UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Rebeca Maria Neto

ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi: OTIMIZAÇÃO DA DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR; E EXTRAÇÃO COM CO_2 SUPERCRÍTICO

Santo André

Dezembro – 2022

Rebeca Maria Neto

ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE COMPOSTOS DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi: OTIMIZAÇÃO DA DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR; E EXTRAÇÃO COM CO_2 SUPERCRÍTICO

Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Bacharelado em Química da UFABC para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Guzzo da Silva
Coorientador: Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente meus pais e minha irmã por todo apoio, amor e compreensão, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço a todos os meus amigos que me acompanharam durante essa jornada, em especial, Letícia e Fábio, por estarem comigo nos momentos mais difíceis e me incentivarem sempre.

Aos amigos que fiz durante esse período na graduação, meu muito obrigada, vocês tornaram esse período desafiador muito mais leve.

Agradeço o meu companheiro de vida por sempre me apoiar, incentivar e estar sempre ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador Dr. Bruno Guzzo da Silva e coorientador Dr. João Henrique Ghilardi Lago por todo suporte, confiança e aprendizados durante a minha trajetória como discente e realização deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Álvaro Takeo Omori pela contribuição com as análises de Cromatografia Gasosa.

Agradeço a Dra. Priscilla Carvalho Veggi pela contribuição nos ensaios experimentais de extração supercrítica.

Agradeço ao Dr. André Gustavo Tempone Cardoso pela colaboração com os ensaios de atividade antiparasitária.

Agradeço imensamente a Universidade Federal do ABC por todo conhecimento, oportunidades e experiências vivenciadas. O ensino público superior transformou a minha vida.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

A doença de Chagas é causada por protozoários que afetam populações negligenciadas, causando uma alta mortalidade. Com isso, é de suma importância a descoberta de novas drogas, uma vez que os tratamentos atuais são limitados e de longo prazo, o que torna a química de compostos naturais uma alternativa valiosa para o desenvolvimento de novos fármacos. Os frutos da *Schinus terebinthifolius* Raddi, espécie brasileira, apresentam uma grande variedade de atividades biológicas oriundas de componentes presentes nos extratos e óleos essenciais obtidos por processos de extração. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo realizar a extração por arraste a vapor e por fluido supercrítico dos frutos da *S. terebinthifolius*, e investigar a atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*) dos produtos obtidos das extrações. O estudo teve como ênfase: a determinação da cinética da extração por arraste a vapor; a avaliação dos efeitos das variáveis operacionais na extração do óleo essencial; a investigação das condições ótimas da extração por arraste a vapor, em escala piloto; e a caracterização dos compostos de ambos os produtos das extrações. A técnica de planejamento de experimentos foi aplicada para otimização da extração por arraste a vapor, ao qual foi desenvolvido um Delineamento de Face Centrada composto por 11 ensaios, assim, investigando os efeitos da massa do leito de extração (100 a 200 g) e da potência de aquecimento do sistema (160 a 400 W). Ademais, a cinética de extração contribuiu para a determinação do tempo de extração, neste caso, sendo de 2 horas. No presente trabalho também foi realizada a extração por CO_2 supercrítico nas condições otimizadas de 60 °C e 300 bar, até a exaustão da matéria-prima. Ambos os produtos das extrações foram caracterizados por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Os resultados revelaram que o teor de monoterpenos e de Δ^3-careno (composto majoritário) foram influenciados pela potência de aquecimento do sistema, e com isso, os modelos podem ser utilizados para fins preditivos ($R^2 \approx 90\%$). Ao comparar ambos os resultados de caracterização, a extração por fluido supercrítico obteve maiores rendimentos de sesquiterpenos (47,73% – 54,21%) do que a extração por arraste a vapor (3,35% – 6,57%). O óleo essencial do ponto ótimo apresentou IC_{50} de 4,5 ± 0,3 μg/mL, possivelmente oriundo do componente *α*-pineno. Entretanto, o extrato supercrítico apresentou um efeito inibitório moderado (IC_{50} = 19,7 ± 2,9 μg/mL) e IS > 10,1. De forma geral, tanto o óleo essencial como o extrato supercrítico apresentaram expressivo potencial antiparasitário *T. cruzi*, em especial o óleo essencial, além de demonstraram reduzida toxicidade *in vitro*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Schinus terebinthifolius* Raddi, extração supercrítica, extração por arraste a vapor, atividade antiparasitária, planejamento de experimentos.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by protozoan that affect neglected populations, causing high mortality. Thus, the discovery of new drugs is of paramount importance, since current treatments are limited and long-term, which makes the chemistry of natural compounds a valuable alternative for the development of new drugs. The fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi, a Brazilian species, present a wide variety of biological activities arising from components present in extracts and essential oils obtained by extraction processes. Thus, the present work aims to carry out the extraction by steam drag and by supercritical fluid of the fruits of *S. terebinthifolius*, and to investigate the antiparasitic activity (*Trypanosoma cruzi*) of the products obtained from the extractions. The study focused on: determining the kinetics of extraction by steam drag; the evaluation of the effects of operational variables on essential oil extraction; the investigation of the optimal conditions of extraction by steam drag, on a pilot scale; and characterization of the compounds of both extraction products. The design of experiments was applied to optimize the extraction by steam drag, to which a Face Centered Design was developed consisting of 11 tests, investigating the effects of the extraction bed mass (100 to 200 g) and the power of system heating (160 to 400 W). In addition, the extraction kinetics contributed to the determination of the extraction time, in this case, being 2 hours. In the present work, extraction by supercritical CO_2 was also carried out under optimized conditions of 60 °C and 300 bar, until the raw material was exhausted. Both extraction products were characterized by Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. The results revealed that the content of monoterpenes and Δ^3-carene (major compound) were influenced by the heating power of the system, and with that, the models can be used for predictive purposes ($R^2 \approx 90\%$). When comparing both characterization results, supercritical fluid extraction had higher sesquiterpenes yields (47,73% – 54,21%) than steam drag extraction (3,35% – 6,57%). The optimum point essential oil had an IC_{50} of 4,5 ± 0,3 μg/mL, possibly originating from the α-pinene component. However, the supercritical extract showed a moderate inhibitory effect (IC_{50} = 19,7 ± 2,9 μg/mL) and IS > 10,1. In general, both the essential oil and the supercritical extract showed significant antiparasitic potential for *T. cruzi*, especially the essential oil, in addition to showing reduced toxicity in vitro.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Schinus terebinthifolius* Raddi, supercritical extraction, steam drag extraction, anti-parasitic activity, design of experiments.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8

