que devido à maior polaridade do solvente, apresentaram maior eficiência para a extração de compostos como rutina, isoramnetina e ácidos caftárico.

Já no estudo de Pinto *et al.* (2015), os extratos foram obtidos empregando maceração com hexano. Comparando os resultados de OPN-MD com os da literatura, em ambos há presença de decano, fitol e sitosterol. Além disso, o extrato produzido por maceração dinâmica (OPN-MD) apresentou ainda esqualeno e lupeol, compostos que não haviam sido mencionados.

Avaliando o trabalho de Torres *et al.* (2022a), é possível estabelecer comparação para os resultados observados com os extratos supercríticos e Soxhlet. Segundo os autores, no extrato de Soxhlet com hexano, os constituintes majoritários foram  $\gamma$ -sitosterol (6,98%), vitamina E (4,37%) e lupeol (3,09%). Contudo, no extrato OPN-SO não foi possível identificar sitosterol e lupeol, sendo que os compostos principais presentes nessa amostra foram hentriacontano (40,77%), nonacosano (7,64%) e 1,2,4-trimetilbenzeno (5,85%). As diferenças percebidas entre os dois estudos podem ser justificadas pelas diferentes origens das matérias-primas, bem como diferentes condições de crescimento, fatores que influenciam na composição dos extratos. Pode-se mencionar ainda que o perfil fitoquímico obtido no presente trabalho está de acordo com o proposto por Torres *et al.* (2022c), visto que, dentre os compostos bioativos observados, os terpenoides foram obtidos quantidade significativa se comparado aos demais. Destacam-se diterpenos como fitol e lupeol e triterpenos, como esqualeno e taraxerol.

Para os ensaios com FSC, Torres *et al.* (2022a) observaram um aumento da quantidade de  $\gamma$ -sitosterol, esqualeno e lupeol com o aumento da temperatura, passando de, respectivamente 16,84%, 2,92% e 3,09% a 40 °C para 25,85%, 5,27% e 9,92% para 60 °C. Para o fitol e 2,4-di-tercbutilfenol, não houve alteração significativa na presença dos compostos devido às diferentes condições de temperatura. Vale destacar que nos experimentos realizados

pelos autores, os ensaios foram avaliados em condição isobárica, mantendo a pressão a 250 bar. Assim, não se pode discutir o impacto da modificação da pressão na análise fitoquímica.

No presente trabalho, foi possível observar que o aumento da pressão favoreceu a extração de fitol e esqualeno, em que os constituintes aumentaram de 3,8% e 1,4%, respectivamente, a 244 bar para 7,3% e 3,3% a 500 bar. Assim como observado por Torres *et al.* (2022a), não houve diferença significativa na quantidade do fitol em função da variação da temperatura. Todavia, foi possível observar que a redução da pressão favoreceu a extração de compostos como o lupeol,  $\gamma$ -sitosterol, taraxerol e lup-20(29)-en-3-ona, dado que na condição a 244 bar foram observados os melhores rendimentos para esses constituintes, de 10,5%, 8,4%, 3,3% e 3,4%, na ordem. Diferente do que foi observado por Torres *et al.* (2022a), o 2,4-ditercbutilfenol se mostrou dependente da temperatura de extração, pois a 350 bar e 60 °C o resultado foi superior ao obtido para 350 bar e 80 °C, sendo igual a 7,2% e 0,8%, na ordem.

Silva (2022) identificou no extrato de Soxhlet produzido com hexano o palmitato de etila e, embora o composto não tenha sido identificado para OPN-SO, há indícios de sua presença no extrato supercrítico. Já para os extratos produzidos via ultrassom com hexano, foi observada a presença de 1,3-dietilbenzeno, nonacosano e palmitato de etila, por exemplo. Apesar da composição não ser idêntica à encontrada para OPN-US, no presente trabalho foram identificados 1,2,3-trimetilbenzeno, heptacosano, nonacosano, triacontano e hentriaccontano, o que indica a similaridade de estruturas obtidas. Além disso, compostos como esqualeno e fitol foram obtidos apenas para o ensaio de ultrassom com etanol, enquanto no presente trabalho esses constituintes, além de outros como,  $\gamma$ -sitosterol, taraxerol e lupeol foram obtidos para ultrassom com hexano, apesar da menor polaridade do solvente.

Apesar de ter sido observada a presença de 2,4-ditercbutilfenol nos extratos de ora-pro-nóbis, a presença desse composto em plantas não pode ser explicada por aspectos naturais. De fato, a explicação mais provável para a observação desse composto em múltiplas espécies vegetais em diferentes locais é que as plantas o acumulem a partir do solo onde cresceram (MALEK *et al.*, 2009).

## 5.5. Análise Estatística do Rendimento

A partir dos resultados apresentados na seção anterior, foram realizadas as análises estatísticas baseadas no planejamento de experimentos. Para isso, foi empregado um modelo de

regressão (Equação 34) a fim de ajustar as contribuições de cada fator para a variável resposta, levando em consideração as contribuições dos termos lineares e quadráticos da P e T, bem como a interação entre eles.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i x_i + \sum_{j=1}^N \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad \text{Equação 34}$$

Em que  $Y$  é a variável de resposta,  $\beta_0$  é o coeficiente linear,  $\beta_i$  é o i-ésimo parâmetro de primeira ordem,  $\beta_{jj}$  é o j-ésimo parâmetro de segunda ordem,  $\beta_{ij}$  é o parâmetro de combinação para a interação j em relação à variável de resposta i e  $x_i$  é a i-ésima variável independente.

Para a avaliação do modelo, foi realizada a análise ANOVA, via gráfico de Pareto, superfície de resposta e significância paramétrica, a qual foi avaliada com o teste t-Student e cálculo do p-valor, admitindo 95% de confiança. Os parâmetros do modelo foram estimados considerando o método de regressão multilinear simples, sendo a função objetivo a ser minimizada a função de mínimos quadrados.

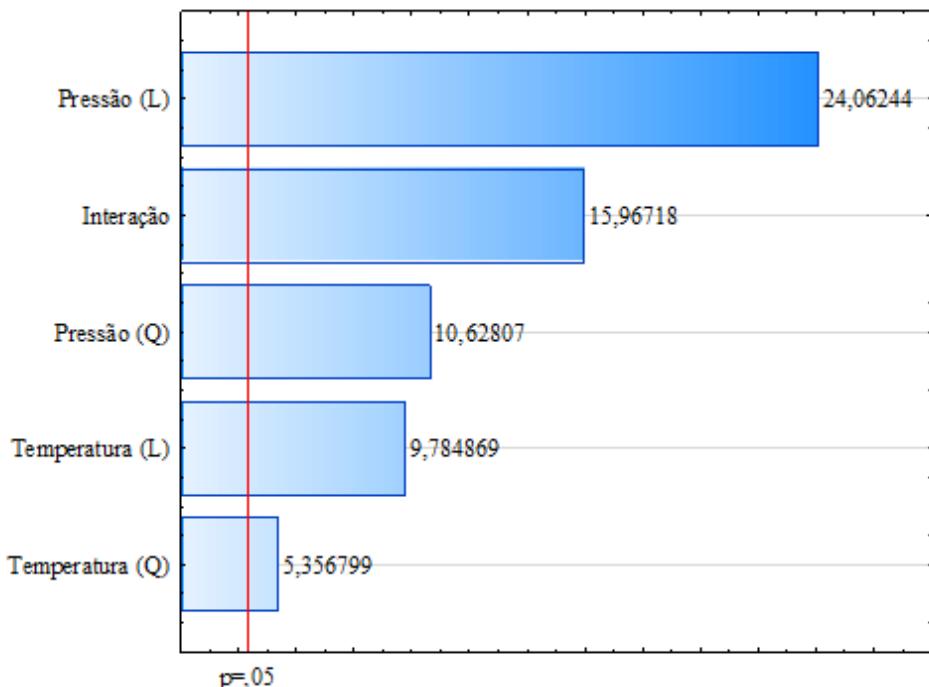
A Tabela 9 e a Figura 16 apresentam os resultados de significância para os termos do modelo apresentado na Equação 40. A partir dos resultados do ANOVA, observa-se que todos os termos do modelo de regressão proposto possuem significância estatística uma vez que o p-valor é menor que 0,5.

**Tabela 9** – Resultados do teste ANOVA para o rendimento.

<b>Fator</b>	<b>SR</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Temperatura (L)	0,001947	95,7437	0,010284
Temperatura (Q)	0,000583	28,6953	0,033127
Pressão (L)	0,011773	579,0012	0,001723
Pressão (Q)	0,002297	112,9559	0,008737
Termo de interação	0,005184	254,9508	0,003899
$\beta_0$	0,009972	163,4824	0,006086

SR – Somatório dos resíduos; F – F de Fischer; L – termo linear; Q – termo quadrático.

Os resultados encontrados na análise do ANOVA são corroborados pelo gráfico de Pareto (Figura 16). Esse ainda indica a ordem de significância e contribuição de cada termo para a variável de resposta (rendimento), considerando o modelo proposto. Pode-se observar que o termo linear da pressão é o que mais contribui para a determinação do rendimento da extração, seguido pelo termo de interação P – T e pelo termo quadrático da pressão. Os termos referentes à temperatura, apesar de significativos, são os que menos influenciam no cálculo do rendimento, indicando que a pressão é a variável mais importante para a extração supercrítica de ora-pro-nóbis, dentro da faixa experimental analisada.



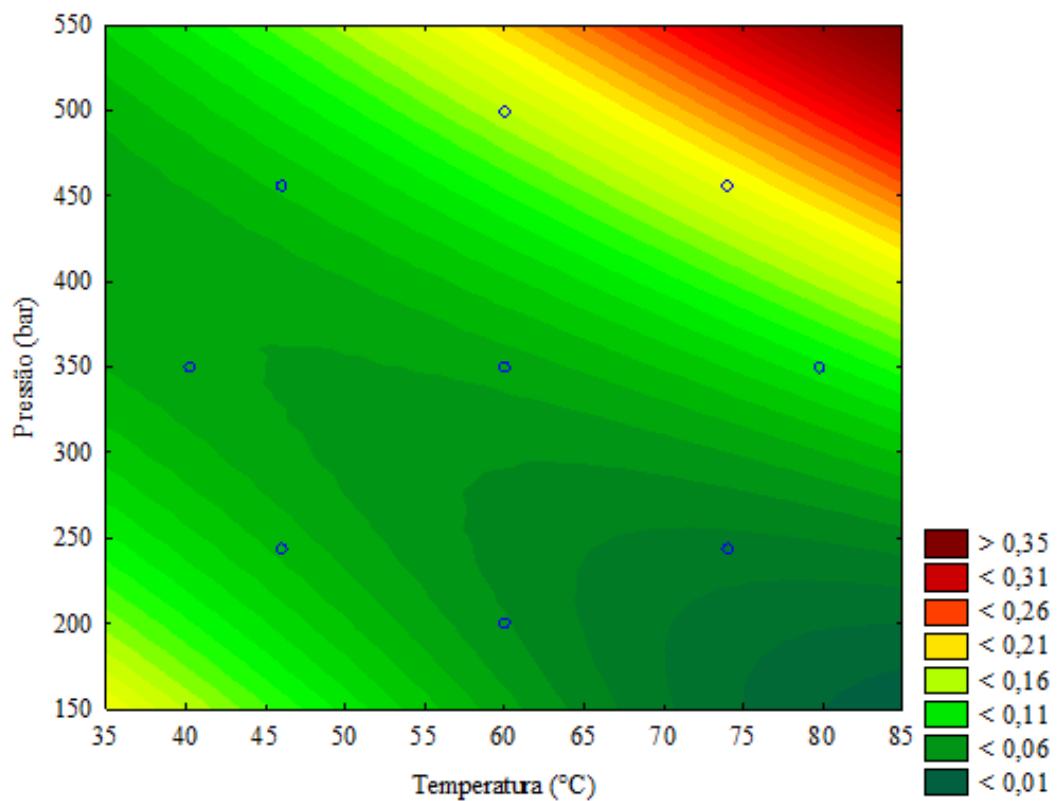
**Figura 16** – Gráfico de Pareto para a análise dos fatores do modelo de regressão (rendimento) obtidos pelo planejamento DCCR, considerando 95% de confiança.

A Tabela 10 apresenta os resultados da estimativa de parâmetros para o modelo de regressão. Observa-se que todos os parâmetros possuem significância estatística uma vez que a incerteza paramétrica obtida apresenta uma ordem de grandeza abaixo do valor médio estimado do parâmetro e o p-valor calculado está menor que o nível de significância arbitrado (5%). Esses resultados estão de acordo com aqueles discutidos anteriormente na análise ANOVA e gráfico de Pareto.

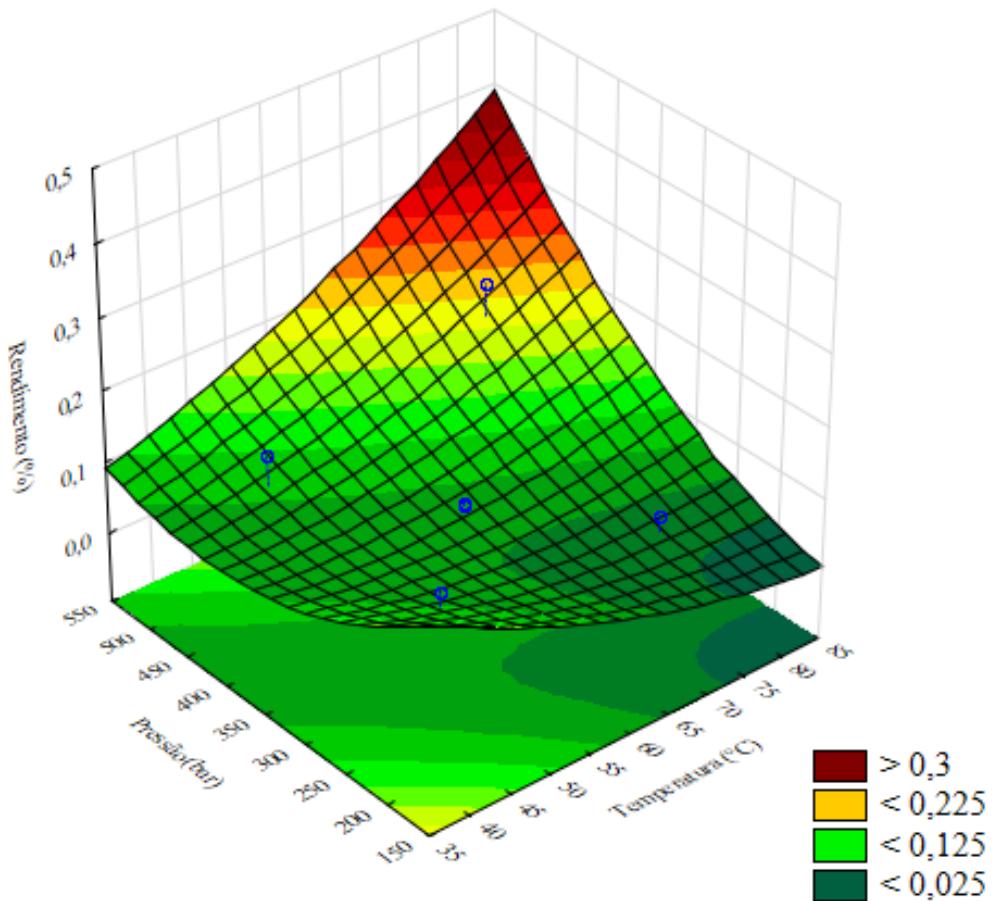
**Tabela 10** – Parâmetros estimados para o modelo de regressão (rendimento).

Fator	Valor Estimado	p-valor
Temperatura (L)	$(0,79 \pm 0,05) \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$	0,005
Temperatura (Q)	$(- 0,014 \pm 0,001) \text{ } ^\circ\text{C}^{-2}$	0,009
Pressão (L)	$(0,00005 \pm 0,00001) \text{ bar}^{-1}$	0,033
Pressão (Q)	$(- 0,0024 \pm 0,0002) \text{ bar}^{-2}$	0,004
Termo de interação	$(0,000002 \pm 0,000001) \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \text{ bar}^{-1}$	0,009
$\beta_0$	$0,000024 \pm 0,000002$	0,004

As Figuras 17 e 18 ilustram a curva de nível e a superfície de resposta do modelo de regressão proposto para correlacionar as variáveis pressão e temperatura com o rendimento da extração supercrítica.



**Figura 17** – Curva de nível do modelo de regressão proposto para correlacionar pressão, temperatura e o rendimento da extração.



**Figura 18** – Superfície de resposta do modelo de regressão proposto para correlacionar pressão, temperatura e o rendimento da extração.

Com base nas informações apresentadas na Figura 17, observa-se que na faixa de temperatura de 35 a 65 °C, a pressão não exerce um efeito significativo no rendimento. No entanto, para valores acima dessa faixa, a pressão passa a ter um efeito mais significativo no processo. Essa observação é estendida para a superfície de resposta da Figura 18, onde se observa um máximo na direção de maior temperatura e pressão.

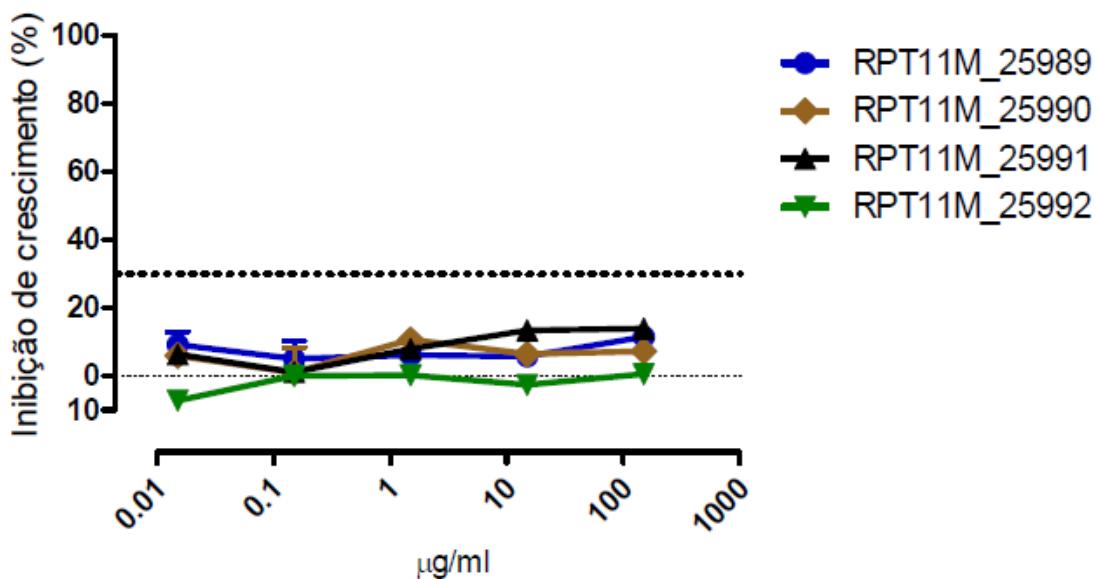
Ao avaliar os pontos estacionários do sistema, verifica-se que o ponto crítico está na condição de 37,9 °C e 398,6 bar, valor cuja temperatura está fora da faixa experimental considerada no presente trabalho. Isso é refletido na determinação dos autovalores e autovetores (0,000055 e -0,000001) do sistema, os quais indicam a existência de um ponto de sela na superfície de resposta. Como consequência dessa observação, é recomendado para trabalhos futuros a extensão da faixa de temperaturas avaliada, a fim de que a condição de 37,9 °C seja contemplada.

## 5.6. Teste de Atividade

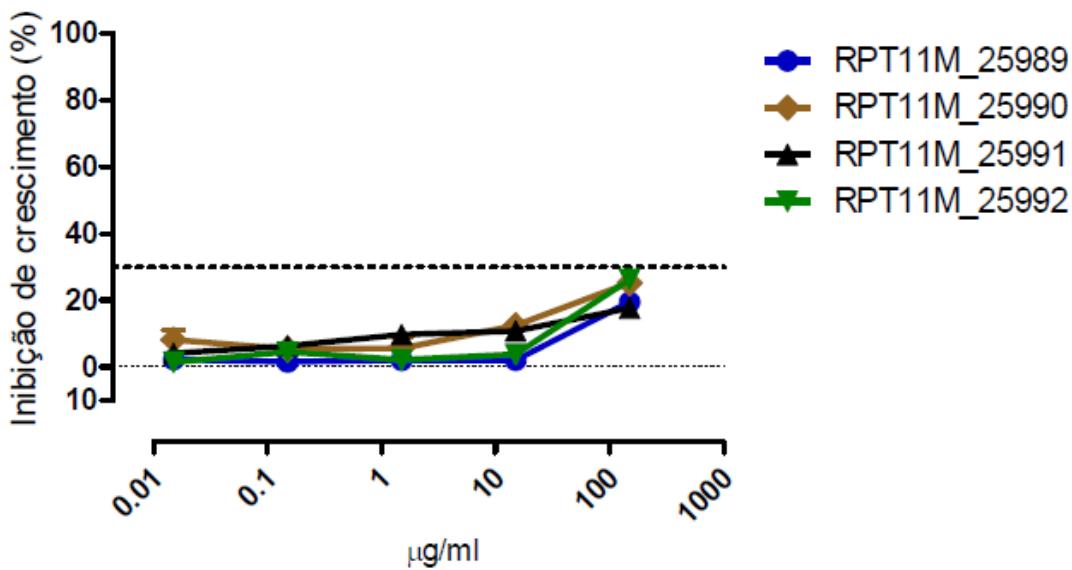
A fim de investigar o potencial farmacológico dos extratos de *P. aculeata*, foi realizado um ensaio *in vitro* de citotoxicidade contra diferentes linhagens tumorais. Esses experimentos foram conduzidos em parceria com o Laboratório de Farmacologia Molecular de Farmanguinhos (FIOCRUZ).

Para isso, foram avaliados alguns extratos supercríticos obtidos nas condições de 500 bar e 60 °C (RPT11M\_25989), 456 bar e 46 °C (RPT11M\_25990), 350 bar e 60 °C (RPT11M\_25991) e 244 bar e 46 °C (RPT11M\_25992). As amostras foram testadas nas concentrações de 0,015 µg/mL, 0,15 µg/mL, 1,5 µg/mL, 15 µg/mL e 150 µg/mL, em triplicata. As Figuras 19 a 21 representam os ensaios de inibição do crescimento para as linhagens tumorais de câncer de pulmão (A549), leucemia humana (K562) e câncer de mama (MCF7).

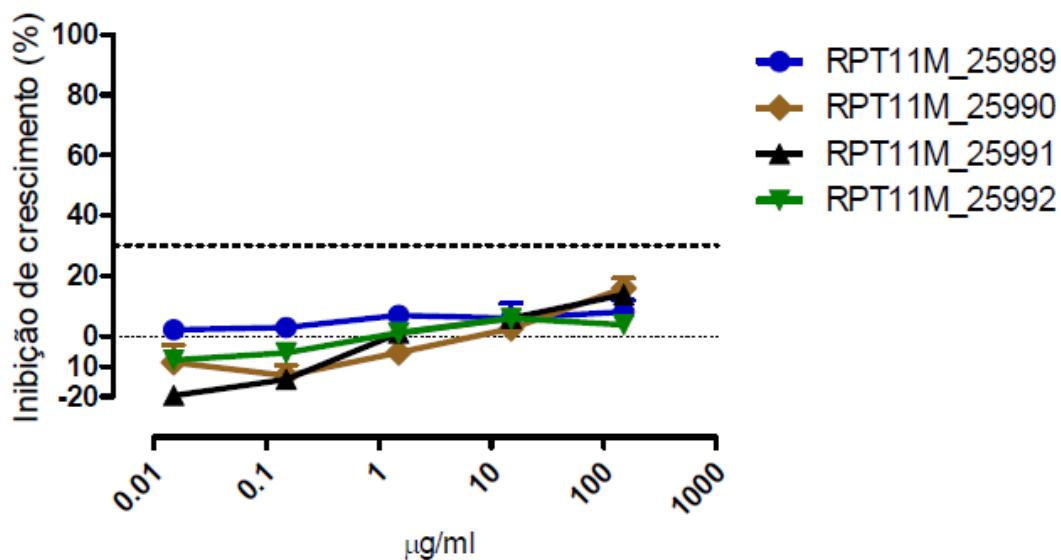
Nenhum dos ensaios apresentou uma inibição mínima de 30% na proliferação das linhagens estudadas, independentemente da concentração utilizada. No entanto, notou-se que a resposta mais significativa foi obtida para a leucemia entre as linhagens tumorais investigadas. Especificamente, as amostras RPT11M\_25992 e RPT11M\_25990, sob as condições de 244 bar e 46 °C e 456 bar e 46 °C, respectivamente, apresentaram a melhor resposta na maior concentração igual a 150 µg/mL.



**Figura 19** – Ensaio de inibição do crescimento para a linhagem A549 (câncer de pulmão).



**Figura 20** – Ensaio de inibição do crescimento para a linhagem K562 (leucemia).



**Figura 21** – Ensaio de inibição do crescimento para a linhagem MCF7 (câncer de mama).

Até o momento, não foi reportado na literatura a correlação de atividade antitumoral para o óleo das folhas de ora-pro-nóbis obtido via extração supercrítica. Por isso, a discussão será ampliada para aproveitar os dados disponíveis na literatura. Desse modo, técnicas convencionais e outras espécies do gênero *Pereskia* também serão abordadas.

No estudo conduzido por Pinto *et al.* (2012), foi constatada atividade citotóxica das frações HEF (hexano), DCF (diclorometano), EAF (etyl acetato) e PPT (precipitado), obtidas por maceração das folhas de *P. aculeata*, contra células MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Adicionalmente, todas as amostras exibiram atividade citotóxica contra células HL60 (leucemia). No entanto, as taxas de inibição da proliferação celular para as amostras HEF, DCF, EAF e PPT, contra a linhagem MCF-7, variaram de 25% a 30% no estudo de Pinto *et al.* (2012), abaixo do limiar ideal de 30% adotado neste estudo para classificar efeitos anticancerígenos.

A análise química dos extratos revelou a presença predominante de fenóis e flavonoides em todas as amostras, bem como alcaloides em todas, exceto no precipitado, e a ausência de triterpenos. Esteroides foram identificados nas amostras ME, HEF, DCF e EAF. A presença de compostos fenólicos foi associada a efeitos antioxidantes devido à sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo, que pode estar ligado ao desenvolvimento de câncer e outras doenças (PINTO *et al.*, 2012).

Na avaliação das propriedades antitumorais, os extratos que foram obtidos sob condições de 350 bar e 60 °C e 500 bar e 60 °C exibiram a presença de terpenos, incluindo fitol, lupeol e esqualeno. Entretanto, é relevante destacar que somente o extrato obtido sob a condição de 350 bar e 60 °C apresentou a presença de composto fenólico, como o 2,4-di-tercbutilfenol. Contudo, esses compostos foram identificados em proporções limitadas no óleo resultante. Pinto *et al.* (2012) discutiram que a presença de compostos fenólicos e outros compostos bioativos foram responsáveis pela atividade citotóxica observada.

Vários fatores, como discrepâncias nas técnicas de extração, composição dos extratos e interações sinérgicas entre os componentes do óleo, podem explicar a discrepância na ação anticancerígena observada somente no estudo de Pinto *et al.* (2012), que também examinou células MCF-7. Além disso, devido à utilização de diferentes linhagens celulares na avaliação da ação contra leucemia, técnicas distintas para avaliação da atividade e extratos produzidos por métodos diferentes, não é viável estabelecer uma comparação direta dos resultados.

Massocatto *et al.* (2021) observaram que todos os extratos produzidos a partir da maceração hidroalcoólica das folhas e frutos de *P. aculeata* e *P. grandifolia* apresentaram ação contra leucemia (K562). Todavia, por um outro critério, apenas o extrato PGF apresentou atividade moderada contra K562 e ação fraca contra todas as demais linhagens avaliadas, com exceção de UACC-62.

A partir das observações dos estudos de Pinto *et al.* (2012) e Massocatto *et al.* (2021), tem-se que as diferenças nos métodos de análise da ação biológica e dos critérios de atividade podem levar a conclusões distintas. Por exemplo, foi mencionado que no estudo de Pinto *et al.* (2012) amostras com atividade abaixo de 30% foram consideradas ativas, enquanto para o presente trabalho foi adotado que seria necessária uma inibição maior que 30% para constatação da atividade. Além disso, caso Massocatto *et al.* (2021) tivessem empregado apenas um critério de avaliação, apenas um dos extratos teria demonstrado efeito anticancerígeno. Isso mostra que não se pode descartar a possibilidade de que os extratos supercríticos apresentem ação antitumoral, tendo em vista a existência de múltiplas abordagens para essa investigação e, dadas as opções ainda não exploradas no presente trabalho, como diferentes condições de pressão e temperatura, diferente teor de umidade e/ou tamanho de partícula e a utilização de cosolventes.

Malek *et al.* (2008) estudaram o efeito citotóxico de extratos de *P. bleo* contra diferentes linhagens tumorais e observaram que o extrato bruto metanólico e a fração de acetato de etila apresentaram notável efeito contra células KB (carcinoma epidermoide nasofaríngeo humano), com IC<sub>50</sub> de 6,5 e 4,5 µg/m, na ordem. Da fração com acetato de etila, foram identificados 4 compostos que nunca haviam sido reportados para a planta: fitol, β-sitosterol, 2,4-ditercbutilfenol e vitamina E (α-tocoferol).

Em seguida, o grupo de pesquisa avaliou o efeito citotóxico de componentes isolados dos extratos de *P. bleo*, dentre eles: mistura de esteróis (estigmasterol, campesterol e β-sitosterol), fitol, 2,4-ditercbutilfenol e α-tocoferol. Dentre eles, o 2,4-ditercbutilfenol exibiu notável performance contra células KB, com IC<sub>50</sub> de 0,81 µg/mL. O fitol apresentou forte atividade contra KB, com IC<sub>50</sub> de 7,1 µg/mL. Por outro lado, β-sitosterol e a mistura de esteróis não apresentou efeitos antiproliferativos. A ausência de efeito para os esteróis foi justificada pelos autores pois, em outros estudos, já havia sido reportado que os fitosteróis são capazes de estimular linhagens tumorais dependentes de estrogênio. Contudo, a célula MCF7 utilizada no estudo foi comprada da ATCC não é afetada por estrogênio ou antiestrogênio, o que explica a ausência de inibição celular para esse caso (MALEK *et al.*, 2009).

Malek *et al.* (2009) citaram que o sinergismo entre os componentes presentes nos extratos de plantas influencia o potencial biológico. Esse efeito depende não somente das concentrações dos constituintes, mas também das estruturas e interações entre componentes. Como consequência, a atividade entre o extrato bruto e os compostos isolados contra as mesmas linhagens tumorais tende a exibir diferentes resultados.

Pode-se notar que, apesar de ter sido observada a presença de fitol,  $\beta$ -sitosterol e 2,4-ditercbutilfenol para alguns dos extratos investigados, deve-se considerar também o efeito sinérgico com os demais constituintes do óleo. Assim como Malek *et al.* (2009) não conseguiram observar o efeito contra MCF7, no presente trabalho também não foi verificada tal atividade. Esse fato pode estar relacionado à presença dos compostos com atividade anticancerígena em quantidades insuficientes ou devido a efeitos sinérgicos entre componentes.

Segundo o estudo de Wahab *et al.* (2009), os autores aplicaram um ensaio MTT para avaliar a ação anticancerígenas dos extratos de *P. bleo* produzidas por Sohxlet em diferentes solventes. Os autores observaram que nenhuma das amostras exibiu efeito contra as células MCF-7 (mama), HT-29 (câncer de cólon) e CEM-ss (linhagem linfoblastóide). Os autores não apresentaram a composição do óleo, o que dificulta a comparação dos resultados.

Apesar de Wahab *et al.* (2009) apontarem que os resultados contrariam o que foi apontado por Tan *et al.* (2004), linhagens diferentes de câncer de mama foram empregadas nos dois estudos, o que pode justificar o fato de que Tan *et al.* (2004) terem observado o efeito anticancerígeno dos extratos metanólicos da *P. bleo* contra câncer de mama (T47-D).

Cruz *et al.* (2021) observaram que os extrato produzido após otimização da composição do solvente (60% água e 40% etanol) não exibiu toxicidade *in vitro* contra células A549, HepG2, Caco-2 e IMR90 (células saudáveis). Os autores justificaram essa observação devido à presença de uma grande quantidade de rutina, que já foi correlacionada ao efeito citoprotetor. Todavia, o extrato apresentou atividade antioxidante no meio intracelular, o que foi correlacionado com o elevado conteúdo de compostos fenólicos, em especial pela presença de isoramnetina, conforme relatado por trabalhos anteriores. No presente trabalho, todavia, não foram observados compostos como rutina e isoramnetina, possivelmente, devido à característica mais apolar do CO<sub>2</sub> supercrítico. Assim, para obter tais compostos de interesse, pode-se considerar como necessário aumentar a polaridade do solvente, facilitando a extração dos componentes fenólicos.

Mohd-Salleh *et al.* (2020), avaliam os efeitos citotóxicos dos extratos das folhas de *Pereskia bleo*, realizando ainda uma análise fitoquímica dessas amostras. O fitol foi o composto majoritário (16,09%) obtido dos extratos produzidos com acetato de etila, que demonstraram um potente efeito citotóxico contra células HeLa e MDA-MB-231. Os autores discorrem sobre resultados similares, em que o fitol é considerado um agente anticancerígeno e já demonstrou ativar a apoptose para cânceres de pulmão, fígado e nasofaringe. Esse resultado pode indicar

que, apesar do fitol ter sido identificado para as condições de 350 bar e 60 °C e 500 bar e 60 °C, as quantidades obtidas de, respectivamente, 3,32% e 7,32%, podem estar abaixo do valor ideal para ocorrência do efeito anticancerígeno.

Para os trabalhos já mencionados, além da investigação da ação antitumoral, extratos do óleo de espécies do gênero *Pereskia* também demonstraram potencial para outros efeitos. Dentre eles, pode-se citar a ação antioxidante, agente moluscicida, inibição de acetilcolinesterase e antibacteriana.

A partir do exposto, nota-se que, apesar de no presente trabalho não ter sido possível observar inibição da proliferação celular acima de 30% para as amostras estudadas, há diversos indícios na literatura que corroboram os efeitos citotóxicos contra linhagens cancerígenas para extratos produzidos a partir de técnicas convencionais.

Desse modo, deve-se considerar para trabalhos futuros a investigação de outras linhagens tumorais e a modificação das condições de operação para otimizar o rendimento dos compostos de interesse, em especial, os compostos fenólicos. Para isso, pode-se realizar a utilização de outras faixas de temperatura e pressão, modificar o teor de umidade e tamanho de partícula. Outra possibilidade é adotar o uso de cosolventes, visto que esses modificadores permitem mitigar a baixa polaridade do CO<sub>2</sub>, facilitando a extração de compostos de maior polaridade. Desse modo, ao aumentar a polaridade do CO<sub>2</sub> adicionando pequenas quantidades de etanol ou metanol, por exemplo, pode favorecer a extração de compostos como fenólicos (HERRERO *et al.*, 2010; BRUSOTTI *et al.*, 2014).

Além disso, pode-se expandir as investigações para cobrir também a investigação de outros potenciais biológicos. No que diz respeito ao 2,4-di-tercbutilfenol, estudos apontam que o composto apresenta potencial como agente inseticida, antiviral e antifúngico, dentre outros (NAIR *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020). Já para os esteróis, há indicação do efeito ansiolítico e antidiabético de compostos como o β-sitosterol (PANAYOTIS *et al.*, 2021; BABU e JAYARAMAN, 2020).

## 5.7. Modelagem Cinética

Os resultados para a modelagem das curvas cinéticas de extração pelo emprego dos modelos de Brunner (1984), Sovová (1994), Reverchon e Osseo (1994), Esquivel *et al.* (1999) e Zeković *et al.* (2003) estão apresentados nas Tabelas 11 a 15. Nessas tabelas, foram

apresentadas as condições de temperatura e pressão utilizadas em cada ensaio, além da estimação dos parâmetros de cada modelo, bem como o DRM%.

A Tabela 11 exibe os resultados obtidos para o modelo de Sovová, cujos parâmetros são  $k_{fa0}$ ,  $k_{sa0}$  e  $x_k$ .

**Tabela 11** – Condições operacionais, densidade do CO<sub>2</sub>-SC, parâmetros estimados para o modelo de Sovová (1994) e DRM%.

<b>P (bar)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>ρCO<sub>2</sub> (kg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>k<sub>fa0</sub></b>	<b>k<sub>sa0</sub></b>	<b>x<sub>k</sub></b>	<b>DRM (%)</b>
350	40	935	100	0,000127	0,7253	3,03
200	60	723	12,25	0,000132	0,7555	3,64
456	74	873	100	0,000553	0,7479	12,74
350	80	789	100	0,000076	0,8023	8,61
350	60	863	100	0,000076	0,9371	8,32
456	46	959	100	0,685000	0,9478	8,67
500	60	934	100	0,000053	0,9261	8,48
244	74	705	100	0,000038	0,8001	9,33
244	46	847	8,77	0,000061	0,8994	8,32

Conforme Tabela 11, observa-se que em todas as condições avaliadas o parâmetro  $k_{fa0}$  é maior do que  $k_{sa0}$ . Essa observação é coerente, pois o parâmetro  $k_{fa0}$  representa a primeira etapa da extração, caracterizada por uma rápida transferência do soluto. Por sua vez,  $k_{sa0}$  corresponde à etapa mais lenta da extração, resultando em um valor menor, como esperado. Resultados análogos foram obtidos por Bessa (2018), Paschoal (2018) e Sartori (2017).

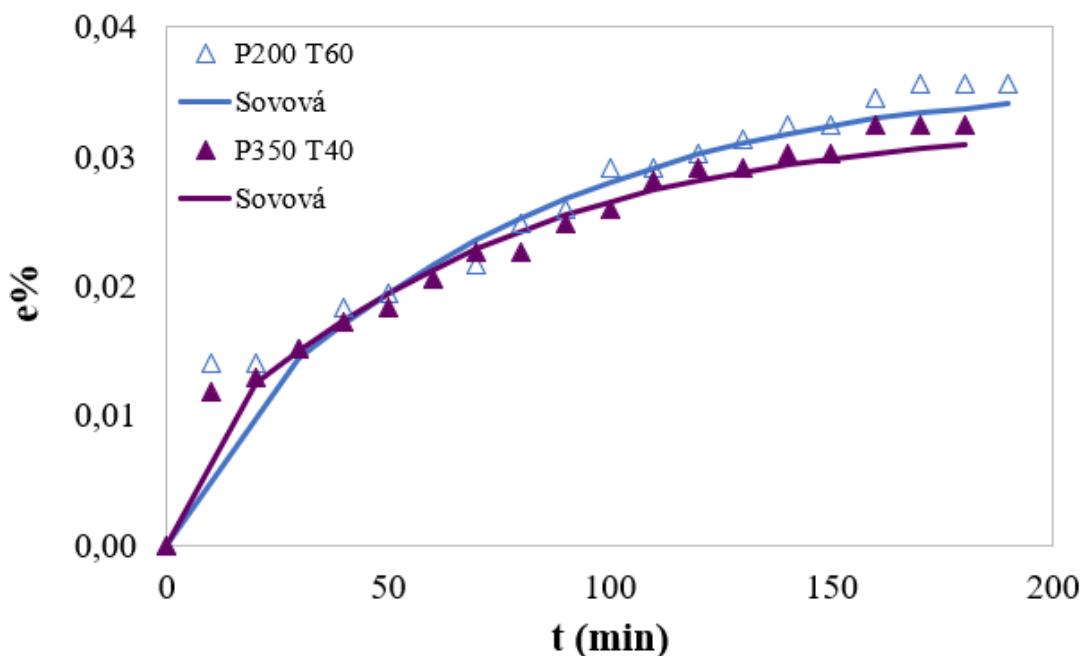
Além disso, é possível observar que os valores estimados para o parâmetro  $k_{fa0}$  em diversas condições experimentais foram iguais. Todavia, esse fenômeno pode ser justificado devido à similaridade da etapa rápida de extração entre os diferentes experimentos. Conforme Figura 9, constata-se que, apesar das diferentes condições de temperatura e pressão, o comportamento dos dados durante a etapa TEC é análogo. Dessa forma, o limite do intervalo

entre as etapas TEC e TEQ são muito próximos, resultando em um valor de  $k_{fa0}$  próximo ou igual para os diferentes conjuntos de dados.

Weinhold *et al.* (2008) fundamentam que o valor de  $k_{sa0}$  é inferior a  $k_{fa0}$  devido ao fato de que o soluto presente no interior da matriz vegetal requer mais tempo para alcançar a interface sólido-fluido, em comparação com o soluto disponível na parte externa da matriz, exposto durante a etapa de moagem. Isso leva à constatação de que o mecanismo de convecção, que é mais proeminente na fase inicial da extração, apresenta uma taxa mais elevada em relação ao mecanismo de difusão, que é característico da fase mais lenta.

A partir dos dados apresentados na Tabela 11, observa-se ainda que, em geral, os desvios relativos médios são menores que 10%, o que está alinhado com outros trabalhos disponíveis na literatura, como o de Bessa (2018) e Huang *et al.* (2011). Todavia, para a condição de 456 bar e 74 °C foi observado um desvio um pouco acima do esperado, igual a 12,74%.

Os melhores ajustes foram observados para a condições de 350 bar e 40 °C e 200 bar e 60 °C. A Figura 22 destaca os melhores ajustes, enquanto as demais curvas cinéticas são apresentadas no Anexo II.



**Figura 22** – Ajuste do modelo de Sovová (1994) para as condições de 350 bar e 40 °C e 200 bar e 60 °C.

Da Figura 22, tem-se que, além de se ajustar bem aos dados experimentais, o modelo conseguiu representar toda a curva cinética de extração. A curva ajustada pelo modelo é bem definida para os 3 estágios (TEC, TEQ e TEB), o que justifica o baixo desvio relativo médio, de 3,03% para a condição de 350 bar e 40 °C e 3,64% para 200 bar e 60 °C.

Para a condição de 456 bar e 74 °C, a modelagem sugeriu um tempo operacional maior associado à etapa de extração constante no início do processo. Esse padrão difere do comportamento tipicamente observado para o modelo de Sovová, no qual a fase inicial da extração costuma ocorrer em um intervalo mais curto do que as subsequentes, conforme indicado por Bensebia *et al.* (2016). No entanto, para este caso específico, parece que o modelo encontra dificuldade em representar adequadamente o segundo estágio, caracterizado por uma diminuição na taxa de extração, passando do estágio TEC para o TEB. Em outras palavras, a 456 bar e 74 °C o modelo possui dificuldade para representar a competição entre os fenômenos de convecção e difusão.

Além disso, para algumas condições operacionais, como 500 bar e 60 °C e 244 bar e 46 °C, apesar dos desvios abaixo de 10%, o modelo subestima os rendimentos, sendo inferiores aos observados experimentalmente. Com isso, há uma superestimação da resistência à transferência de massa, implicando que o modelo de Sovová necessita de um tempo de extração maior do que o observado experimentalmente para atingir o mesmo rendimento. Como consequência, ao realizar a extração dos dados, é possível notar que o modelo permite alcançar o rendimento similar ao obtido no experimento.