1.1 A *Schinus terebinthifolius* Raddi 9

1.1.1 Compostos químicos dos frutos da *Schinus terebinthifolius* Raddi 11

1.2 O *Trypanosoma cruzi* 13

1.3 Processos de extração 14

1.3.1 Extração por arraste a vapor 14

1.3.2 Extração com fluido supercrítico 15

1.4 Planejamento experimental 17

2 OBJETIVOS 19

3 METODOLOGIA 20

3.1 Teor de umidade 20

3.2 Extração por arraste a vapor 20

3.2.1 Metodologia experimental 21

3.2.2 Planejamento experimental 22

3.3 Extração com fluido supercrítico 24

3.4 Análises cromatográficas 25

3.5 Atividade antiparasitária 25

3.5.1 Cultura de parasitas 25

3.5.2 Determinação *in vitro* da atividade antiparasitária e da concentração inibitória 50% (CI_{50}) do óleo essencial e extrato supercrítico 26

3.5.3 Determinação da citotoxicidade 26

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 27

4.1 Extração por arraste a vapor 27

4.1.1 Definição do tempo de extração 27

4.1.2 Composição química do óleo essencial 31

4.1.3 Efeitos das condições operacionais 33

4.1.4 Otimização.....38

4.2. Extração por fluido supercrítico.....45

4.3 Atividade antiparasitária.....49

5 CONCLUSÕES.....51

REFERÊNCIAS.....52

1 INTRODUÇÃO

O Brasil contém uma das maiores biodiversidades do mundo, e estima-se que o país possui até 20% do número total de espécies existentes no planeta. Além de possuir grande variedade de espécies vegetais e animais presentes em seu território, algumas áreas em seus domínios ainda não foram totalmente exploradas, expandindo a possibilidade de descobertas de novas espécies que despertam interesses por serem potenciais biotecnológicos (BARBOSA; VIANA, 2014).