Enquanto isso, a Tabela 12 exibe os resultados observados pelo modelo de Esquível, com os resultados dos parâmetros estimados e o DRM%.

Da Tabela 12, observa-se que o parâmetro  $e_{lim}$  apresenta valores da mesma ordem de grandeza do rendimento  $e\%$ , o que mostra uma boa correlação do modelo com os resultados experimentais, uma vez que o parâmetro  $e_{lim}$  corresponde ao rendimento máximo para um tempo de extração infinito. Para o parâmetro  $b$ , tem-se que, em geral, seu valor aumenta com o aumento da pressão, enquanto para condições isobáricas, o aumento da temperatura tende a levar a uma redução no valor do parâmetro.

Para a condição de 456 bar e 74 °C, novamente se observou uma discrepância em relação às outras condições operacionais, onde tanto o parâmetro  $e_{lim}$  quanto o parâmetro  $b$  estão fora da faixa de valores esperados. Ao realizar o ajuste dos dados experimentais, percebeu-se que o

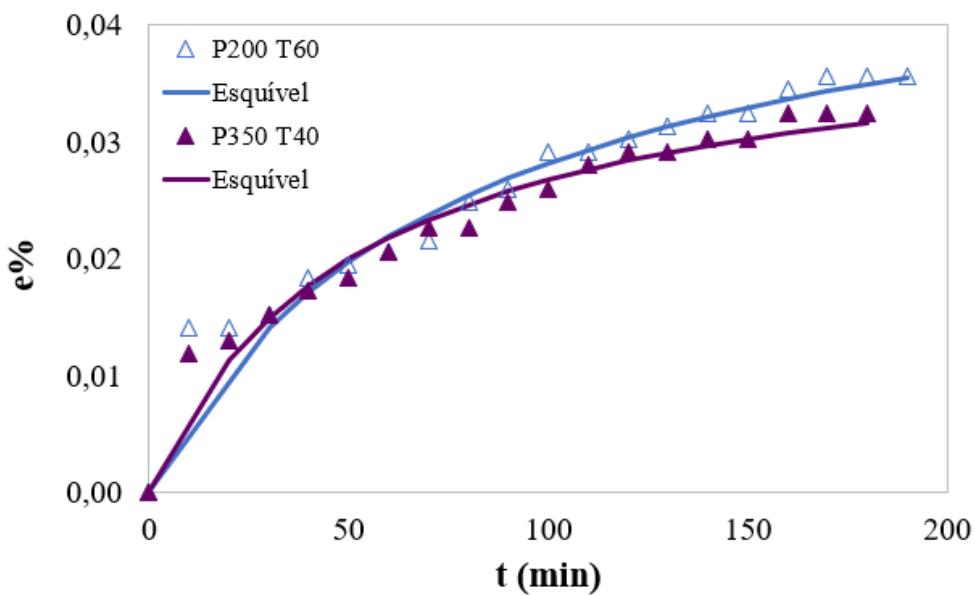
modelo se assemelha mais a uma reta, mesmo que a função do modelo seja exponencial. Isso indica que o modelo não é capaz de descrever adequadamente a curva cinética da extração em fluido supercrítico para essa condição. Isso se deve ao fato de que o dado experimental tem um comportamento distinto da curva típica de extração, onde os aumentos consecutivos no rendimento exibem um formato de degrau, dificultando assim a modelagem matemática do processo.

**Tabela 12** – Condições operacionais, densidade do CO<sub>2</sub>-SC, parâmetros estimados para o modelo de Esquível *et al.* (1999) e DRM%.

<b>P (bar)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>ρCO<sub>2</sub> (kg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>e<sub>lim</sub></b>	<b>b</b>	<b>DRM (%)</b>
350	40	935	0,0408	52,11	3,94
200	60	723	0,0498	76,61	3,22
456	74	873	95,5700	100000	9,95
350	80	789	0,1110	111,79	10,03
350	60	863	0,1503	283,14	6,29
456	46	959	0,3322	437,32	8,14
500	60	934	0,2346	312,97	5,61
244	74	705	0,0822	161,68	9,33
244	46	847	0,1936	238,80	8,30

O comportamento apresentado sugere que, para essa condição experimental, o modelo não é capaz de considerar a influência da resistência à transferência de massa, indicando uma extração constante e independente do tempo. Isso mostra que, apesar de conseguir descrever a etapa inicial da extração, para a condição de 456 bar e 74 °C, o modelo não é capaz de descrever os demais comportamentos existentes em uma típica curva cinética de extração por fluido supercrítico.

Devido ao bom ajuste observado para as condições de 200 bar e 60 °C e 350 bar e 40 °C, a Figura 23 exibe a comparação entre os valores observados e preditos pelo modelo de Esquível *et al.* (1999). As demais curvas são exibidas no Anexo II.



**Figura 23** – Ajuste do modelo de Esquível *et al.* (1999) para as condições de 350 bar e 40 °C e 200 bar e 60 °C.

A Figura 23 mostra que, diferente do modelo de Sovová (1994), que em seu melhor ajuste conseguiu representar bem as 3 etapas da extração, o modelo de Esquível *et al.* (1999) possuiu um melhor ajuste para representar as etapas iniciais da curva cinética. Com isso, notase que o modelo possui alguma dificuldade em representar a etapa correspondente à taxa de extração baixa, pois não mostra evidência de saturação ao atingir o tempo final da extração.

Essa diferença de comportamento pode ser explicada pelas abordagens distintas adotadas pelos modelos. Enquanto Sovová (1994) utiliza equações separadas para representar cada estágio da extração, o modelo de Esquível *et al.* (1999) emprega apenas uma equação para modelar toda a curva. Essa diferença metodológica torna mais difícil para o modelo de Esquível *et al.* (1999) representar com precisão as diferentes etapas da extração.

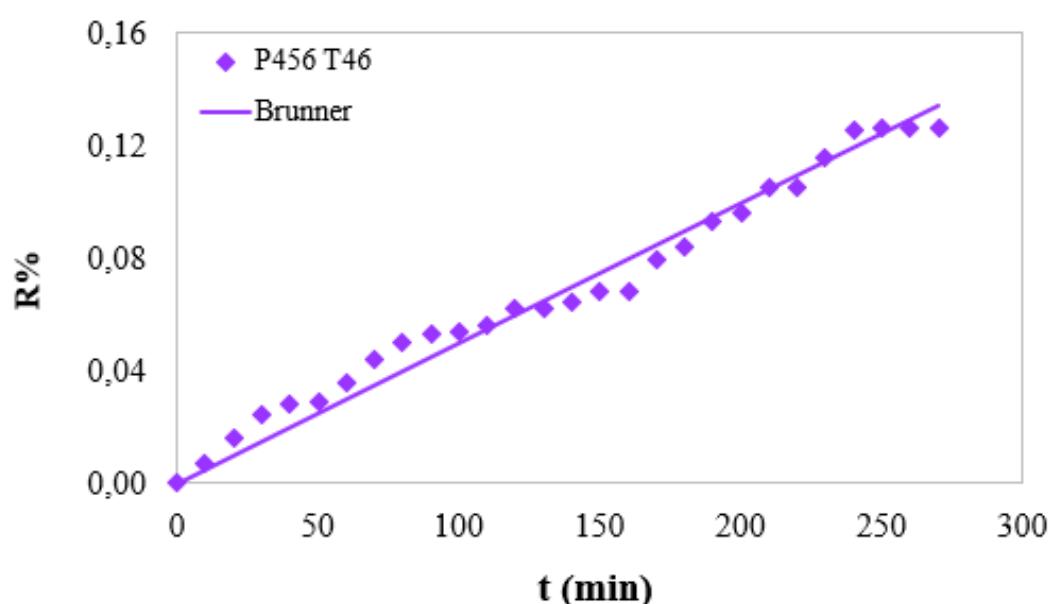
Apesar do modelo de Sovová (1994) ser mais bem sucedido para indicar a saturação da extração, em geral, os comportamentos das curvas cinéticas e resultados obtidos por ambos os modelos são similares. No que diz respeito aos desvios relativos médios, o modelo de Esquível *et al.* (1999) apresenta os menores desvios entre os valores observados e preditos.

Para o modelo de Brunner (1984), os resultados obtidos para a estimação dos parâmetros são mostrados na Tabela 13, juntos ao desvio relativo médio.

**Tabela 13** – Condições operacionais, parâmetros estimados para o modelo de Brunner (1984) e DRM%.

P (bar)	T (°C)	$\rho\text{CO}_2$ (kg/m <sup>3</sup> )	k (10 <sup>-3</sup> )	DRM (%)
350	40	935	0,02608	25,26
200	60	723	0,02677	20,96
456	74	873	0,11949	11,24
350	80	789	0,05151	13,19
350	60	863	0,03810	12,11
456	46	959	0,06179	10,80
500	60	934	0,05065	14,81
244	74	705	0,02489	15,32
244	46	847	0,05440	11,70

A Tabela 13 mostra que para o modelo de Brunner (1984), para todas as condições experimentais avaliadas, não foi possível obter um bom ajuste aos dados experimentais. Isso se comprova pelos altos desvios, que variaram entre 10,80% e 25,26%. A Figura 24 representa a condição de melhor ajuste, correspondente a 456 bar e 46 °C.



**Figura 24** – Ajuste do modelo de Brunner (1984) para a condição de 456 bar e 46 °C.

A partir da Figura 24, nota-se que o modelo de Brunner (1984) exibe o comportamento de uma reta. Isso mostra que, para o conjunto de dados experimentais modelado, o modelo de Brunner não é capaz de representar a resistência à transferência de massa, sendo capaz de representar apenas a etapa rápida da extração.

Bessa (2018) observou um comportamento semelhante ao analisar as curvas cinéticas da extração de óleo de *Hevea brasiliensis* usando o modelo de Brunner (1984). Nesse estudo, o modelo mostrou desvios significativos, sendo representado como uma reta. O autor concluiu que, embora o modelo fosse capaz de ajustar a fase inicial da extração, ele não conseguia capturar os fenômenos de transferência de massa envolvidos. Apesar de indicar que o modelo poderia se adaptar melhor a matérias-primas como folhas, devido à menor resistência à transferência de massa em comparação com as sementes de seringueira, este trabalho também não conseguiu obter um ajuste satisfatório dos dados.

Foram avaliados ainda os modelos de Reverchon e Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003). As Tabelas 14 e 15 mostram os parâmetros estimados e DRM% para cada modelo. As curvas dos melhores resultados são apresentadas nas Figuras 25 e 26, enquanto as demais curvas estão inclusas no Anexo II.

**Tabela 14** – Condições operacionais, parâmetros estimados para o modelo de Reverchon e Osseo (1994) e DRM%.

<b>P (bar)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pCO<sub>2</sub> (kg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>t<sub>i</sub></b>	<b>DRM (%)</b>
350	40	935	52,63	5,04
200	60	723	60,7	4,67
465	74	873	144,4	26,52
350	80	789	87,6	10,92
350	60	863	109,6	11,08
456	46	959	146,7	11,98
500	60	934	137,9	10,33
244	74	705	152,1	10,67
244	46	847	121,5	10,72

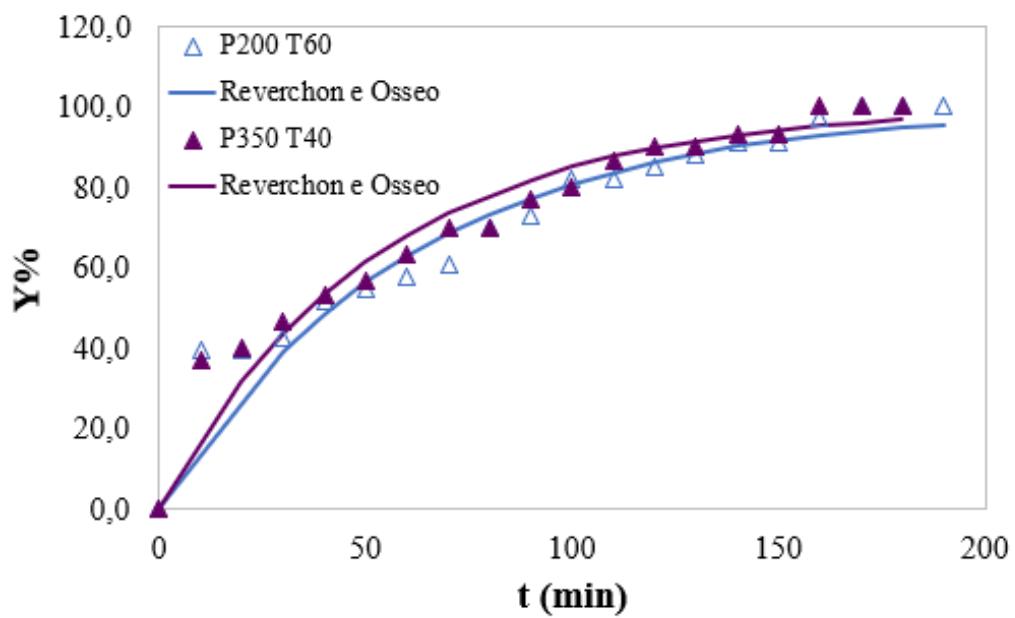
**Tabela 15** – Condições operacionais, parâmetros estimados para o modelo de Zeković *et al.* (2003) DRM%.

P (bar)	T (°C)	pCO <sub>2</sub> (kg/m <sup>3</sup> )	a	b	DRM (%)
350	40	935	-0,9890	-0,1165	3,97
200	60	723	-0,9622	-0,0071	4,56
456	74	873	-0,4863	0,1656	21,75
350	80	789	-0,6630	-0,0241	10,59
350	60	863	-0,6047	0,1004	11,26
456	46	959	-0,4662	0,1026	14,33
500	60	934	-0,4638	0,0644	9,60
244	74	705	-0,3661	-0,0750	10,94
244	46	847	-0,5190	0,0503	11,32

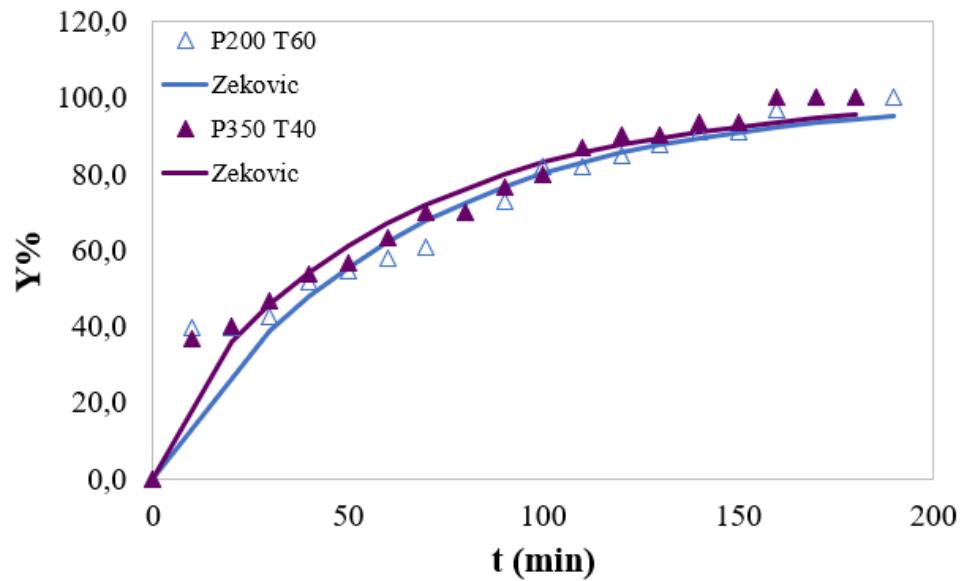
A partir dos resultados observados nas Tabelas 14 e 15, constata-se que os modelos de Reverchon e Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003) mostraram baixos desvios para alguns ensaios, mas ambos os modelos apresentaram desvios relativos médios superiores aos obtidos para a modelagem por Sovová (1994) e Esquível *et al.* (1999). Sendo assim, conclui-se que, dentre os modelos utilizados, o modelo de Brunner (1984) foi o que menos se ajustou aos dados experimentais.

No que diz respeito aos parâmetros do modelo de Zeković *et al.* (2003), pode-se concluir que estão em concordância com trabalhos da literatura, em que o parâmetro a é negativo, enquanto b pode adotar tantos valores positivos quanto negativos (SARTORI *et al.*, 2017; BESSA, 2018).

A partir das Figuras 25 e 26, nota-se que os modelos de Reverchon e Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003) mostraram ajustes satisfatórios para algumas das condições experimentais estudadas. Em ambos os casos, é possível observar o comportamento característico de cada etapa da extração, da etapa lenta até a etapa rápida. Todavia, esse bom ajuste se limita apenas a algumas condições operacionais, enquanto, para as demais, os modelos demonstram dificuldade para ajustar os dados experimentais correspondentes à etapa lenta de extração, o que justifica os DRM% mais elevados para alguns experimentos.



**Figura 25** – Ajuste do modelo de Reverchon e Osseo (1994) para a condição de 200 bar e 60 °C.



**Figura 26** – Ajuste do modelo de Zeković *et al.* (2003) para a condição de 200 bar e 60 °C.

De modo geral, os modelos de Sovová (1994) e Esquível *et al.* (1999) apresentaram performance similar, sendo que o último apresentou os menores desvios. Por outro lado, o modelo de Brunner (1984) não mostrou um ajuste satisfatório dos dados, representando apenas

a etapa rápida da extração, sem conseguir capturar a resistência à transferência de massa. Essa conclusão é corroborada pelos elevados desvios relativos médios observados para esse modelo, que, em comparação aos demais, são os maiores desvios obtidos.

### 5.8. Solubilidade Experimental

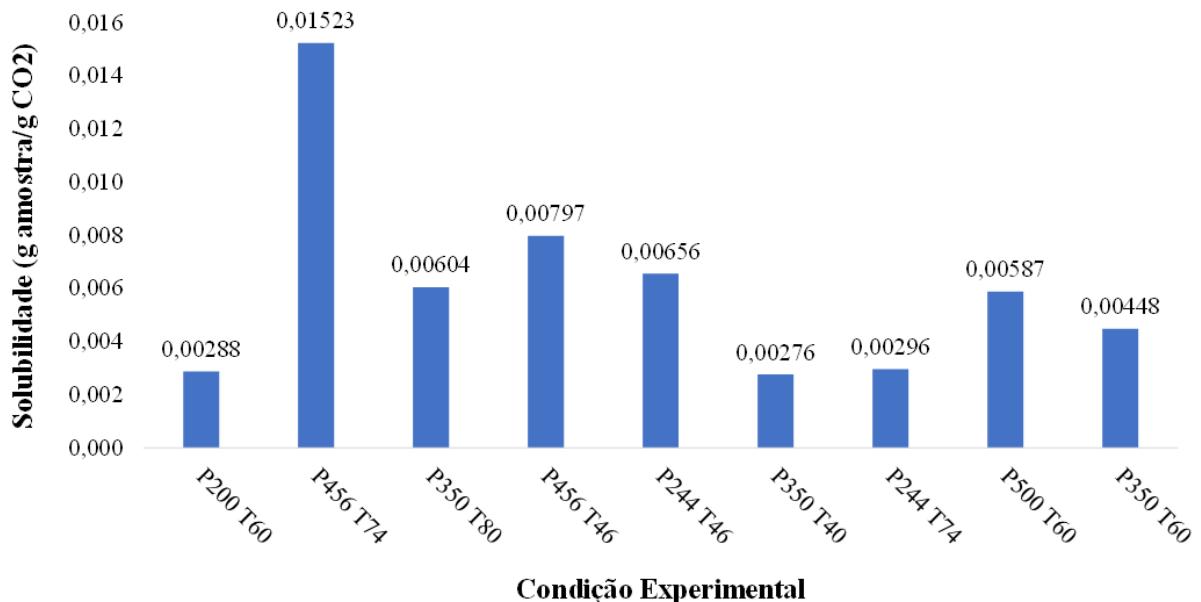
A análise da solubilidade é fundamental para a compreensão do comportamento da interação entre o solvente ( $\text{CO}_2$  supercrítico) e o soluto (compostos presentes no óleo). Além disso, dados de solubilidade também são essenciais para determinar a viabilidade da separação supercrítica do composto de interesse e estabelecer as condições operacionais adequadas. Nesse contexto, a Tabela 16 apresenta os resultados da solubilidade do óleo para cada uma das condições experimentais investigadas.

A análise dos dados apresentados na Tabela 16 revela que, de modo geral, a solubilidade do óleo de ora-pro-nóbis em  $\text{CO}_2$  supercrítico tem comportamento análogo aos observados para os rendimentos. Pode-se observar que os maiores valores de solubilidade foram obtidos para as maiores condições de temperatura e pressão.

**Tabela 16** – Dados de solubilidade para cada condição experimental.

Ensaios	T (°C)	P (bar)	Solubilidade (g amostra/g $\text{CO}_2$ )
1	60	200	0,00288
2	74	456	0,01523
3	80	350	0,00604
4	46	456	0,00797
5	46	244	0,00656
6	40	350	0,00276
7	74	244	0,00296
8	60	500	0,00587
9	60	350	0,00448

A fim de facilitar a visualização dos dados e comparação do comportamento da solubilidade de acordo com a modificação dos parâmetros de processo, pressão e temperatura, a Figura 27 ilustra a solubilidade experimental do óleo de ora-pro-nóbis para cada uma das condições investigadas.



**Figura 27** – Solubilidade experimental do óleo de ora-pro-nóbis em CO<sub>2</sub>-SC para todas as condições experimentais.

Avaliando tanto os resultados expostos na Tabela 16 quanto na Figura 27, pode-se perceber que o maior valor de solubilidade foi exibido para a condição de 456 bar e 74 °C. Além disso, ao fixar a temperatura em 60 °C, nota-se que o aumento da pressão favorece o aumento da solubilidade. De forma análoga, para os experimentos conduzidos a 46 °C, é possível perceber que o aumento da pressão teve um efeito positivo na solubilidade.

Por outro lado, os experimentos realizados em condições isobáricas, tanto a 350 quanto a 456 bar, mostram que o aumento da temperatura também levou aos maiores valores de solubilidade. Em contrapartida, para os ensaios em menor pressão, de 244 bar, a condição de menor temperatura teve um efeito positivo sobre a solubilidade.

Observa-se ainda que a solubilidade experimental para a condição de 500 bar e 60 °C é inferior a outros experimentos conduzidos em menores pressões, o que, a princípio, difere do

comportamento esperado. Todavia, Aziz *et al.* (2022) já haviam observado comportamento semelhante, em que para alguns casos, o aumento da pressão pode provocar a redução da solubilidade. Segundo os autores, essa variação pode ser explicada pelo fato de que o aumento da pressão geralmente aumenta a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico, melhorando seu poder de solvatação e, consequentemente, aumentando o processo de extração e a solubilidade. No entanto, o aumento da pressão também diminui a difusividade, uma vez que a viscosidade aumenta, dificultando a penetração do solvente no soluto e sua dispersão nos poros da matriz vegetal. Além disso, o aumento da pressão pode reduzir a fração de vazios, diminuindo a eficiência da extração.

Até o momento, não foram publicados estudos sobre a solubilidade do óleo de *Pereskia aculeata* em CO<sub>2</sub>-SC. Por isso, diferentes sistemas com CO<sub>2</sub> supercrítico foram investigados a fim de melhor compreender as tendências de comportamento da solubilidade em função das diferentes condições de temperatura e pressão.

Bessa (2018) notou que, para o óleo da *H. brasiliensis* em CO<sub>2</sub>-SC, o aumento da pressão em condições isotérmicas resultou em maior solubilidade. Em condições isobáricas, o aumento da temperatura levou a uma redução da solubilidade. No entanto, ele observou que, nos ensaios realizados a 350 bar, o aumento da temperatura teve um efeito positivo na solubilidade. Isso ocorreu porque a pressão de vapor dos componentes foi superior à densidade do solvente, facilitando a evaporação dos constituintes extraídos a 350 bar e sendo solvatados pelo CO<sub>2</sub> supercrítico.

Paschoal (2018) também concluiu que o aumento da pressão e da temperatura contribuíram para o aumento da solubilidade do óleo de *Bidens pilosa* em dióxido de carbono supercrítico. Lee *et al.* (2018) também constatou que as condições de maior pressão e menor temperatura favoreceram o aumento da solubilidade do óleo de palma em CO<sub>2</sub>-SC. Isso foi justificado a partir da densidade, em que incrementos na densidade do CO<sub>2</sub> permite solubilizar mais óleo.

No que diz respeito à influência da temperatura, o aumento da temperatura enfraquece estruturas mais robustas e facilita a liberação dos constituintes ligados à matriz da planta. Além disso, o aumento da temperatura aumenta a taxa de difusão do soluto para fora dos poros da matriz vegetal para o fluxo do solvente. No entanto, assim como a pressão, a temperatura também tem efeitos contraditórios, pois ao mesmo tempo em que reduz a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico, aumenta a pressão de vapor dos constituintes presentes no óleo. Como resultado,

pode haver uma competição entre esses efeitos, levando a variações na solubilidade do soluto em CO<sub>2</sub> supercrítico (AZIZ *et al.*, 2022).

Com base nos resultados obtidos, a análise aponta que o aumento da pressão está associado a uma maior solubilidade, enquanto a influência da temperatura não segue uma tendência única. A resposta da solubilidade ao aumento ou redução da temperatura depende das características da matéria-prima, o que pode ser justificado devido ao óleo apresentar compostos polifuncionais que são muito distintos entre si em relação às características físico-químicas.

Correlacionando ainda o estudo de solubilidade com os compostos identificados nos extratos supercríticos, tem-se que o aumento da pressão favoreceu a solubilização do fitol e esqualeno, mostrando que o aumento da densidade do CO<sub>2</sub> se mostra influente para obtenção desse composto. Em condições isobáricas, constata-se que o aumento da temperatura favorece a extração de  $\beta$ -sitosterol e 2,4-ditercbutilfenol, indicando que o aumento da pressão de vapor desses constituintes favorece sua extração.

Em geral, o presente trabalho indica que tanto o aumento da pressão como da temperatura exerceu um efeito positivo sobre a solubilidade, estando de acordo com os trabalhos disponíveis na literatura.

### **5.9. Análise Estatística da Solubilidade**

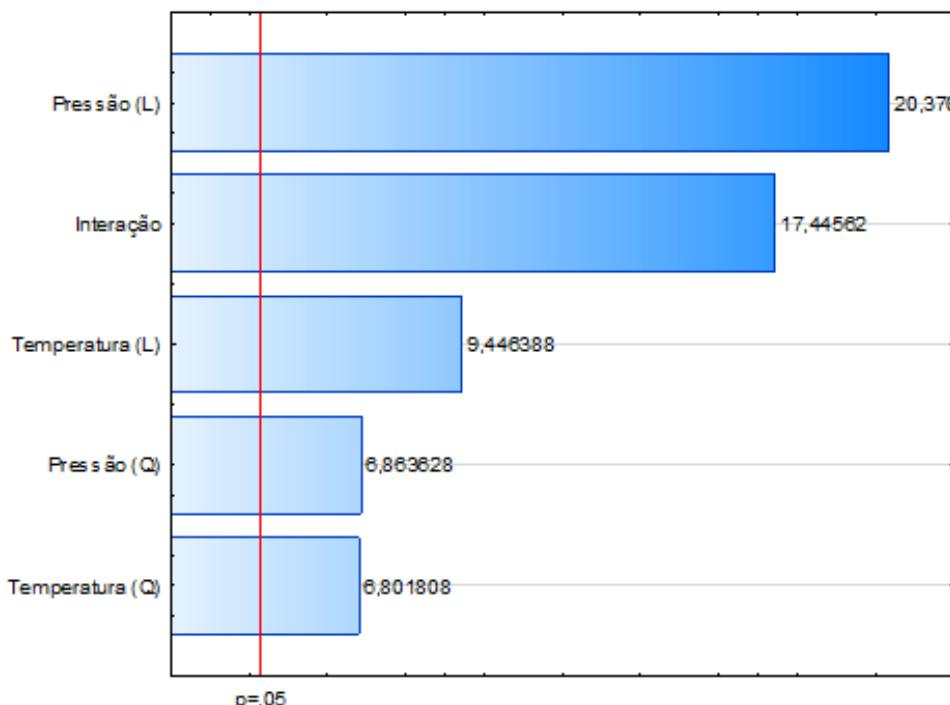
Conforme mencionado anteriormente na análise estatística do rendimento da extração supercrítica de ora-pro-nóbis, também foram conduzidas avaliações semelhantes para analisar o comportamento da solubilidade. Com isso, serão apresentados o ajuste do modelo de regressão (Equação 34), análise ANOVA e gráfico de Pareto, além da apresentação da superfície de resposta e curva de nível. Todas as análises foram conduzidas considerando 95% de confiança.

A Tabela 17 e a Figura 28 mostram os resultados do teste ANOVA, visando avaliar a significância dos termos linear e quadrático para a pressão e temperatura, bem como a interação entre os termos lineares. Segundo os resultados apresentados, todos os termos do modelo de regressão apresentam significância estatística ( $p$ -valor < 0,5).

**Tabela 17** – Resultados do teste ANOVA para a solubilidade.

Fator	SR	F	p-valor
Temperatura (L)	0,000009	8932343	0,011022
Temperatura (Q)	0,000004	46,2646	0,020938
Pressão (L)	0,000040	414,9386	0,002401
Pressão (Q)	0,000005	47,1094	0,020574
Termo de interação	0,000029	304,3497	0,003270
$\beta_0$	0,000040	138,8561	0,007159

SR – Somatório dos resíduos; F – F de Fischer; L – termo linear; Q – termo quadrático.



**Figura 28** – Gráfico de Pareto para a análise dos fatores do modelo de regressão (solubilidade) obtidos pelo planejamento DCCR, considerando 95% de confiança.

A Figura 28 confirma os dados já apontados pela análise ANOVA, em que todos os termos são significativos e contribuem para a variável de resposta, que é a solubilidade. Pode-se concluir ainda que os resultados foram muito similares aos obtidos para a análise estatística

do rendimento, todavia com uma inversão entre o nível de significância entre o termo linear da temperatura e o termo quadrático da pressão. Assim, tem-se que tanto a pressão quanto a temperatura foram determinantes para os resultados obtidos.

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da estimação de parâmetros para o modelo de regressão proposto. Cabe destacar que as incertezas paramétricas estão uma ordem de grandeza abaixo do valor estimado do parâmetro e, o p-valor é menor que o nível de significância arbitrado, ou seja, inferior a 5%. Os resultados apresentados, portanto, estão de acordo com os dados previamente apresentados na análise ANOVA e gráfico de Pareto.

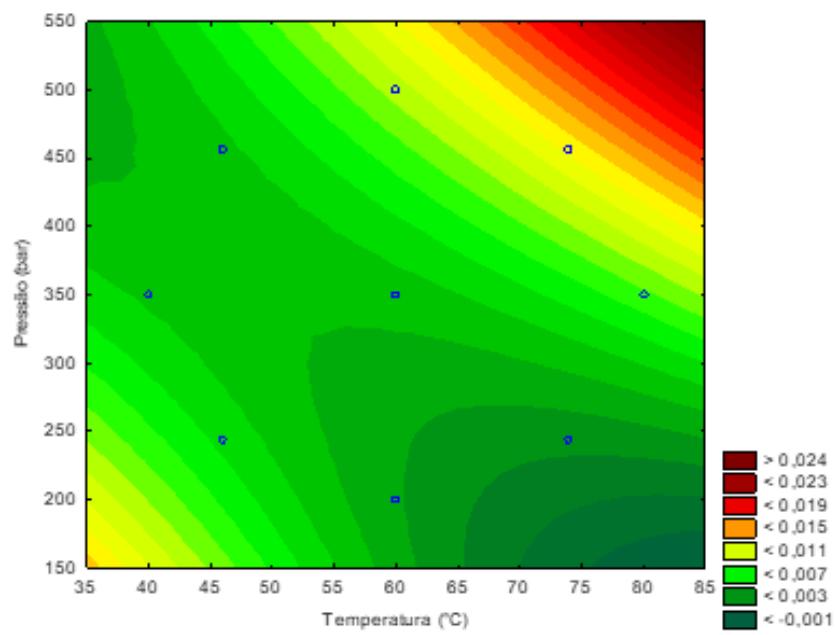
**Tabela 18** – Parâmetros estimados para o modelo de regressão (solubilidade).

Fator	Valor Estimado	p-valor
Temperatura (L)	$(-0,00110 \pm 0,00009) \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$	0,006
Temperatura (Q)	$(0,000004 \pm 0,000001) \text{ } ^\circ\text{C}^{-2}$	0,021
Pressão (L)	$(-0,00014 \pm 0,00001) \text{ bar}^{-1}$	0,005
Pressão (Q)	$(0,00000008 \pm 0,00000001) \text{ bar}^{-2}$	0,021
Termo de interação	$(0,0000020 \pm 0,0000001) \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \text{ bar}^{-1}$	0,003
$\beta_0$	$0,057 \pm 0,004$	0,004

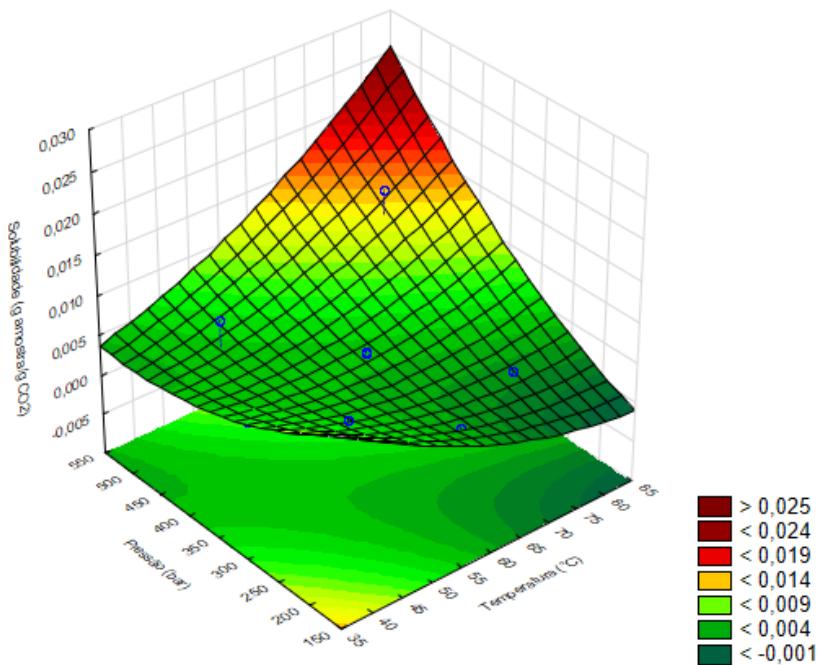
As Figura 29 e 30 mostram a curva de nível a superfície de resposta do modelo de regressão a fim de ilustrar como a solubilidade varia de acordo com as diferentes de pressão e temperatura.

A curva de nível, Figura 29, aponta que o aumento da pressão e da temperatura levam aos maiores resultados da solubilidade, comportamento que é confirmado pela Figura 30, onde se tem um máximo no sentido das maiores condições dessas variáveis. Esse comportamento também foi verificado no estudo estatístico do rendimento.

Conforme Figura 29, nota-se ainda que para baixos valores de temperatura e pressão, a solubilidade fica na faixa de 0,014 g amostra/ g CO<sub>2</sub>. Entre 45 °C e 55 °C a variação da pressão não exerce um efeito significativo na solubilidade, enquanto para as temperaturas mais altas, o aumento da pressão maximiza o resultado da solubilidade.



**Figura 29** – Curva de nível do modelo de regressão proposto para correlacionar pressão, temperatura e a solubilidade.



**Figura 30** – Superfície de resposta do modelo de regressão proposto para correlacionar pressão, temperatura e a solubilidade.

Para o estudo de solubilidade, os autovalores e autovetores (5E-6 e -1,2E-7) indicam a existência de um ponto de sela na superfície de resposta, ilustrada na Figura 30. Além disso, a análise dos pontos estacionários do sistema mostra que o ponto crítico foi obtido para a condição de 47 °C e 373,3 bar, valor que se encontra dentro da faixa de temperatura e pressão utilizada.

### 5.10. Modelos de Solubilidade

A modelagem da solubilidade permite realizar a correlação e predição de dados de solubilidade em CO<sub>2</sub>-SC. Neste contexto, equações semiempíricas baseadas na densidade do solvente – modelos de solubilidade de Chrastil (1982), Adachi e Lu (1982), del Valle e Aguilera (1988) e Gordillo *et al.* (1999) – foram utilizados para analisar a capacidade de ajustar e predizer os dados de solubilidade do óleo em dióxido de carbono supercrítico e identificar as melhores condições experimentais para o rendimento global ou de componentes específicos.

A Tabela 19 exibe os resultados da solubilidade experimental ( $S_{exp}$ ) para todas as condições experimentais avaliadas, mostrando ainda a solubilidade calculada ( $S_{calc}$ ) obtida para cada um dos modelos com seus respectivos desvios ponto a ponto. A

Tabela 20 resume os parâmetros estimados, para cada um dos modelos de solubilidade, e seus respectivos desvios relativos médios (DRM).

Analizando a Tabela 19, é possível observar que o modelo de Chrastil (1982) apresentou boa correlação com os dados de solubilidade experimental para as condições de 350 bar e 80 °C e 350 bar e 60 °C, com desvios de 4,78% e 10,98%, respectivamente. No entanto, para as condições de 456 bar e 46 °C, 456 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C, o modelo não ajustou bem os dados experimentais, exibindo desvios entre 40,3% e 55,67%.

O modelo de Adachi e Lu (1983) obteve resultados satisfatórios para as condições de 244 bar e 74 °C, 350 bar e 80 °C e 200 bar e 60 °C, com desvios na faixa de 0,8% a 8,6%. Porém, não se ajustou bem aos dados para as condições de 456 bar a 46 °C e 74 °C, com desvios de 54,74% e 58,65%.

Para o modelo de del Valle e Aguilera (1999), o melhor ajuste ocorreu para 350 bar e 80 °C, onde o desvio foi de 4,26%. Contudo, esse modelo não se mostrou adequado para as condições de 456 bar a 46 °C e 74 °C e 244 bar e 46 °C, com desvios variando entre 40,02% e 55,43%.

**Tabela 19** – Solubilidade experimental e calculada pelos modelos de Chrastil (1982), del Valle e Aguilera (1988), Adachi e Lu (1983) e Gordillo *et al.* (1999) para todas as condições experimentais e seus desvios relativos.

T (°C)	P (bar)	S <sub>exp</sub> (g amostra/g CO <sub>2</sub> )	S <sub>calc</sub> (g amostra/g CO <sub>2</sub> )				Desvio (%)			
			Chrastil (1982)	Adachi e Lu (1983)	del Valle (1988)	Gordillo (1999)	Chrastil (1982)	Adachi e Lu (1983)	Del Valle (1988)	Gordillo (1999)
60	200	0,0029	0,0025	0,0031	0,0025	0,0032	14,60%	8,60%	14,27%	12,16%
74	456	0,0152	0,0080	0,0063	0,0080	0,0131	47,63%	58,65%	47,77%	14,16%
80	350	0,0060	0,0063	0,0058	0,0063	0,0065	4,78%	3,67%	4,26%	7,55%
46	456	0,0080	0,0048	0,0036	0,0048	0,0028	40,30%	54,74%	40,02%	64,84%
46	244	0,0066	0,0029	0,0049	0,0029	0,0048	55,67%	24,72%	55,43%	26,83%
40	350	0,0028	0,0035	0,0038	0,0035	0,0033	26,24%	39,39%	26,85%	19,30%
74	244	0,0030	0,0034	0,0029	0,0034	0,0027	15,08%	0,80%	14,93%	9,98%
60	500	0,0059	0,0068	0,0047	0,0068	0,0068	15,94%	20,26%	16,21%	15,66%
60	350	0,0045	0,0050	0,0056	0,0050	0,0045	10,98%	25,46%	11,30%	0,67%

**Tabela 20** – Parâmetros estimados para cada um dos modelos de solubilidade e seus respectivos desvios relativos médios.

Modelos	Parâmetros					DRM (%)	
Chrastil (1982)	k 3,9938	a -21,734	b -3520,5			25,692%	
Adachi e Lu (1983)		a -238,28	b -1000	e1 40,153	e2 -0,0061	26,255%	
del Valle e Aguilera (1988)	k 3,9879		b -100000	a1 -22,69	a2 -2887,9	25,671%	
Gordillo (1999)	c0 36,824	c1 -0,118	c2 1,62E-06	c3 3,58E-04	c4 -0,1492	c5 6,11E-05	19,017%

O modelo de Gordillo *et al.* (1999) se destacou ao ajustar bem os ensaios realizados a 350 bar e 60 °C, 350 bar e 80 °C e 244 bar e 74 °C, com desvios de 0,67%, 7,55% e 9,98%, respectivamente. Exceto para a condição de 456 bar e 46 °C, que apresentou elevado desvio de 64,84%, as demais condições estudadas tiveram desvios inferiores a 27%.

Devido à escassez de informações na literatura sobre a modelagem da solubilidade do óleo de ora-pro-nóbis em CO<sub>2</sub>-SC, outros sistemas serão avaliados comparar os comportamentos observados no presente trabalho com outros estudos.

Lee *et al.* (2018), empregaram os modelos de Chrastil, del Valle e Aguilera e Adachi e Lu para modelar os dados de solubilidade de óleo de palma vermelho em dióxido de carbono supercrítico e obtiveram desvios relativos médios de 41,61% utilizando Chrastil (1982), 40,65% para del Valle e Aguilera (1999) e 13,57% para Adachi e Lu (1983).