Dentre as espécies nativas do país a *Schinus terebinthifolius* Raddi, da família Anacardiaceae, é popularmente conhecida como pimenta-rosa e se destaca por suas propriedades medicinais e alimentícias. Os seus frutos são apreciados como especiaria nas culinárias nacionais e internacionais, enquanto que na medicina popular brasileira, a espécie se destaca por apresentar uma variedade de atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, cicatrizante, anticancerígena, antiparasitária e antioxidante (PEREIRA *et al.*, 2021).

A espécie apresenta uma diversidade de compostos em suas partes e quando comparadas, os frutos possuem a maior quantidade de óleo essencial com variada composição química (WILLIANS *et al.*, 1998). De acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO, 1997), um óleo essencial é o produto originário de uma matéria-prima vegetal obtida através da destilação por arraste a vapor.

Dentre as diferentes técnicas de obtenção dos óleos essenciais, a hidrodestilação e a destilação por arraste a vapor são as mais clássicas. Além delas, a extração por solventes orgânicos e extração com fluido supercrítico também são empregadas para a extração de compostos voláteis, no qual o produto obtido em ambos os processos não é definido como óleo essencial, apesar de serem extratos aromáticos (SILVA, 2017). Os processos de extração por hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, e com fluido supercrítico apresentam como vantagem a não utilização de solventes orgânicos e tóxicos. Entretanto, para comparar técnicas é importante explorar condições ótimas dos processos, com o intuito de encontrar as melhores condições de aplicação. Com isso, o planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística promissora para este aspecto, com ele é possível compreender os efeitos causados por fatores que influenciam o processo de interesse. Um planejamento experimental é utilizado para

melhorar a qualidade de um produto ou processo, diminuir a quantidade de testes e custos, e otimizar processos tradicionais (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A Doença de Chagas, causada por protozoários *Trypanosoma cruzi*, reconhecida pela Organização Mundial da Saúde por ser uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afeta milhões de pessoas causando uma alta mortalidade. Deste modo, a descoberta de novas moléculas bioativas é bastante relevante para o tratamento, e a química de compostos naturais, tais como a observada pelos frutos da *S. terebinthifolius*, contribui para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que as terapias atuais são limitadas e tóxicas (BARRETT; CROFT, 2012). Na literatura, são encontrados estudos da atividade antiparasitária da *T. cruzi* através do isolamento de compostos das folhas e dos frutos de *S. terebinthifolius* (MORAIS *et al.*, 2014; SARTORELLI *et al.*, 2012), porém até o momento não foi encontrado nenhum outro estudo da atividade anti-*T. cruzi* de um extrato supercrítico.

1.1 A *Schinus terebinthifolius* Raddi

A *S. terebinthifolius*, conhecida como pimenta-rosa, aroeira-vermelha, pimenta brasileira e aroeira-pimenteira (PEREIRA *et al.*, 2021), é uma espécie vegetal nativa da América do Sul e não endêmica devido à sua característica de se adaptar a diferentes condições ambientais, sendo encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina (COSTA *et al.*, 2015). Essa espécie apresenta variações de nomes pelo qual é popularmente conhecida, pois seus frutos possuem uma aparência semelhante a uma pequena pimenta de coloração rosa avermelhada (Figura 1e). Além dos nomes já mencionados anteriormente, a espécie também é conhecida por pimenta-rosa, "*pink pepper*" e "*poivre-rose*" (GRISI, 2010). Apesar de possuir pimenta em seu nome, a *S. terebinthifolius* não possui qualquer parentesco com a família de pimentas, pois ela pertence à família Anacardiaceae, a mesma das frutas caju, manga e cajá-mirim (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 1 – Aspectos morfológicos da *S. terebinthifolius*: (a) aspecto geral da árvore; (b) casca do caule; (c) folhas; (d) inflorescência; (e) frutos.

Fonte: Silva (2017).