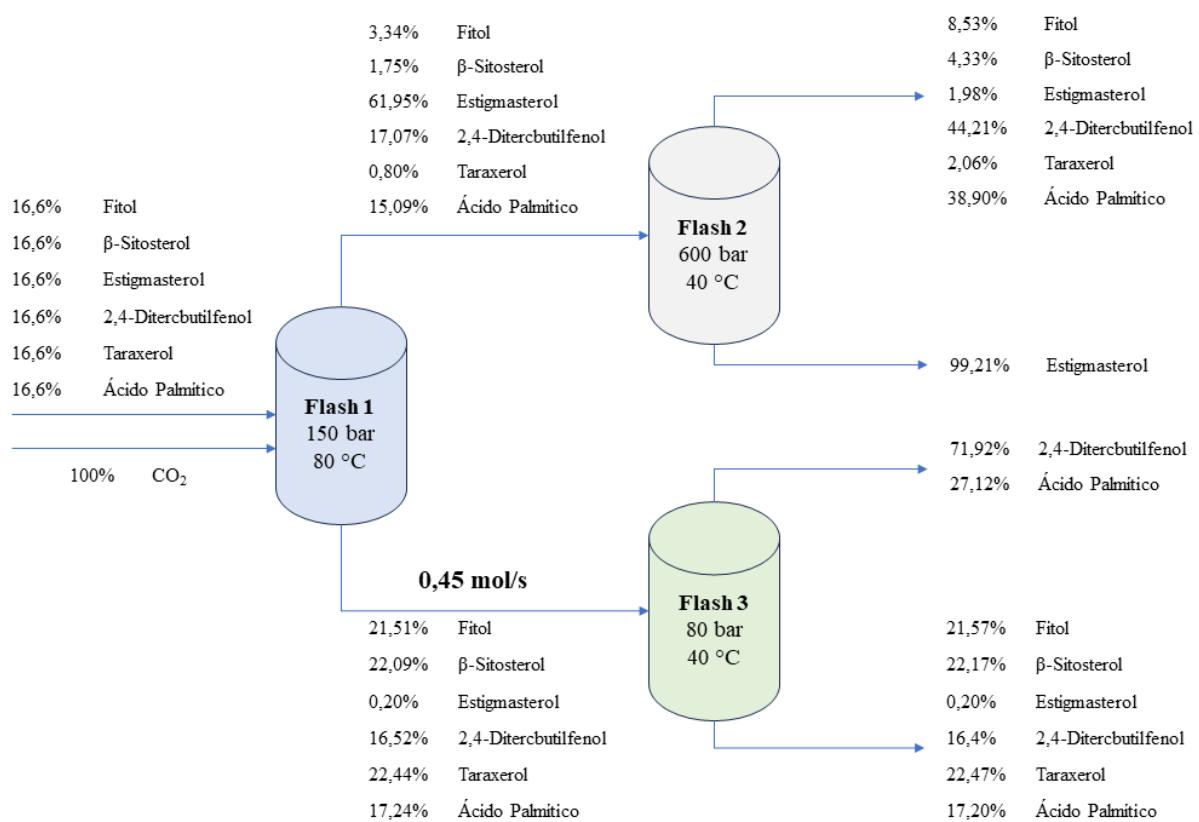
A partir do exposto e, observando os desvios relativos médios apresentados na Tabela 24 (Anexo I), o modelo de Gordillo *et al.* (1999) demonstrou o melhor ajuste ao conjunto de dados experimentais.

### **5.11. Simulação**

Um fluxograma para a separação dos componentes presentes nos extratos de ora-pro-nóbis foi proposto a partir da realização de simulações no *software* DWSIM. A Figura 31 ilustra o processo, destacando as condições de operação em cada *flash*, bem como as correntes de topo e fundo com suas composições.

Conforme apresentado na Figura 31, uma corrente com CO<sub>2</sub> é alimentada com a mistura sintética caracterizando o óleo de ora-pro-nóbis. Essas correntes são submetidas a um *flash* nas condições de 150 bar e 80 °C. A corrente de topo resultante é então submetida a uma nova operação, dessa vez na condição de 600 bar e 40°C, culminando na obtenção de 99,21% de estigmasterol na corrente de fundo. Enquanto isso, a corrente de fundo do primeiro *flash* é submetida às condições de 80 bar e 40 °C, permitindo assim a obtenção de 71,92% de 2,4-ditercbutilfenol e 27,12% de ácido palmítico na corrente de topo.

As Tabelas 21 a 23 resumem as condições de alimentação bem como as correntes de topo e fundo para cada condição estudada.



**Figura 31** – Fluxograma simplificado para a separação de constituintes do óleo de ora-pro-nóbis. Fonte: Próprio autor.

**Tabela 21** – Composição da corrente de alimentação, correntes de topo e fundo para o *flash* 1 (150 bar e 80 °C).

Componente	Alimentação	Topo	Fundo
Fitol	0,17	3,31E-05	0,0286
$\text{CO}_2$	0,00	0,99900904	0,8668
$\beta$ -Sitosterol	0,17	1,73E-05	0,0294
Estigmasterol	0,17	6,14E-04	0,0003
2,4-Ditercbutilfenol	0,17	1,69E-04	0,0220
Taraxerol	0,17	7,90E-06	0,0299
Ácido Palmítico	0,17	1,50E-04	0,0223

**Tabela 22** – Composição da corrente de alimentação, correntes de topo e fundo para o *flash* 2 (600 bar e 40 °C).

Componente	Alimentação	Topo	Fundo
Fitol	0,033	3,30E-04	4,14E-05
CO <sub>2</sub>	0,000	0,99613631	0,9286
β-Sitosterol	0,017	1,67E-04	5,17E-05
Estigmasterol	0,620	7,63E-05	0,0709
2,4-Ditercbutilfenol	0,171	1,71E-03	0,0002
Taraxerol	0,008	7,95E-05	1,50E-05
Ácido Palmítico	0,151	1,50E-03	0,0002

**Tabela 23** – Composição da corrente de alimentação, correntes de topo e fundo para o *flash* 3 (80 bar e 40 °C).

Componente	Alimentação	Topo	Fundo
Fitol	0,215	3,31E-08	7,68E-02
CO <sub>2</sub>	0,000	0,99999355	0,6439
β-Sitosterol	0,221	1,10E-09	7,89E-02
Estigmasterol	0,002	2,72E-08	7,11E-04
2,4-Ditercbutilfenol	0,165	4,64E-06	0,0584
Taraxerol	0,224	3,13E-10	8,00E-02
Ácido Palmítico	0,172	1,75E-06	0,0612

Pode-se observar na Tabela 21 que a condição de 150 bar e 80 °C é favorável para promover uma primeira separação dos compostos, havendo um enriquecimento da fração de estigmasterol na corrente de topo. Todavia, nessa etapa, ainda não é possível separar totalmente algum dos compostos presentes, seja na corrente de topo ou fundo. Vale destacar ainda que,

devido ao fato da fração de CO<sub>2</sub> ser muito superior às demais, realiza-se o cálculo da fração normalizada para as correntes de topo e fundo, desconsiderando assim a fração de CO<sub>2</sub>.

Com isso, a corrente de topo resultante do *flash* 1 é então utilizada como composição de entrada para a condição de 600 bar e 40 °C, onde finalmente pode-se observar a separação do estigmasterol na corrente de fundo, conforme Tabela 22 e Figura 31, dado que o composto atinge a fração molar de 99,21%. Por outro lado, a corrente de fundo desse mesmo *flash* é alimentada ao próximo *flash* do circuito, na condição de 80 bar e 40 °C, permitindo a obtenção de 71,92% de 2,4-ditercbutilfenol e 27,12% ácido palmítico.

Isso mostra que as condições de temperatura e pressão são essenciais para a determinação das condições ideais para o fracionamento de compostos presentes nos extratos produzidos pela técnica de extração com dióxido de carbono supercrítico. Além disso, a partir das observações feitas, pode-se avaliar a ampliação do estudo visando a identificação e isolamento dos constituintes de interesse visando seu potencial farmacológico.

Para os compostos isolados segundo a simulação, os principais usos para o estigmasterol podem estar relacionados a investigações de sua ação antimicrobiana, antitumoral, antidiabética e ansiolítica (Mailafiya *et al.*, 2018; Gosh, Maity e Singh, 2011; Wang *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2022). Enquanto isso, os usos do 2,4-ditercbutilfenol podem abranger aplicações como inseticida e similares (NAIR *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020).

Os resultados das simulações se mostraram promissores e, recomenda-se que em pesquisas futuras, sejam expandidas as condições avaliadas no presente trabalho, como quantidade de compostos, composição e condições de operação. Desse modo, é possível empregar o mapeamento da separação de constituintes do óleo de *P. aculeata* para otimizar a eficiência econômica e energética associada aos procedimentos experimentais, visto que, obtido o perfil de separação da mistura mediante variações nas condições de operação, pode-se maximizar a precisão do processo e melhorar a assertividade na escolha das condições de pressão e temperatura.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que, dentre as técnicas convencionais, a maceração dinâmica apresentou os melhores resultados (8,5%), seguida das técnicas de extração com Soxhlet (7,5%) e ultrassom (2,5%). Enquanto isso, para a técnica de extração supercrítica foi a condição de 456 bar e 74 °C que levou ao maior rendimento, igual a 0,23%. Nesse caso, o estudo estatístico tanto do rendimento quanto da solubilidade indicou que os termos lineares e quadráticos da pressão e temperatura, além do termo linear de interação, foram significativos para as variáveis de resposta estudadas. Isso mostra que, para os extratos de *P. aculeata*, ambas as condições influenciam na eficácia da operação.

A avaliação dos extratos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas permitiu a identificação de um grande conteúdo de hidrocarbonetos, além da existência de compostos como terpenoides, fitosteróis e ésteres derivados de ácidos graxos, por exemplo. De forma geral, observou-se que os extratos produzidos com CO<sub>2</sub>-SC apresentaram maior variedade de estruturas quando comparados aos compostos obtidos pelas técnicas convencionais. Além disso, constatou-se que compostos como fitol e esqualeno foram favorecidos pelo aumento da pressão, enquanto taraxerol, lupeol e  $\gamma$ -sitosterol foram obtidos em maior quantidade nos extratos obtidos em menores pressões.

No ensaio de ação anticancerígena, foi possível observar que em nenhuma das condições estudadas (500 bar e 60 °C, 456 bar e 46 °C, 350 bar e 60 °C e 244 bar e 46 °C) foi possível observar a inibição de crescimento celular mínima de 30%. Apesar disso, dentre as linhagens tumorais avaliadas, o resultado mais promissor foi para a linhagem de leucemia (K562), para as condições de 456 bar e 46 °C e 244 bar e 46 °C na concentração de 100  $\mu$ g/mL. Esse resultado pode estar associado à extração de alguns constituintes na condição de menor temperatura (46 °C), o que favoreceu uma inibição próxima ao valor mínimo adotado.

Avaliando a solubilidade experimental, foi possível constatar que a condição de 456 bar e 74 °C, assim como para o rendimento, também foi a que apresentou o maior valor de solubilidade, de 0,01523 g amostra/g CO<sub>2</sub>. Dos comportamentos apresentados, concluiu-se que novamente tanto a pressão quanto a temperatura foram influentes no processo e o estudo estatístico mostrou que todos os fatores do modelo de regressão proposto foram significativos.

Quanto à modelagem, observou-se que o modelo de Sovová (1994) foi o que melhor representou a curva cinética da extração por fluido supercrítico. Já o modelo de Brunner (1984)

não se mostrou adequado para a modelagem da extração supercrítica do óleo de *P. aculeata*, dado que o modelo não foi capaz de levar em consideração os efeitos da resistência à transferência de massa característicos das etapas de extração em queda e baixa. Assim, o modelo só foi capaz de representar a etapa rápida da extração. Já para o estudo de solubilidade foi o modelo de Gordillo *et al.* (1999) que apresentou o melhor ajuste para a descrição da solubilidade, todavia, desvios em condições específicas levaram a um desvio relativo médio superior a 10% para todos os modelos avaliados.

De modo geral, tem-se com o presente trabalho a primeira correlação entre a investigação da atividade anticancerígena para células A549 (pulmão), leucemia (K562) e mama (MCF7). Cabe ainda destacar que, até o momento, também não foram encontrados trabalhos na literatura que abordassem a modelagem matemática da extração supercrítica do óleo de ora-pro-nóbis quanto a seus aspectos cinéticos e de solubilidade.

Diante do exposto e, com a perspectiva de trabalhos futuros, sugere-se:

- Avaliar outras faixas de temperatura e pressão, de modo a otimizar o rendimento da extração;
- Investigar o efeito da adição de cossolvente na extração supercrítica, de modo a aumentar a polaridade do CO<sub>2</sub> e facilitar a extração de compostos polares de interesse, como flavonoides e compostos fenólicos;
- Ampliar a investigação do perfil fitoquímico a fim de aumentar a compreensão dos efeitos da P e T na extração de determinados compostos;
- Estender a investigação de ação antiproliferativa para outras linhagens tumorais e para outros potenciais biológicos dada a constatação da presença de constituintes como fitol (antioxidante), fitosteróis (efeito ansiolítico) e 2,4-ditercbutilfenol (inseticida) e
- Investigar a utilização de outros modelos de solubilidade que sejam capazes de promover melhor ajuste aos resultados experimentais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, Y.; LU, B. C. **Supercritical fluid extraction with carbon dioxide and ethylene.** Fluid Phase Equilibria, v. 14, p. 147–156, 1983.
- ADACHI, Y.; LU, B. C. Y. **Supercritical Fluid Extraction with Carbon Dioxide and Ethylene.** Fluid Phase Equilibria, vol. 14, 147 – 156, 1983.
- AHMAD, T.; MASOODI, F. A.; RATHER, S. A.; WANI, S. M.; GULL, A. **Supercritical Fluid Extraction: A Review.** Journal of Biological and chemical Chronicles, vol. 5, n. 1, p. 114 – 122, 2019.
- AZIZ, A. H. A.; IDRUS, N. F. M.; PUTRA, N. R.; AWANG, M. A.; IDHAM, Z.; MAMAT, H.; YUNUS, M. A. C. **Solubility of Rosmarinic Acid in Supercritical Carbon Dioxide Extraction from *Orthosiphon stamineus* Leaves.** ChemEngineering, vol. 6, n. 4, p. 59, 2022.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S.M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. **Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review.** Journal of Food Engineering, vol. 117, p. 426 – 436, 2013.
- BABU, S.; JAYARAMAN, S. **An update on  $\beta$ -sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management.** Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 131, p. 11072, 2020.
- BALDINO, L.; AND REVERCHON, E. **Challenges in the production of pharmaceutical and food related compounds by SC-CO<sub>2</sub> processing of vegetable matter.** The Journal of Supercritical Fluids, vol. 134, p 269 – 273, 2018.
- BATRA, P.; SHARMA, A. K. **Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives.** Biotech, vol. 3, n. 3, p. 439 - 459, 2013.
- BENITO-ROMÁN, O.; RODRÍGUEZ-PERRINO, M.; SANZ, M. T.; MELGOSA, R.; BELTRÁN, S. **Supercritical carbon dioxide extraction of quinoa oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality.** Journal of Supercritical Fluids, vol. 139, p. 62 – 71, 2018.

BENSEBIA, O.; BENSEBIA, B.; ALLIA, KH.; BARTH, D. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of triterpenes from rosemary leaves: Kinetics and modelling.** Separation Science and Technology, vol. 51, n. 13, p. 2174 – 2182, 2016.

BESSA, M. D.; HIGINO, M. L.; ASSUMPÇÃO, I. C. P.; VIANA, D. C.; CATUNDA JR, F. E. A.; MENDES, M. F. **Evaluation of the solubility and composition of the rubber tree seedoil in Brazil extracted with supercritical CO<sub>2</sub>.** Wulfenia Journal, vol. 27, n. 1, 2020.

BESSA, M. V. **Avaliação da Composição do Óleo da Semente de Seringueira (*Hevea brasiliensis*): Extração com CO<sub>2</sub> Supercrítico e Modelagem Matemática.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 87 p., 2018.

BOTREL, N.; MADEIRA, N. R.; CASTRO E MELO, R. A.; CRUZ, B. F. **Hortaliças não-convencionais - Hortaliças tradicionais: Ora-pro-nóbis.** Embrapa, 2017. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1071168/hortalicas-nao-convencionais-hortalicas-tradicionais-ora-pro-nobis>>. Acesso em 13 out. 2021.

BRASIL. **Manual de Hortaliças Não-Convencionais.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário de Cooperativismo, p. 92, 2010.

BRASIL. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2020. Disponível em <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos>>. Acesso em 20 out. 2021.

BRASIL. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, p. 190, ISBN 978-85-334,2399-2, 2016.

BRAY, F.; PIÑEROS, M. **Cancer patterns, trends and projections in Latin America and the Caribbean: a global context.** Salud Pública de México, vol. 58, n. 2, p. 104-117, 2016.

BRITTON, N. L.; ROSE, J. N. **The Cactaceae: Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family.** Press of Gibson Brothers, vol. 1, n. 248, 1919.

BRUNNER, G. **Mass transfer from solid material in gas extraction.** Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, v. 88, p. 887 – 891, 1984.

BRUSOTTI, G; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G.

**Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 87, p. 218-228, 2014.

CABI. *Pereskia aculeata* (Barbados gooseberry), 2022. Disponível em <<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.41750>>. Acesso em 12 fev. 2023.

CABI. *Pereskia aculeata (Lemon-vine)*. Invasive Species Compendium, 2019. Disponível em <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/41750>>. Acesso em 13 out. 2021.

CAMERON, A.; EWEN, M.; AUTON, M.; ABEGUNDE, D. **The world medicines situation 2011. Medicines prices, availability and affordability.** World Health Organization, vol. 3, 2011.

CARVALHO, E. G.; SOARES, C. P.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; JOAQUIM, W. M. **Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, vol. 24, p. 677 - 682, 2014.

CARVALHO, J. R. G.; BALDIVIA, D. S.; LEITE, D. F.; ARAÚJO, L. C. A.; ESPINDOLA, P. P. T.; ANTUNES, K. A.; ROCHA, P. S.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. D. **Medicinal Plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and Anticancer Potential and Protection Against Chemotherapy Toxicity.** Oxidativa Medicine and Cellular Longevity, 2019.

CHAI, J. W.; KUPPUSAMY, U. R.; KANTHIMATHI, M. S. **Beta-sitosterol induces apoptosis in MCF-7 Cells.** Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 16, n. 2, p. 28 - 30, 2008. Disponível em <<http://eprints.um.edu.my/id/eprint/7173>>. Acesso em 14 out. 2021.

CHAO, P. C.; HSU, C. C.; YIN, M. C. **Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice.** Nutrition & metabolism, vol. 6, n. 33, p. 1-8, 2009.

CHATTERJEE, M.; ROY, K.; JANARTHAN, M.; DAS, S.; CHATTERJEE, M. **Biological Activity of Carotenoids: Its Implications in Cancer Risk and Prevention.** Current Pharmaceutical Biotechnology, vol. 13, n. 1, p. 180 - 190, 2012.

CHRASTIL, J. **Solubility of Solids and Liquids in Supercritical Gases**. The Journal of Physical Chemistry, vol. 86, p. 3016-3021, 1982.

CLIFFORD, A. A.; WILLIAMS, J. R. **Introduction to Supercritical fluids and their applications**. Methods in Biotechnology, vol. 13, p. 1 - 16, 2000.

CRUZ, T. M.; SANTOS, J. S.; CARMO, M. A. V.; HELLSTRÖM, J.; PIHLAVA, J. M.; AZEVEDO, L.; GRANATO, D.; MARQUES, M. B. **Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their in vitro antioxidant and antihemolytic activities**. Food Chemistry, vol. 361, p. 130078, 2021.

DEL VALLE, J. M.; AGUILERA, J. M. **An Improved Equation for Predicting the Solubility of Vegetable Oils in Supercritical CO<sub>2</sub>**. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 27, p. 1551-1553, 1988.

DIAS, M. C.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. **Plants Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity**. Molecules, vol. 26, n. 17, p. 5377, 2021.

DUARTE, M. R.; HAYASHI, S. S. **Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 15, p. 103-109, 2005.

EGEA, M. B; PIERCE, G. **Bioactive Compounds of Barbados Gooseberry (*Pereskia aculeata* Mill.)**. Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes, p. 225 - 237, 2021.

ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-FIL, M. G.; KING, M. B. **Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil**. Journal of Supercritical Fluids, vol. 16, p. 43 – 58, 1999.

ESTRADA-CASTILLO, S.; NEGRITTO, M. A.; FERNÁNDEZ-ALONSO, J. L.; CARBONÓ-DELAHOZ. **The species of *Pereskia* (Pereskioideae, Cactaceae) from Colombia**. Caldasia, vol. 41, n. 2, p. 289 – 300, 2019.

FERREIRA, R. G. R.; FRANCO, L. F. R. **Efeitos Colaterais Decorrentes do Tratamento Quimioterápico no Câncer de Mama: Revisão Bibliográfica**. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, vol. 15, n. 02, p. 633-638, 2017.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. **Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil.** Journal of Food Engineering, vol. 54, p. 263 – 269, 2002.

GARCIA, J. A. A.; CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; PEREIRA, C.; ABREU, R. M. V.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R. **Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest.** Food Chemistry, vol. 294, p. 302-308, 2019.

GHOSH, T.; MAITY, T. K.; SINGH, J. **Evaluation of antitumor activity of stigmasterol, a constituent isolated from *Bacopa monnieri* Linn aerial parts against Ehrlich Ascites Carcinome in mice.** Oriental Pharmacology & Experimental Medicine, vol. 11, 41 – 49, 2011.

GHOSH, T.; MAITY, T. K.; SINGH, J. **Evaluation of antitumor activity of stigmasterol, a constituent isolated from *Bacopa monnieri* Linn aerial parts against Ehrlich Ascites Carcinoma in mice.** Oriental Pharmacy & Experimental Medicine, vol. 11, p. 41 - 49, 2011.

GIACOMETTI, J.; KOVAČEVIĆ, D. B.; PUTNIK, P.; GABRIĆ, D.; BILUŠIĆ, T.; KREŠIĆ, G.; STULIĆ, V.; BARBA, F. J.; CHEMAT, F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; JAMBRAK, A. R. **Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review.** Food Research International, vol. 113, p. 245 - 262, 2018.

GORDILLO, M. D.; BLANCO, M. A.; MOLERO, A.; MARTINEZ DE LA OSSA, E. **Solubility of the antibiotic penicillin G in supercritical carbon dioxide.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 15, n. 3, p. 183–189, 1999.

GÜCLÜ Ü.; TEMELLI, F. **Correlating the solubility behavior of fatty acids, mono-, di-, and triglycerides, and fatty acid esters in supercritical carbon dioxide.** Industrial & Engineering Chemistry Research, vol. 39, no. 12, p. 4756 – 4766, 2000.

HALOUI, I.; MENIAI, A. H. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil from Algerian Argan (*Argania spinosa* L.) seeds and yield optimization.** International Journal of Hydrogen Energy, vol. 42, p. 12912 - 12919, 2017.

HANDA, S. S. **An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants**. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, vol. 1, p. 21-40, 2008.