A espécie apresenta como características morfológicas (Figura 1): altura entre 5 e 10 metros; tronco revestido por casca grossa com 30 a 60 cm de diâmetro; folhas compostas imparipinadas com 3 a 10 pares de folíolos de 10 a 15 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura (GRISI, 2010). O seu processo de maturação acontece entre setembro e janeiro e sua geração de frutos entre janeiro e junho, porém como essas plantas apresentam a características de variabilidade e adaptabilidade, a atribuição de um período de floração e frutificação é variado (LORENZI, 2002).

De acordo com Cesário e Gaglianone (2008), os frutos da *S. terebinthifolius* são apreciados como condimento alimentar na cozinha nacional e internacional, mas a maior atribuição da espécie está relacionada às suas propriedades alimentícias e medicinais. Embora o uso popular como planta medicinal, a *S. terebinthifolius* tem apresentado um alto potencial para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos. Na família Anacardiaceae, os componentes mais presentes são os triterpenos, lipídios fenólicos e biflavonóides, porém na literatura existe estudos que revelam a presença de outras classes de substâncias, tais como os fenóis e derivados do ácido cinâmico (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006). De acordo com Lima *et al.* (2006), no extrato etanólico da casca de *S. terebinthifolius* foi revelado a presença de fenóis, triterpenos

e antraquinonas. Já nos extratos etanólicos das folhas havia resultados positivos para fenóis, flavonas, flavonoides, xantonas, leucoantocianidinas, flavanonas e esteroides livres.

Alguns estudos farmacológicos com extratos da *S. terenbinthifolius* afirmam que a espécie apresenta propriedades anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, cicatrizante, anticancerígena, antiparasitária e antioxidante (PEREIRA *et al.*, 2021). Na literatura, o extrato de frutos de *S. terebinthifolius* apresentou potencial antioxidante em ensaios de DPPH, ORAC e β-caroteno, e análises *in vivo* constataram a diminuição dos danos causados pelo estresse oxidativo promovido por H_2O_2 em células de *Saccharomyces cerevisiae* (OLIVEIRA, *et al.* 2020). Morais *et al.* (2014) revelaram que sete compostos isolados das folhas de *S. terebinthifolius* demonstraram atividade tripanocida com IC_{50} na faixa entre 15 e 58 µg/mL. Também foi constatado o potencial antioxidante e antiproliferativo *in vitro* de compostos isolados do extrato bruto da *S. terebinthifolius*, e em *in vivo*, evidenciaram atividades anti-inflamatórias (SILVA *et al.*, 2017). Em Matsuo e colaboradores (2011), foi investigado mecanismo de morte celular induzido pelo α-pineno derivado dos *S. terebinthifolius.* O óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* apresentou atividade antimicrobiana verificada contra duas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (DANNENBERG, 2019). Shalders *et al.* (2014) adicionaram frutos da *S. terebinthifolius* na alimentação de caprinos e evidenciou que a adição da planta na nutrição desses animais possibilitou a diminuição dos parasitas sem perda nutricional.

1.1.1 Compostos químicos dos frutos da *Schinus terebinthifolius* Raddi

Os variados usos da *S. terebinthifolius* comprovam a diversidade de compostos em sua composição. De acordo com Willians *et al.* (1998) a variação apresentada na composição química do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* é justificada pela relação direta com o ambiente em que a espécie é desenvolvida e o seu tipo de cultivo. Com isso, nas partes da árvore da *S. terebinthifolius* são encontrados diversos compostos, tais como substâncias alifáticas simples (1-octeno, pentanal e proprionato de etila), taninos, bisfenóis, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenóides e fenóis (GILBERT *et al.*, 2011).