HEDRICK, J. L; MULCAHEY, L. J.; TAYLOR, L. T. **Supercritical Fluid Extraction**. Mikrochimica Acta, vol. 108, p. 115 - 132, 1992.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. **Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications**. Journal of Chromatography A, vol. 1217, n. 16, p. 2496 - 2511, 2010.

IJAZ, S.; AKHTAR, N.; KHAN, M. S.; HAMEED, A.; IRFAN, M.; ARSHAD, M. A.; ALI, S.; ASRAR, M. **Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers**. Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 103, p. 1643 - 1651, 2018.

INCA. **Como surge o câncer?**. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer, 2021. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>>. Acesso em 23 out. 2021.

INCA. **O que é câncer?**. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer, 2020. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em 23 out 2021.

ISLAM, M. T.; ALI, E. S.; UDDIN, S. J.; SHAW, S.; ISLAM, M. A.; AHMED, M. I.; SHILL, M. C.; KARMAKAR, U. K.; YARLA, N. S.; KHAN, I. N.; BILLAH, M. M.; PIECZYNsKA, M. D.; ZENGİN, G.; MALAINER, C.; NICOLETTI, F.; GULEI, D.; BERINDAN-NEAGOE, I.; APOSTOLOV, A.; BANACH, M.; YEUNG, A. W. K.; EL-DEMERSH, AM.; XIAO, J.; DEY, P.; YELE, S.; JÓZWIK, A.; STRZAŁKOWSKA, N.; MARCHEWKA, J.; RENGASAMY, K. R. R.; HORBAŃCZUK, J.; KAMAL, M. A.; MUBARAK, M. S.; MISHRA, S.; SHILPI, J. A.; ATANASOV, A. G. **Phytol: A review of biomedical activities**. Food and Chemistry Toxicology, vol. 121, p. 82 - 94, 2018.

JANICK, J.; PAULL, R. E. **The encyclopedia of fruit & nuts**. CABI Wallingford UK, p. 954, 2008.

JOHARI, M. A.; KHONG, H. Y. **Total Phenolic Content and Antioxidant and Antibacterial Activities of *Pereskia bleo***. Advances in Pharmacological Sciences, vol. 2019, 2019.

KAUR, N.; CHAUDHARY, J.; JAIN, A.; KISHORE, L. **Stigmasterol: A Comprehensive Review**. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, vol. 2, n. 9, p. 2259 - 2265, 2011.

KUMAR, A.; JAITAK, V. **Natural products as multidrug resistance modulators in cancer.** European Journal of Medicinal Chemistry, vol. 176, p. 268 - 291, 2019.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. **Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview.** The Scientific World Journal, 2013.

LABNUTRIR. **Coleção de Plantas Alimentícias Não Convencionais da Horta Comunitária Nutrir - *Pereskia aculeata* Mill.** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017. Disponível em <[http://nutrir.com.br/horta/Ficha\\_Pereskia.pdf](http://nutrir.com.br/horta/Ficha_Pereskia.pdf)>. Acesso em 13 out. 2021.

LANG, Q.; WAI, CHIEN, M. **Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review.** Talanta, vol. 53, p. 771 - 782, 2001.

LEE, W. J.; TAN, C. P.; SULAIMAN, R.; CHONG, G. H. **Solubility of red palm oil in supercritical carbon dioxide: Measurement and modelling.** Chinese Journal of Chemical Engineering, v.26, n. 5, p. 964 – 969, 2018.

MAILAFIYA, M. M.; YUSUF, A. J.; ABDULLAHI, M. I.; ALEKU, G. A.; IBRAHIM, I. A. A.; YAHAYA, M.; ABUBAKAR, H.; SANUSI, A.; ADAMU, H. W.; ALEBIOSU, C. **Antimicrobial activity of stigmasterol from the stem bark of *Neocarya macrophylla*.** Journal of Medicinal Plants for Economic Development, vol. 2, no. 1, 2018.

MAJOLO, F; DELWING, L. K. O. B.; MARMITT, D. J.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; GOETTERT, M. I. **Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery.** Phytochemistry Letters, vol. 31, p. 196 - 207, 2019.

MALEK, S. N. A.; SHIN, S. K.; WAHAB, N. A.; YAACOB, H. **Cytotoxic Components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) Leaves.** Molecules, vol. 14, p. 1713 – 1724, 2009.

MALEK, S. N. A.; WAHAB, N. A.; YAACOB, H.; SIM, K. S.; LAI, H. S.; LEE, G. S.; SYED, A.; SYARIFAH, N. **Cytotoxic Activity of *Pereskia bleo* (Cactaceae) Against Selected Human Cell Lines.** International Journal of Cancer Research, vol. 4, n. 1, p. 20-27, 2008.

MARKOM, M.; HASSIM, N.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W. **Modeling of supercritical fluid extraction by enhancement factor of solvent mixtures.** Separation Science and Technology, vol. 56, n. 7, p. 1290 – 1302, 2021.

MARTIN, A. A.; FREITAS, R. A.; SASSAKI, G. L.; EVANGELISTA, P. H. L.; SIERAKOWSKI, M. R. **Chemical structure and physical-chemical properties of**

**mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*.** Food Hydrocolloids, vol. 70, p. 20 - 28, 2017.

MASSOCATTO, A. M.; SILVA, N. F. S.; KAZAMA, C. C.; PIRES, M. D. B.; TAKEMURA, O. S.; JACOMASSI, E., RUIZ, A. L. T. G.; LAVERDE JUNIOR, A. **Biological activity survey of *Pereskia aculeata* Mill. and *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae).** Pharmaceutical Sciences, 2021.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. **Viabilidade de uso do delineamento composto central.** Acta Scientiarum, v. 23, n. 06, p. 1537 - 1546, 2001.

MAUL, A. A. **Fluidos Supercríticos - Situação Atual e Futuro da Extração Supercrítica.** Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, vol. 11, p. 42- 46, 1999.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização Química de Extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo Comparativo e Métodos de Extração.** Tese (Tese em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 218 p., 2005.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, S. C.; ALBUQUERQUE, U. P. **Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011.

MENEZES, M. O. T. D.; TAYLOR, N. P.; LOIOLA, M. I. B. **Flora do Ceará, Brasil: Cactaceae.** Rodriguésia, 4<sup>a</sup> edição, vol. 64, p. 757 - 774, 2013.

METHIEV, A. R.; MISHARIN, A. Y. **Biological Activity of Phytosterols and Their Derivatives.** Supplement Series B: Biomedical Chemistry, vol. 2, n. 1, p. 1 - 17, 2008.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. **Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up.** The Journal of Supercritical Fluids, p. 10 – 16, 2009.

MOHD-SALLEH, S. F.; ISMAIL, N.; WAN-IBRAHIM, W. S.; ISMAIL, T. N. N. T. **Phytochemical Screening and Cytotoxic Effects of Crude Extracts of *Pereskia bleo* Leaves.** Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, vol. 26, n. 3, p. 291 - 302, 2020.

MORAIS, L. A. S. **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais.** In: Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE). Horticultura Brasileira, Brasília, DF, vol. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009. CD-ROM.

Suplemento. Trabalho apresentado no 49. Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP., 2009.

NAGY, B.; SIMÁNDI, B. **Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika.** The Journal of Supercritical Fluids, vol. 46, p. 293 – 298, 2008.

NAGY, B.; SIMÁNDI, B. **Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika.** The Journal of Supercritical Fluids, vol. 46, n. 3, p. 293-298, 2008.

NAIR, R. V. R.; JAYASREE, D. V.; BIJU, P. G.; BABY, S. **Anti-inflammatory and anticancer activities of erythrodol-3-acetate and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Humboldtia unijuga*.** Natural Product Research, vol. 34, n. 16, p. 2319 – 2322, 2020.

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

NISHINO, H.; MURAKOSHI, M.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y. **Cancer prevention by carotenoids.** Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 483, n. 2, p. 165 - 168, 2009.

OJHA, K.; AZNAR, R.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. **Ultrasound technology for extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources.** Trends in Analytical Chemistry, vol. 122, n. 115663, 2020.

OU, S.; KWOK, K. C. **Ferulic acid: Pharmaceutical Functions, preparation and applications in foods.** Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 84, n. 11, 1261 – 1269, 2004.

PANAYOTIS, N.; FREUND, P. A.; MARVALDI, L.; SHALIT, T.; BRANDIS, A.; MEHLMAN, T.; TSOORY, M. M.; FAINZILBER, M.  **$\beta$ -sitosterol reduces anxiety and synergize with established anxiolytic drugs in mice.** Cell Reports Medicine, vol. 2, p. 100281, 2021.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. **Flavonoids: an overview.** Journal of Nutritional Science, vol. 5, e47, 2016.

PAPAMICHAIL, I.; LOULI, V.; MAGOULAS, K. **Supercritical fluid extraction of celery seed oil.** The Journal of Supercritical Fluids, vol. 18, n. 3, p. 213-226, 2000.

PASCHOAL, R. G. **Extração do Óleo de *Bidens Pilosa* L. Usando Fluido Supercrítico: Atividade Biológica e Modelagem Matemática.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 112 p., 2018.

PATRA, J. K.; DAS, G.; LEE, S.; KANG, S. S.; SHIN, H. S.; **Selected commercial plants: A review of extraction and isolation of bioactive compounds and their pharmacological market value.** Trends in Food Science & Technology, vol. 82, p. 89 - 109, 2018.

PEJIN, B.; KOJIC, V.; BOGDANOVIC, G. **An insight into the cytotoxic activity of phytol at *in vitro* conditions.** Natural Product Research, vol. 28, n. 22, p. 2053 - 2056, 2014.

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

PINTO, N. C. C. P.; MACHADO, D. C.; DA SILVA, J. M.; CONEGUNDES, J. L. M.; GUALBERTO, A. C. M.; GAMEIRO, J.; CHEDIER, L. M.; CASTAÑON, M. C. M. N.; SCIO, E. ***Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis.** Journal of Ethnopharmacology, vol. 173, p. 330-337, 2015.

PINTO, N. C. C.; CASSINI-VIEIRA, P.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; BARCELOS, L. S.; CASTAÑON, M. C. M. N.; SCIO, E. ***Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice.** Journal of Ethnopharmacology, vol. 194, p. 131 - 136, 2016.

PINTO, N. C. C.; SCIO, E. **The Biological Activities and Chemical Composition of *Pereskia* Species (Cactaceae)—A Review.** Plant Foods for Human Nutrition, vol. 69, n. 3, p. 189 - 195, 2014.

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

RAFFA, D.; MAGGIO, B.; RAIMONDI, M. V.; PLESCIA, F.; DAIDONE, G. **Recent discoveries of anticancer flavonoids.** European Journal of Medicinal Chemistry, vol. 142, p. 213 - 228, 2017.

RAO, A. V.; RAO, L. G. **Carotenoids and human health.** Pharmacological Research, vol. 55, n. 3, p. 207 - 216, 2007.

REVERCHON, E.; OSSEO, L. S. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of basil oil: characterization of products and process modeling.** The Journal of Supercritical Fluids, vol. 7, p. 185 – 190, 1994.

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. O. **Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil.** Journal of Ethnopharmacology, vol. 205, p. 69 – 102, 2017.

SAEIDNIA, S.; MANAYI, A.; GOHARI, A. R.; ABDOLLAHI, M. **The Story of Beta-sitosterol - A Review.** European Journal of Medicinal Plants, vol. 4, n. 5, p. 590- 609, 2014.

SANTOS, C. C. M. P.; SALVADORI, M. S.; MOTA, V. G.; COSTA, L. M.; ALMEIDA, A. A. C.; OLIVEIRA, G. A. L.; COSTA, J. P.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; ALMEIDA, R. N. **Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol *in vivo* and *in vitro* Models.** Neuroscience Journal, 2013.

SAPKALE, G. N.; PATIL, S. M.; SURWASE, U. S.; BHATBHAGE, P. K. **Supercritical Fluid Extraction.** International Journal of Chemical Sciences, vol. 8, n. 2, p. 729 - 743, 2010.

SARIAN, M. N.; AHMED, Q. U.; SO'AD, S. Z. M.; ALHASSAN, A. M.; MURUGESU, S.; PERUMAL, V.; MOHAMAD, S. N. A. S.; KHATIB, A.; LATIP, J. **Antioxidant and Antidiabetic Effects of Flavonoids: A Structure-Activity Relationship Based Study.** BioMed Research International, 2017.

SARTORI, R. B. **Extração de agrotóxicos presentes na banana vitória (*Musa spp*) usando CO<sub>2</sub> supercrítico: Experimental e modelagem.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 83 p., 2017.

SHARIF, K. M.; RAHMAN, M. M.; AZMIR, J. A.; SHAMSUDIN, S. H.; UDDIN, M. S.; FAHIM, T. K.; ZAIDUL, I. S. M. **Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant rich extract from *Pereskia bleo*.** Journal of Industrial and Engineering Chemistry, vol. 21, p. 1314 - 1322, 2015.

SiBBr. *Pereskia aculeata* in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em <[https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/pereskia\\_aculeata](https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/pereskia_aculeata)>. Acesso em 13 out. 2021.

**SILVA, B. M. Avaliação da Composição e do Rendimento Global dos Extratos Vegetais do Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) Oriundos de Diferentes Métodos de Extração.** Dissertação (Dissertação em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina, 127 p., 2022.

SILVA, T. B. C.; COSTA, C. O. S.; GALVÃO, A. F. C.; BOMFIM, L. M.; RODRIGUES, A. C. B.; MOTA, M. C. S.; DANTAS, A. A.; SANTOS, T. R.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P. **Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil.** BMC Complementary and Alternativa Medicine, p. 1 – 9, 2016.

SMITH, J. N. VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química.** LTC Editora, 7<sup>a</sup> Ed., 638 p., 2007.

SOUZA, L. F. **Aspectos fitotécnicos, bromatológicos e componentes bioativos de *Pereskia aculeata*, *Pereskia grandifolia* e *Anredera cordifolia*.** Tese (Tese em Fitotecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 125 p., 2014.

SOUZA, L. F.; CAPUTO; L., BARROS I. B. I.; FRATIANNI, F.; NAZZARO, F.; DE FEO, V. ***Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: chemical composition and biological activities.** International Journal of Molecular Sciences, vol. 17, n. 9, p. 1478, 2016.

SOUZA, M. T. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAUJO, A. A. S.; DUARTE, M. C.; GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C. F.; SANTOS, M. R. V. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. **Structure–Activity Relationship of Terpenes with Anti-Inflammatory Profile – A Systematic Review.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, vol. 115, p. 244 - 256, 2014.

SOUZA, M. V. N. D.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. D. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. D. **Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento Contra o Câncer.** Revista Fitos, vol. 3, n. 02, p. 25-42, 2013.

SOVOVÁ, H. **Rate of the Vegetable Oil Extraction with Supercritical CO<sub>2</sub> – I. Modelling of Extraction Curves.** Chemical Engineering Science, vol. 49, n. 3, p.409 – 414, 1994.

SZWAJGIER, D. **Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives**. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, vol. 68c, p. 125-132, 2013.

SZWAJGIER, D. **Anticholinesterase Activity of Phenolic Acids and their Derivatives**. Zeitschrift für Naturforschung C, vol. 68c, p. 125 – 132, 2013.

TATKE, P.; RAJAN, M. **Comparison of Conventional and Novel Extraction Techniques for the Extraction of Scopoletin from *Convolvulus Pluricaulis***. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, vol. 48, n. 1, p. 27 - 31, 2014.

TERRON, L. R. **Termodinâmica Química Aplicada**. Editora Manole, 2009.

TORRES, T. M. S.; ÁLVAREZ-RIVERA, G.; MAZZUTTI, S.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. D.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; FERREIRA, S. R. S. **Neuroprotective potencial of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids**. The Journal of Supercritical Fluids, vol. 179, p. 105390, 2022a.

TORRES, T. M. S.; MENDIOLA, J. A.; ÁLVAREZ-RIVERA, G.; MAZZUTTI, S.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; FERREIRA, S. R. S. **Protein valorization from ora-pro-nobis leaves by compressed fluids biorefinery extractions**. Innovative Food Science and Emerging Technologies, vol. 76, p. 102926, 2022c.

TORRES, T. M.; GUEDES, J. A. C.; BRITO, E. D.; MAZZUTTI, S.; FERREIRA, S. R. S. **High-pressure biorefining of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*)**. The Journal of Supercritical Fluids, vol. 181, p. 105514, 2022b.

TRIPOLI, E.; GIAMMANCO, M.; TABACCHI, G.; DI MAJO, D.; GIAMMANCO, S.; LA GUARDIA, M. **The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health**. Nutrition Research Reviews, vol. 18, n. 1, p. 98-112, 2005.

VALENTE, L. M.; SCHEINVAR, L. A.; SILVA, G. C.; ANTUNES, A. P.; SANTOS, F. A. L.; OLIVEIRA, T. F.; TAPPIN, M. R. R.; NETO, F. R. A.; PEREIRA, A. S.; CARVALHAES, S. F.; SIANI, A. C.; SANTOS, R. R.; SOARES, R. O. A.; FERREIRA, E. F.; BOZZA, M.; STUTZ, C.; GIBALDI, D. **Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae**. Pharmacognosy Magazine, vol. 3, p. 167, 2007.

VAN DER PLAS, W. Y.; BENJAMENS, S.; KRUIJFF, S. **The increased need for palliative cancer care in Sub-Saharan Africa.** European Journal of Surgical Oncology, vol. 46, n. 7, p. 1373-1376, 2020.

VERNÈS, L.; VIAN, M.; CHEMAT, F. **Ultrasound and Microwave as Green Tools for Solid-Liquid Extraction.** In: Handbooks in Separation Science Liquid-Phase Extraction. Amsterdam. Elsevier, p. 355 – 374, 2020.

WAHAB, S. I. A.; ABDUL, A. B.; MOHAN, S. M.; AL-ZUBAIRI, A. S.; ELHASSAN, M. M.; IBRAHIM, M. Y. **Biological Activities of *Pereskia bleo* Extracts.** International Journal of Pharmacology, vol. 5, n. 1, p. 71 -75, 2009.

WANG, G. F.; SHI, L. P.; REN, Y. D.; LIU, Q. F.; LIU, H. F.; ZHANG, R. J.; ZHANG, L.; ZHU, F. H.; HE, P. L.; TANG, W.; TAO, P. Z.; LI, C.; ZHAO, W. M.; ZUO, J. P. **Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*.** Antiviral Research, vol. 83, n. 2, p. 186-190, 2009.

WANG, J.; HUANG, M.; YANG, J.; MA, X.; ZHENG, S.; DENG, S.; HUANG, Y.; YANG, X.; ZHAO, P. **Anti-diabetic activity of stigmasterol from soybean oil by targeting the GLUT4 glucose transporter.** Food & Nutrition Research, vol. 61, 2017.

WANG, J.; HUANG, M.; YANG, J.; MA, X.; ZHENG, S.; DENG, S.; HUANG, Y.; YANG, X.; ZHAO, P. **Anti-diabetic activity of stigmasterol from soybean oil by targeting the GLUT4 glucose transporter.** Food & Nutrition Research, vol. 61, n. 1, p. 1364117, 2017.

WEINHOLD, T. S.; BRESCIANI, L. F. V.; TRIDAPALLI, C. W.; YUNES, R. A.; HENSE, H.; FERREIRA, S. R. S. **Polygala cyparissias oleoresin: comparing CO<sub>2</sub> and classical organic solvent extractions.** Chemical Engineering and Processing, vol. 47, p. 109 – 117, 2008.

WHO. **WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all.** World Health Organization, Geneva, 2020.

WITT, A.; LUKE, Q. **Guide to the naturalized and invasive plants of Eastern Africa.** CABI Wallingford UK, p. 601, 2017.

WRONA, O.; Rafińska, K.; Możeński, C.; Buszewski, B. **Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plant materials.** Journal of AOAC International, vol. 100, n. 6, p. 1624-1635, 2017.

WU, H. B.; XIAO, Y. G.; CHEN, J. S.; QIU, Z. K. **The potential mechanism of Bupleurum against anxiety was predicted by network pharmacology study and molecular docking.** Metabolic Brain Disease, vol. 37, p. 1609 – 1639, 2022.

YAMADA, J.; TOMITA, Y. **Antimutagenic Activity of Caffeic Acid and Related Compounds.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, vol. 60, n. 2, p. 328-329, 1996.

YUSUF, A. J.; ABDULLAHI, M. I.; ALEKU, G. A.; IBRAHIM, I. A. A.; ALEBIOSU, C. O.; YAHAYA, M.; ADAMU, H. W.; SANUSI, A.; MAILAFIYA, M. M.; ABUBAKAR, H. **Antimicrobial activity of stigmasterol from the stem bark of *Neocarya macrophylla*.** Journal of Medicinal Plants for Economic Development, vol. 2, n. 1, p. 1 - 5, 2018. Disponível em <<https://hdl.handle.net/10520/EJC-df2f206df>>. Acesso em 14 out. 2021.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.P. **Cactaceae in Flora do Brasil 2020.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB1633>>. Acesso em 13 out. 2021.

ZEKOVIĆ, Z. P.; LEPOJEVIĆ, Ž. D.; MILOŠEVIĆ, S. G.; TOLIĆ, A. Š. **Modeling of the Thyme – Liquid Carbon Dioxide Extraction System.** Acta Periodica Technologica, vol. 34, p. 125 – 133, 2003.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G; YE, W. C. **Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review.** Chinese Medicine, vol. 13, p. 1 - 26, 2018.

ZHAO, F.; WANG, P.; LUCARDI, R.; SU, Z.; LI, S. **Natural Sources and Bioactives of 2,4-Di-Tert-Butylphenol and Its Analogs.** Toxins, vol. 12, n. 1, p. 35, 2020.

ŽITEK, T.; DARIŠ, B.; FINŠGAR, M.; KNEZ, Ž.; BJELIĆ, D.; KNEZ HRNČIĆ, M. **The Effect of Polyphenolics in Extracts from Natural Materials on Metabolic Activity of Metastatic Melanoma WM-266-4 Cells.** Applied Sciences, vol. 10, n. 10, p. 3499, 2020.

## ANEXO I

**Tabela 24** – Tentativa de identificação dos componentes presentes em diferentes extratos de ora-pro-nóbis com seus respectivos tempos de retenção (tr) e quantificação (área %).

Componentes	t <sub>r</sub> (min)	Fluido Supercrítico					Técnicas Convencionais		
		P244 T74	P350 T60	P350 T60	P350 T80	P500 T60	OPN- SO	OPN- US	OPN- MD
Decane	5,420	-	-	-	-	-	3,9%	2,6%	1,6%
Benzene, 1,2,4-trimethyl-	5,464	-	-	-	-	-	5,9%	-	-
Decane, 4-methyl-	5,714	-	-	-	-	-	1,7%	1,1%	0,7%
Benzene, 1,2,3-trimethyl-	5,856	-	-	-	-	-	-	1,9%	-
Benzene, 1,2-diethyl-	6,298	-	-	-	-	-	-	-	0,8%
Undecane	6,802	-	0,7%	-	-	-	1,8%	1,2%	-
Dodecane	8,222	-	0,8%	-	-	-	-	-	-
2,4-Di-tert-butylphenol	12,380	-	7,2%	-	0,8%	-	-	-	-
9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	15,596	-	0,7%	-	-	-	-	-	-
7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	16,864	-	0,9%	-	-	-	-	-	-
n-Hexadecanoic acid	17,289	-	1,4%	2,8%	2,0%	-	-	-	-
Hexadecanoic acid, ethyl ester	17,565	-	-	0,7%	1,5%	-	-	-	-
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	18,543	-	0,9%	-	-	-	-	-	-
Phytol	18,705	3,8%	2,3%	3,3%	2,3%	7,3%	3,3%	1,8%	3,8%
9,17-Octadecadienal, (Z)-	18,992	-	-	11,2%	6,2%	-	-	-	-

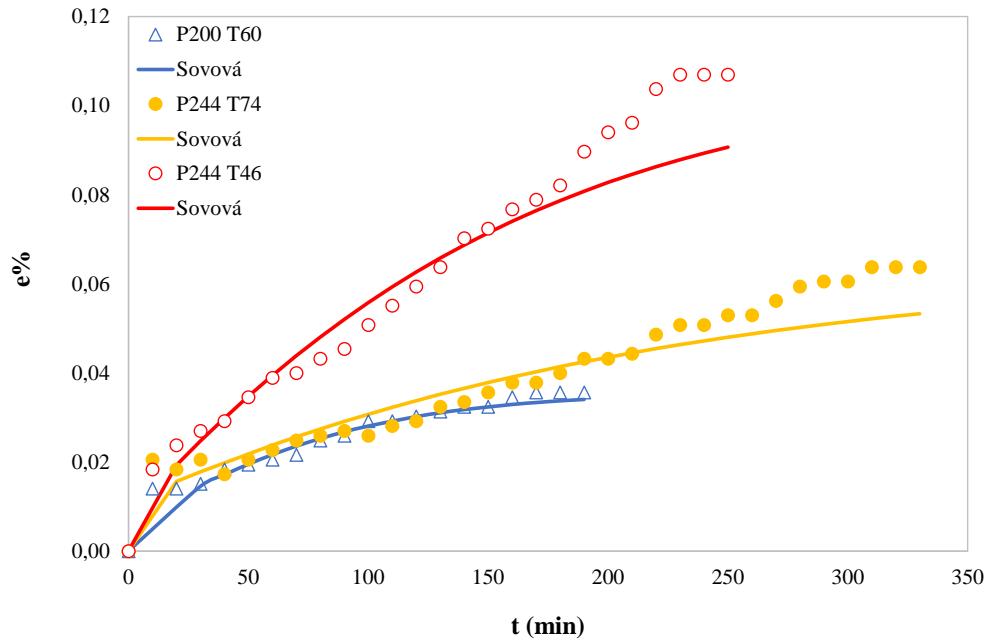
**Tabela 24 (Continuação)** – Tentativa de identificação dos componentes presentes em diferentes extratos de ora-pro-nóbis com seus respectivos tempos de retenção ( $t_r$ ) e quantificação (área %).

Componentes	$t_r$ (min)	Fluido Supercrítico					Técnicas Convencionais		
		P244 T74	P350 T60	P350 T60	P350 T80	P500 T60	OPN- SO	OPN- US	OPN- MD
Linoleic acid ethyl ester	19,139	-	-	-	4,2%	-	-	-	-
9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	19,140	-	-	2,7%	-	-	-	-	-
Ethyl Oleate	19,189	-	-	-	11,2%	-	-	-	-
(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester	19,195	-	-	4,4%	-	-	-	-	-
Octadecanoic acid, ethyl ester	19,404	-	-	1,1%	1,2%	-	-	-	-
3-Methylhexacosane	20,357	-	-	-	-	11,0%	-	-	-
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	20,825	-	-	0,5%	-	-	-	-	-
$\gamma$ -Sitosterol	21,791	8,4%	6,8%	-	-	3,2%	-	8,0%	4,5%
Stigmasterol	21,833	-	-	-	1,7%	-	-	-	-
Pentacosane	21,923	-	-	0,7%	-	-	-	-	0,8%
Heneicosane, 11-decyl-	22,075	-	-	-	8,1%	-	-	13,4%	8,4%
Octacosane, 2-methyl-	22,079	9,5%	-	-	-	-	-	-	-
3-Methylheptacosane	22,079	-	12,0%	-	-	-	-	-	-
6,6'-Methylenebis(2,4-di-tert-butylphenol)	22,495	-	0,8%	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Sitosterol	23,255	-	-	2,5%	7,2%	-	-	-	-
Heptacosane	23,413	2,0%	-	2,1%	1,0%	1,3%	-	1,1%	1,5%

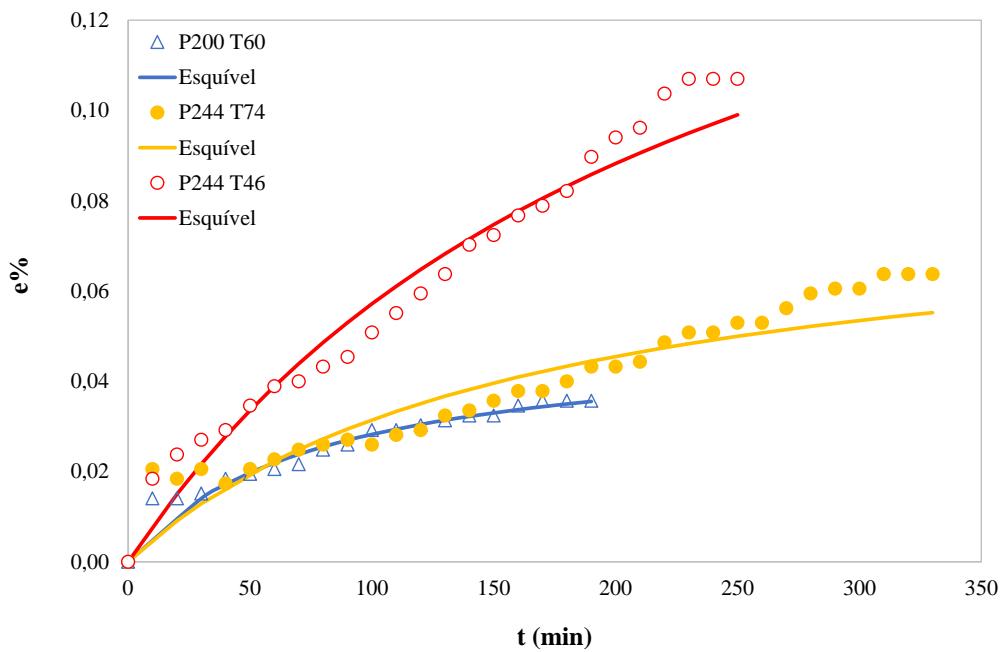
**Tabela 24 (Continuação)** – Tentativa de identificação dos componentes presentes em diferentes extratos de ora-pro-nóbis com seus respectivos tempos de retenção ( $t_r$ ) e quantificação (área %).

Componentes	$t_r$ (min)	Fluido Supercrítico					Técnicas Convencionais		
		P244 T74	P350 T60	P350 T60	P350 T80	P500 T60	OPN- SO	OPN- US	OPN- MD
D-Friedoolean-14-en-3-ol	23,818	3,3%	1,5%	0,7%	1,7%	-	-	3,1%	-
Lupeol	23,998	10,5%	6,7%	2,6%	5,8%	4,7%	-	5,6%	1,5%
Eicosane	24,116	-	-	1,2%	-	2,2%			1,0%
Squalene	24,272	1,4%	-	2,2%	1,7%	3,3%	3,1%	1,8%	3,3%
Lup-20(29)-en-3-one	24,337	3,4%	3,0%	0,9%	-	-	-	1,4%	-
Nonacosane	24,803	13,7%	6,4%	11,4%	6,6%	15,5%	11,4%	7,6%	11,3%
Heptadecane, 9-octyl-	25,456	-	-	-	-	2,4%	-	-	-
Triacontane	25,457	2,6%	1,9%	-	-	-	2,6%	2,1%	-
Eicosane, 9-octyl-	25,457	-	-	2,2%	-	-	-	-	-
Eicosane, 9-octyl-	25,458	-	-	-	-	-	-	-	2,8%
Octacosane, 2-methyl-	26,101	-	-	-	31,5%	-	-	-	-
Hentriacontane	26,111	38,4%	36,2%	35,9%	-	-	59,7%	40,8%	-
Octacosane	26,112	-	-	-	-	45,5%	-	-	-
Docosane, 2,21-dimethyl-	26,137	-	-	-	-	-	-	-	52,1%
1-Hexacosene	26,197	-	-	-	-	-	-	-	1,6%

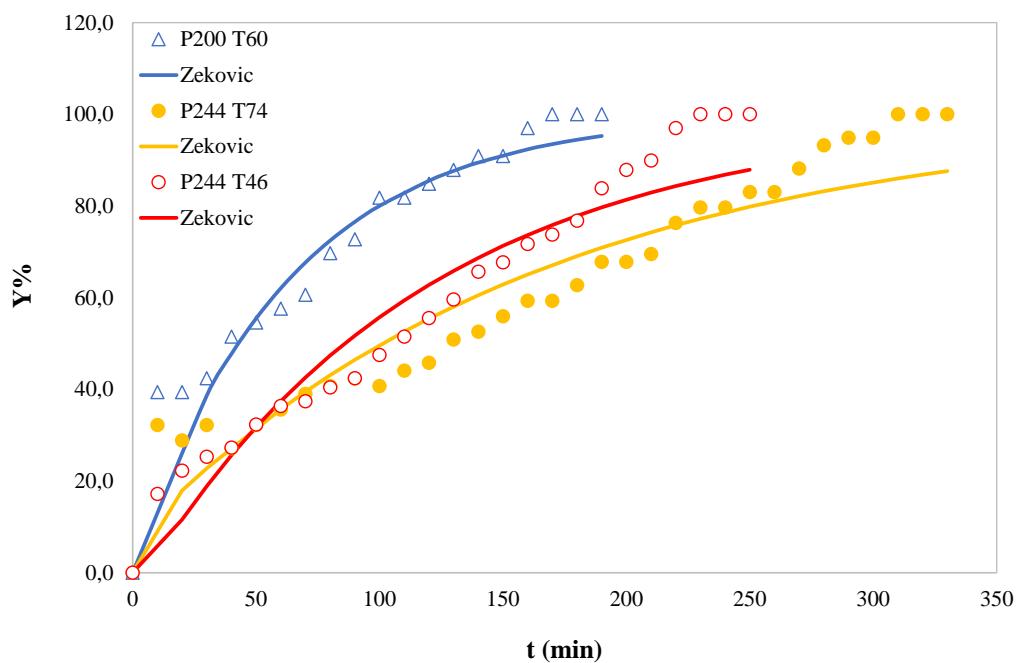
## ANEXO II



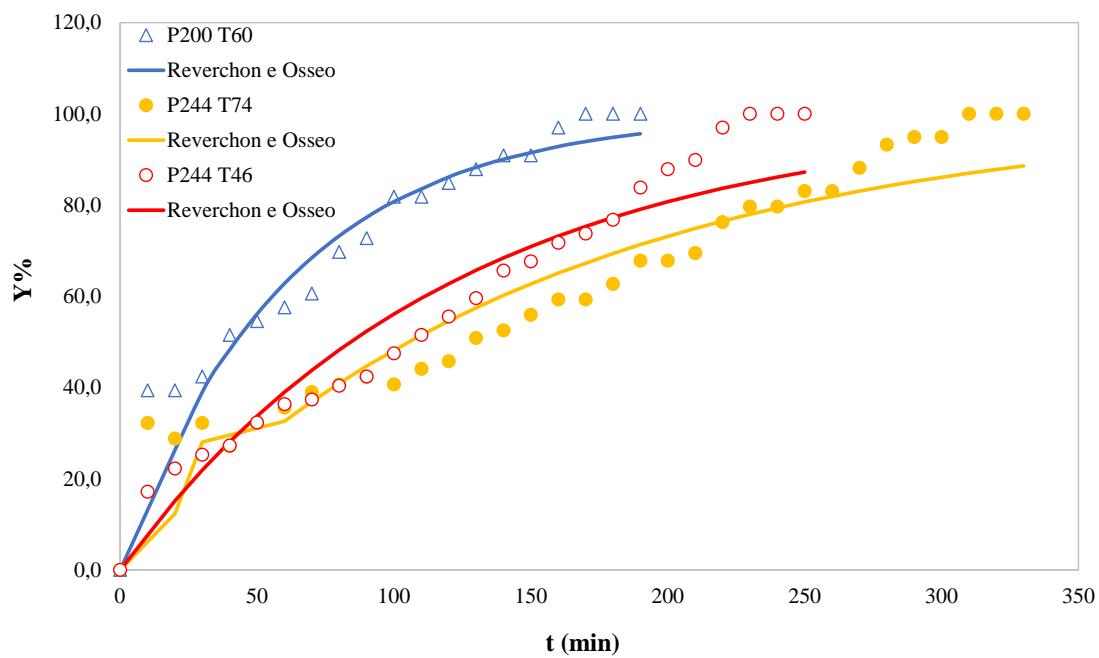
**Figura 32** – Ajuste do Modelo de Sovová (1994) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.



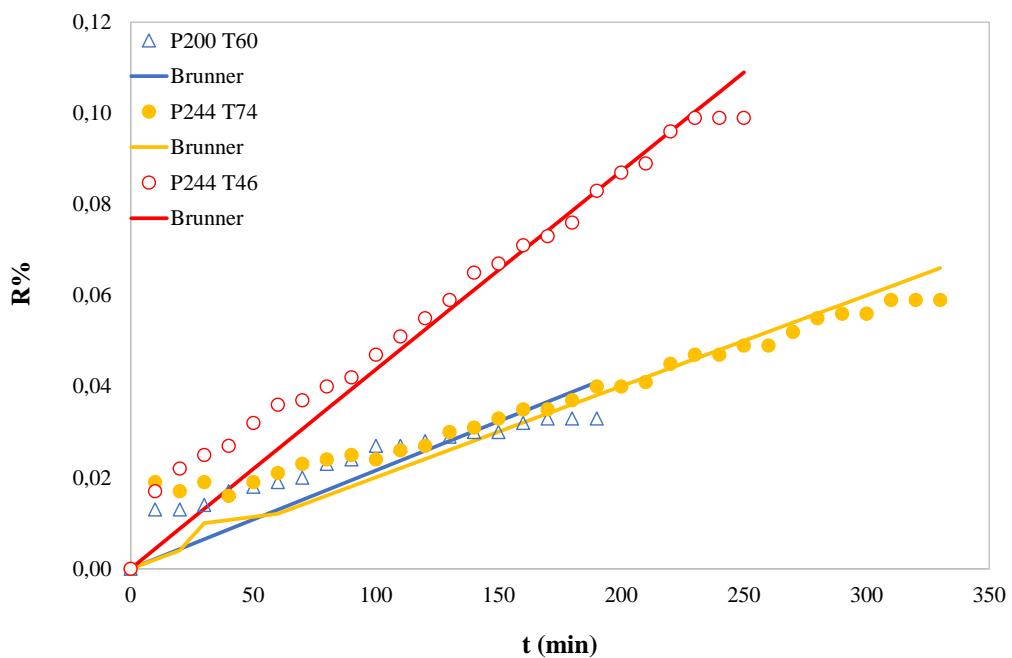
**Figura 33** – Ajuste do Modelo de Esquível *et al.* (1999) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.



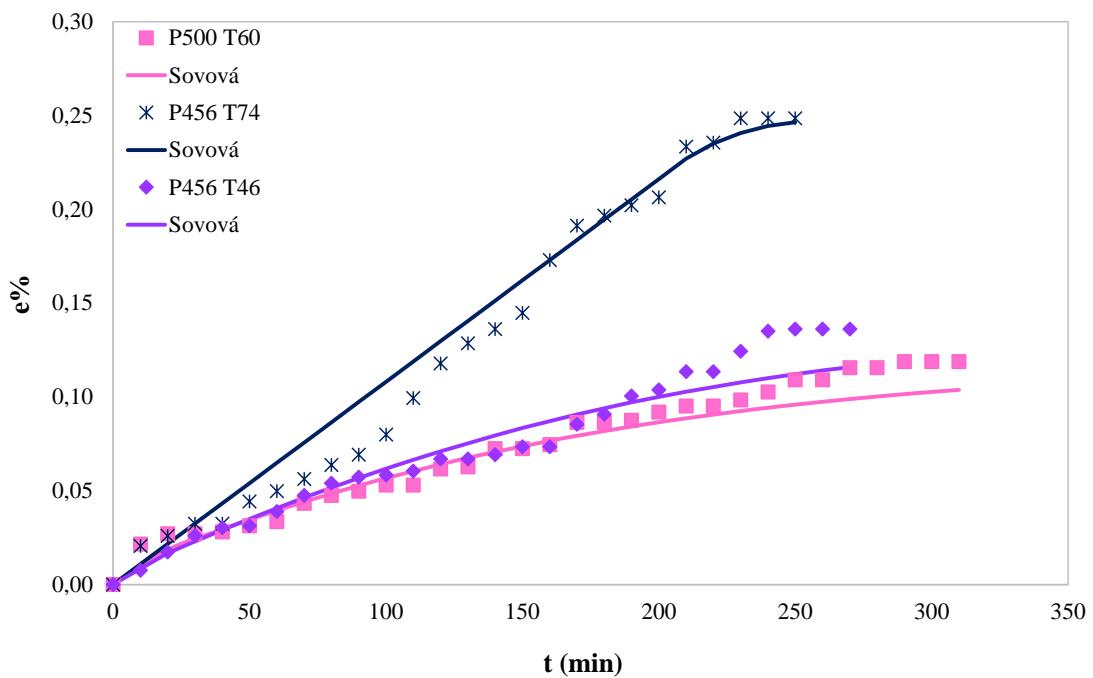
**Figura 34** – Ajuste do Modelo de Zeković *et al.* (2003) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.



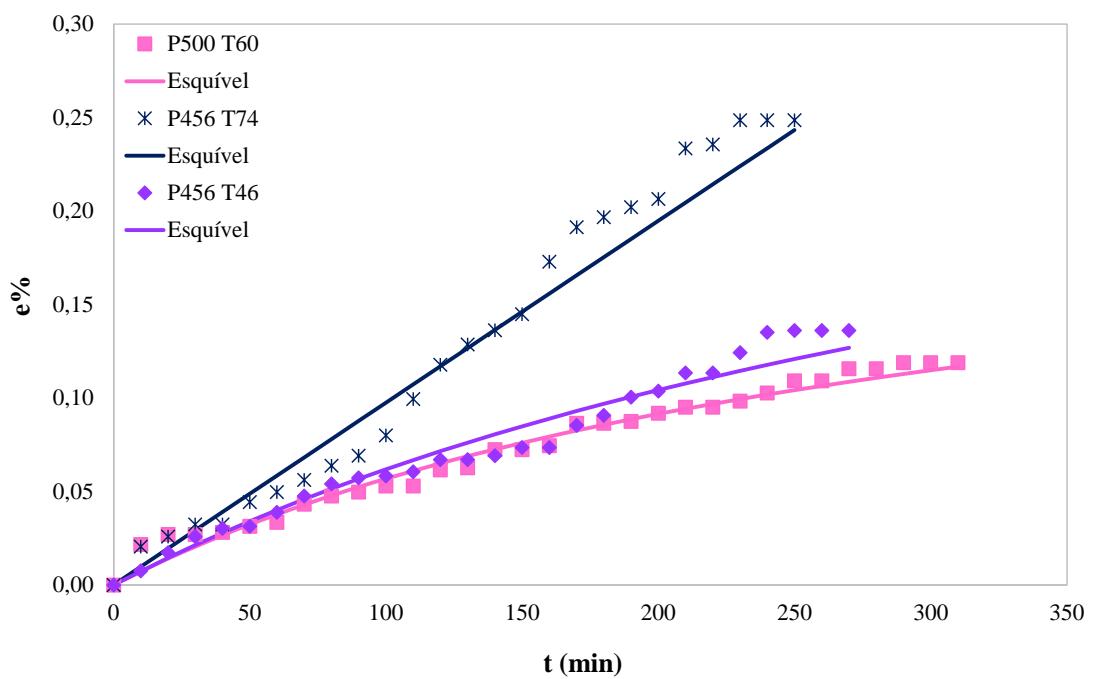
**Figura 35** – Ajuste do Modelo de Reverchon e Osseo (1994) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.



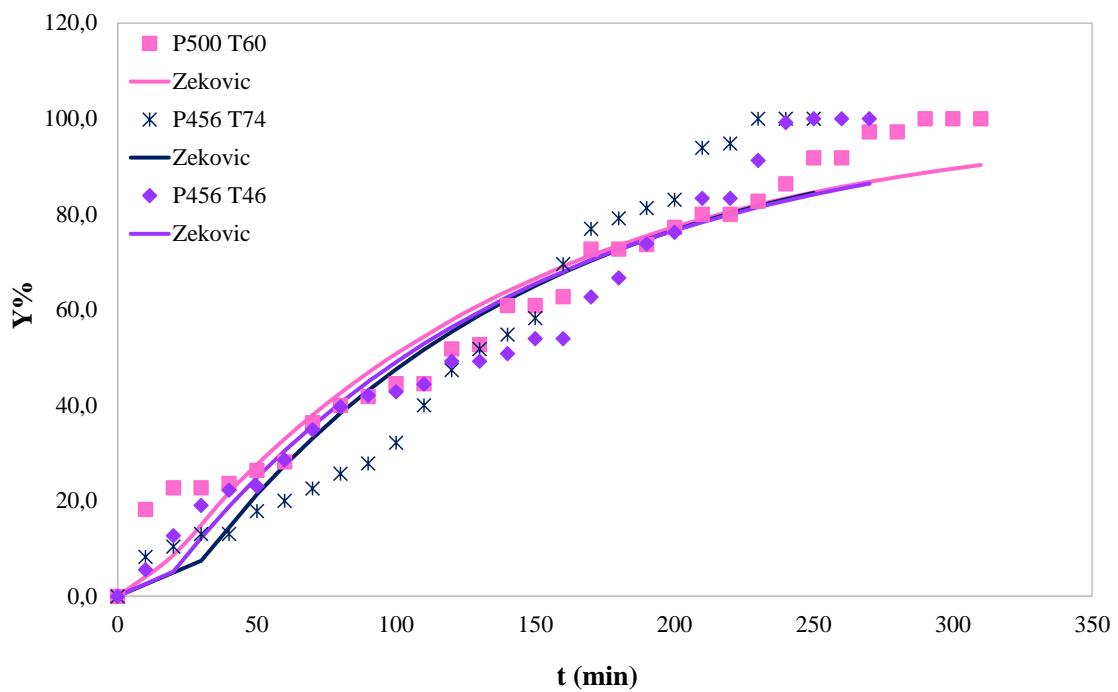
**Figura 36** – Ajuste do Modelo de Brunner (1984) para as condições de 200 bar e 60 °C, 244 bar e 74 °C e 244 bar e 46 °C.



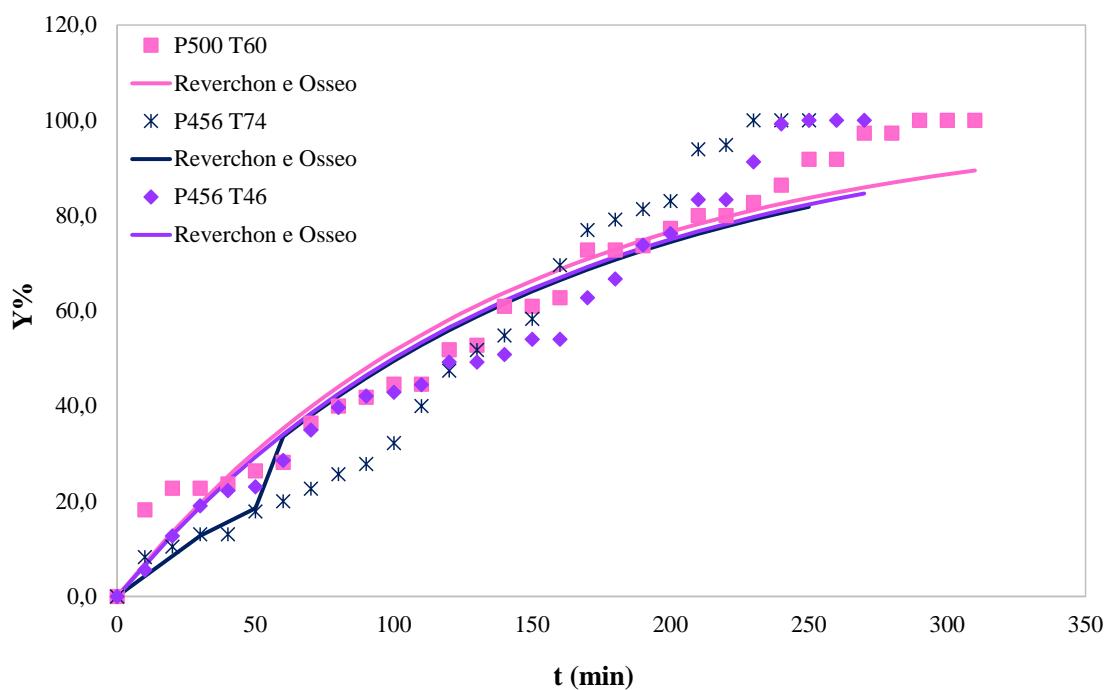
**Figura 37** – Ajuste do Modelo de Sovová (1994) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.



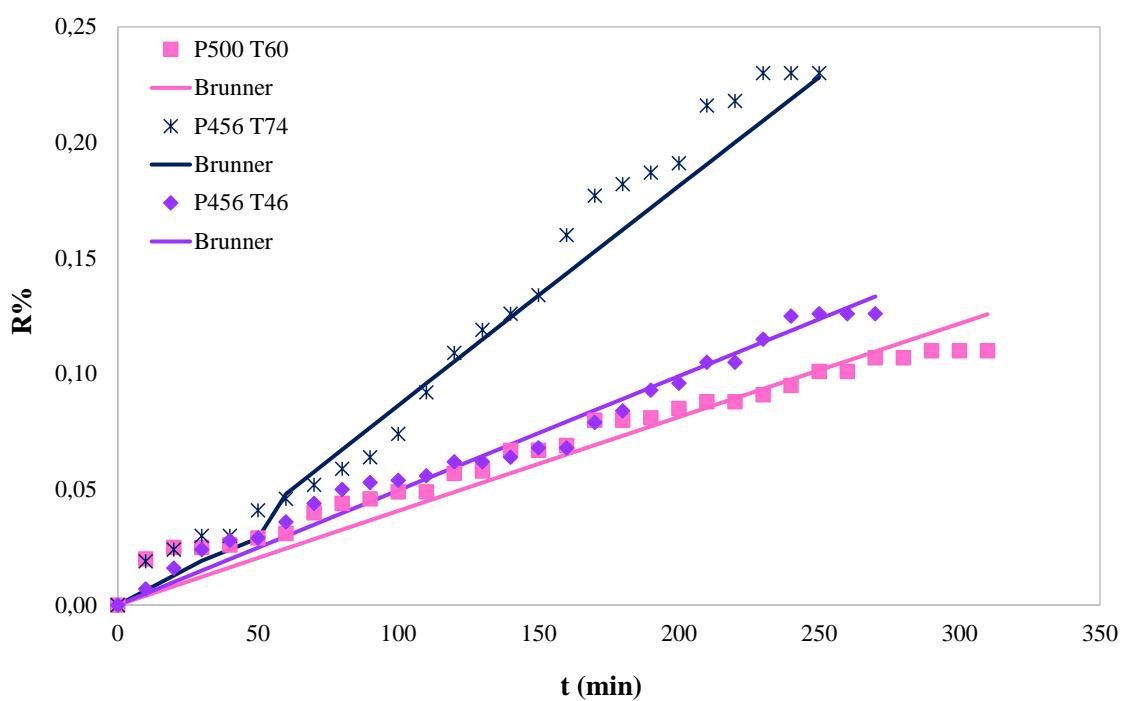
**Figura 38** – Ajuste do Modelo de Esquível *et al.* (1999) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.



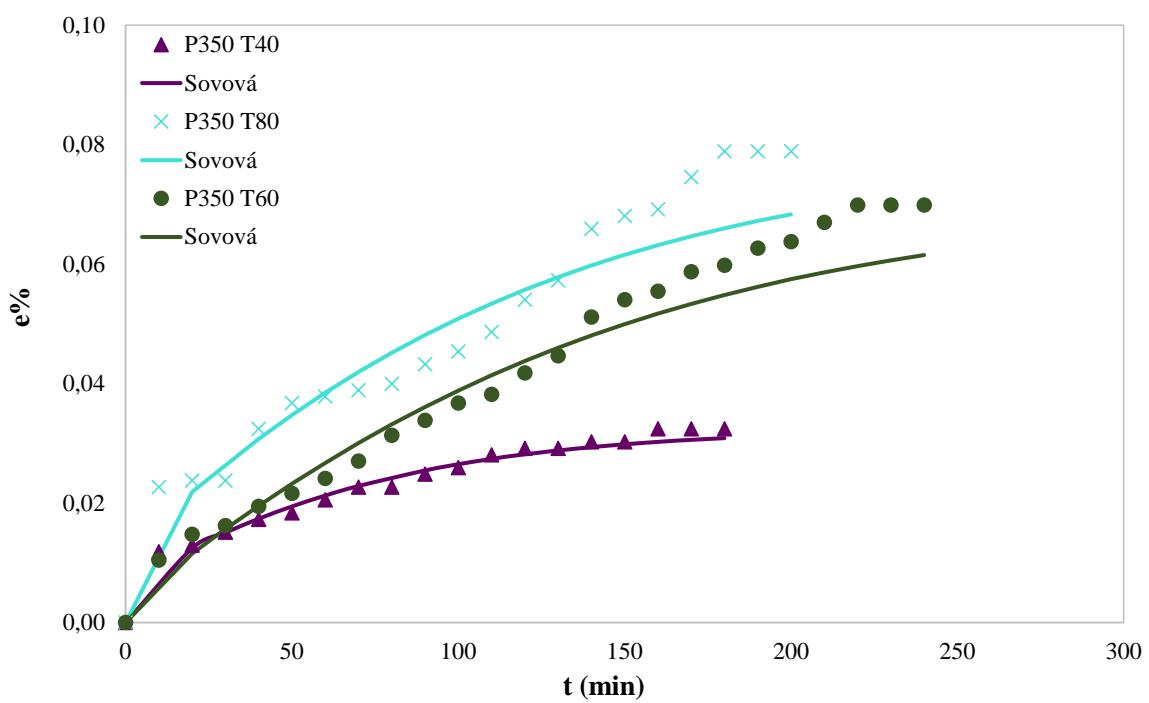
**Figura 39** – Ajuste do Modelo de Zeković *et al.* (2003) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.



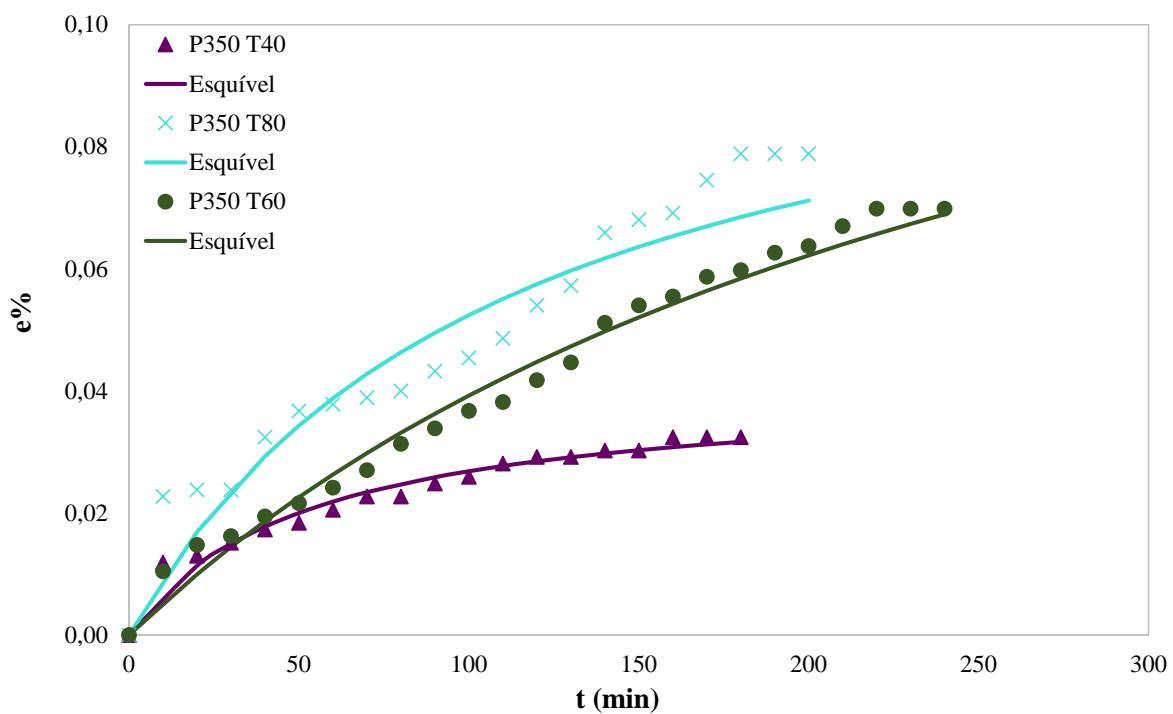
**Figura 40** – Ajuste do Modelo de Reverchon e Osseo (1994) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.



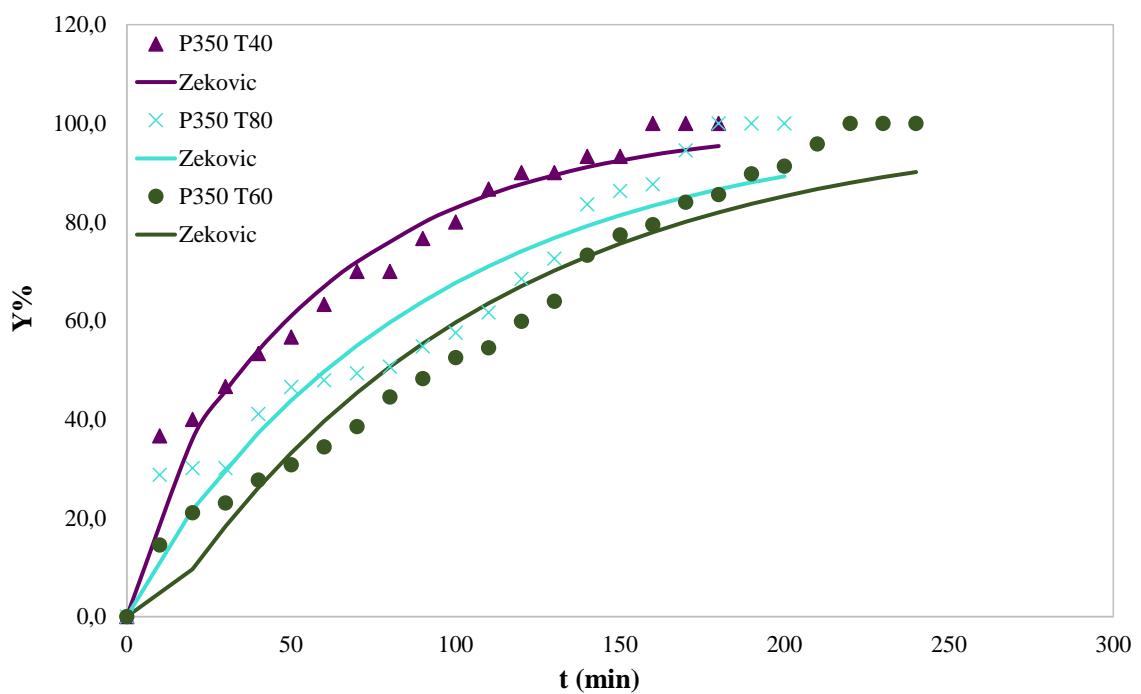
**Figura 41** – Ajuste do Modelo de Brunner (1984) para as condições de 500 bar e 60 °C, 456 bar e 74 °C e 456 bar e 46 °C.



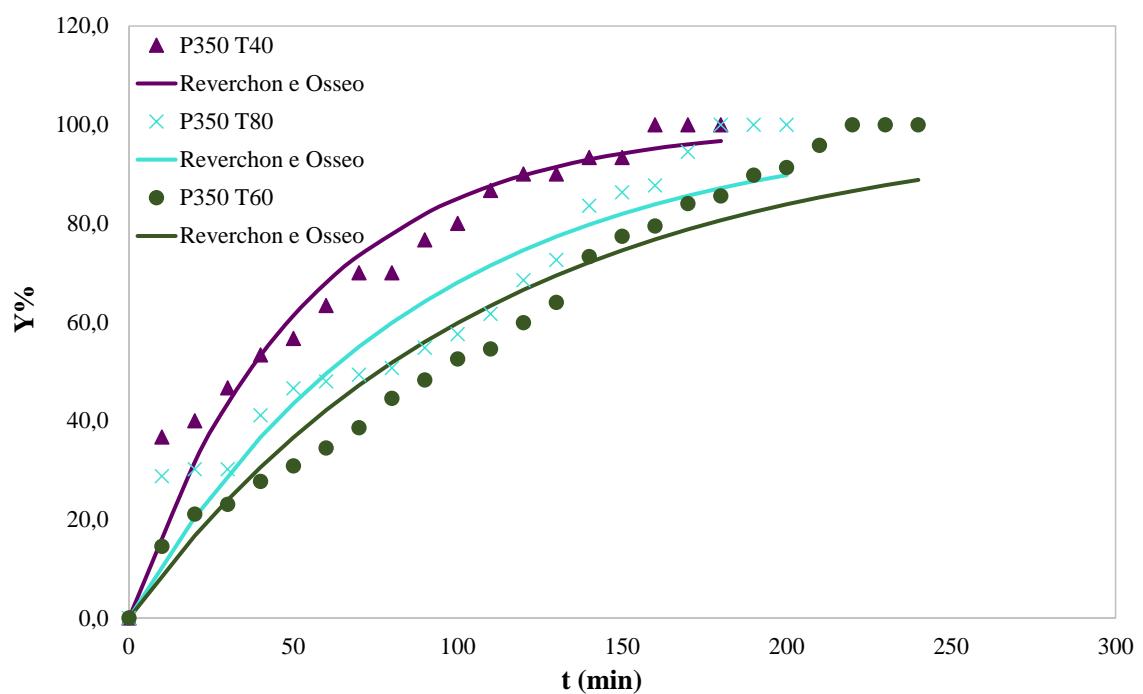
**Figura 42** – Ajuste do Modelo de Sovová (1994) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.



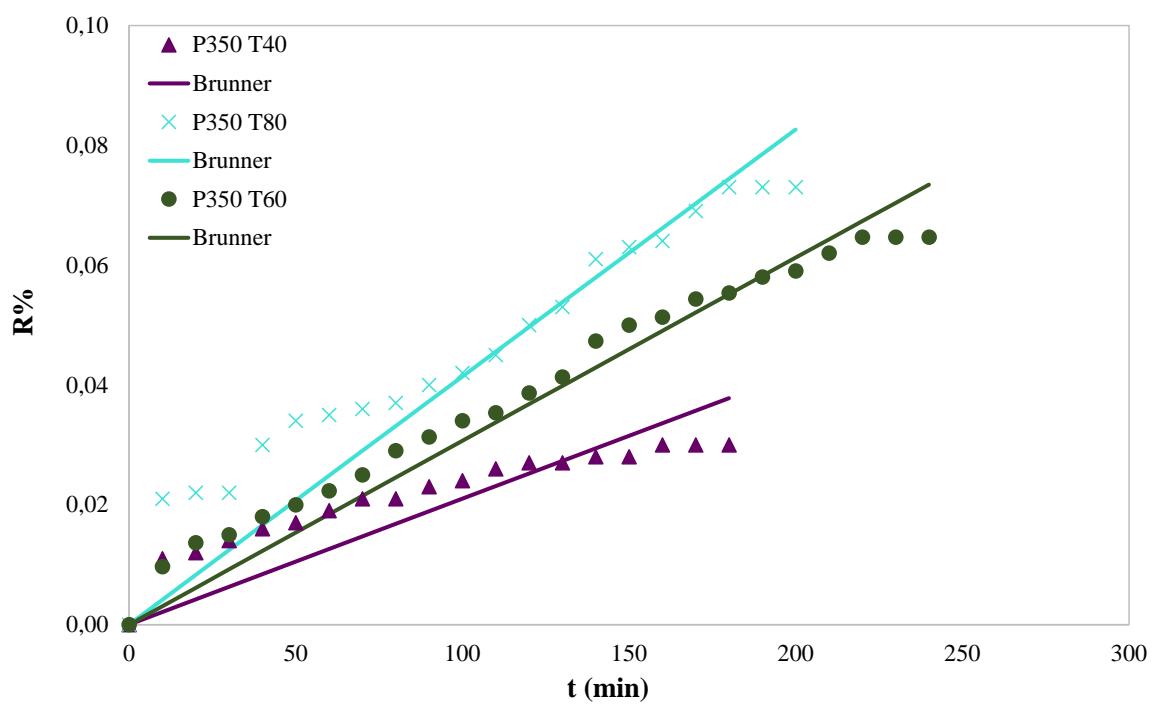
**Figura 43** – Ajuste do Modelo de Esquível *et al.* (1999) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.



**Figura 44** – Ajuste do Modelo de Zeković *et al.* (2003) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.



**Figura 45** – Ajuste do Modelo de Reverchon e Osseo (1994) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.



**Figura 46** – Ajuste do Modelo de Brunner (1984) para as condições de 350 bar a 40, 60 e 80 °C.