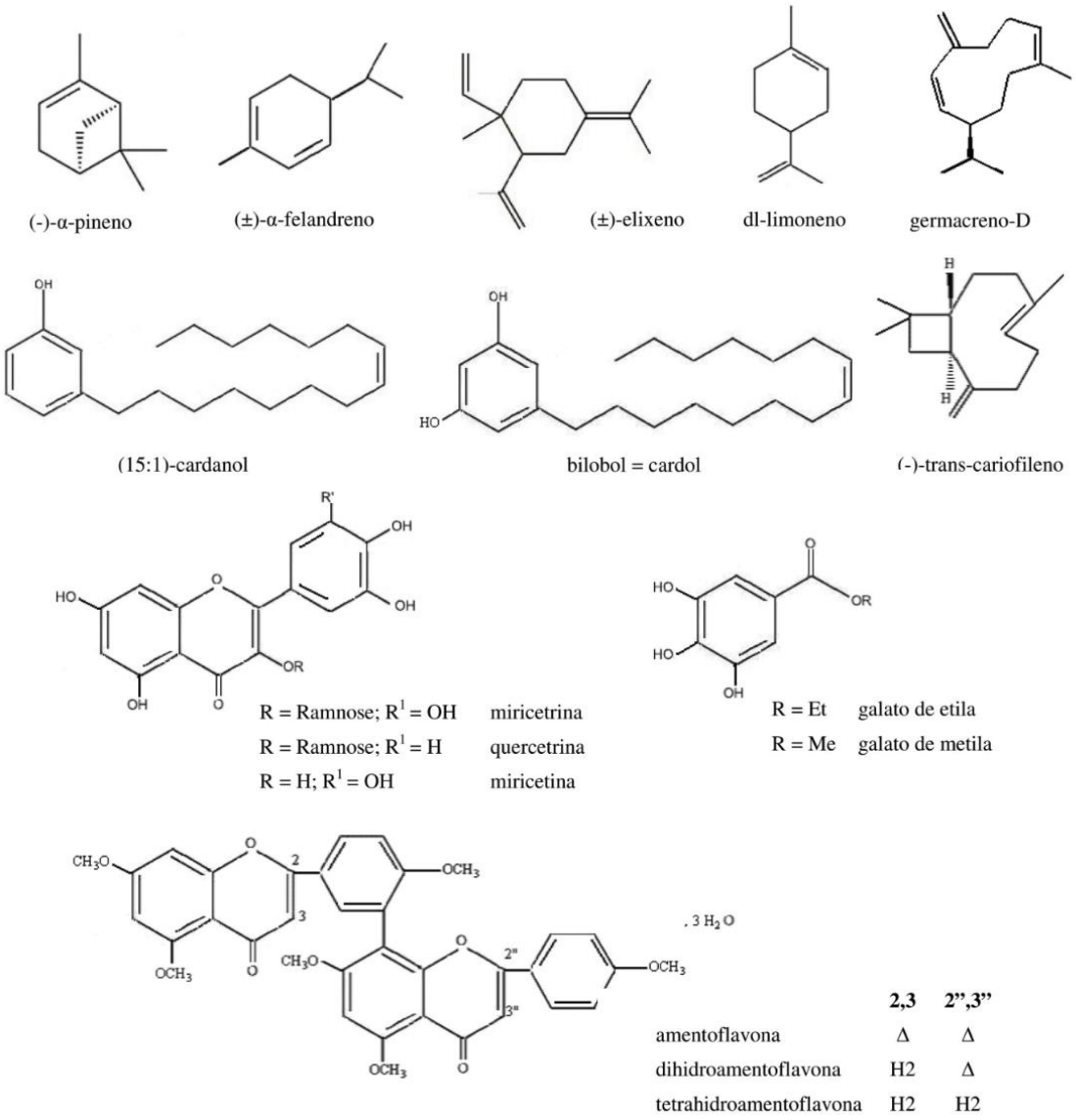
Em um estudo de identificação dos principais constituintes do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* foi constatada que os principais compostos encontrados na amostra são monoterpenos, sendo que os maiores constituintes são Δ^3-careno (24,56%) e α-pineno (16,14%) que representam aproximadamente 40% dos constituintes da amostra estudada. El-Massry e

colaboradores (2009), extraíram óleo essencial das folhas secas da *S. terebinthifolius* bastante rico em terpenos, e que apresentou compostos não terpenos, como 1-octeno, pentanal e proprianato de etila. Através da caracterização do óleo essencial foi possível encontrar em alta concentração os monoterpenos (Δ^3-careno, α-felandreno, β-felandreno, α-pineno e β-pineno) e um menor concentração os sesquiterpenos (cariofileno e germacreno D) (BARBOSA *et al.*, 2007). Singh *et al.* (1998) identificaram 41 compostos que corresponderam 86,4% do óleo essencial, sendo que os principais componentes foram o α-pineno (24,4%), limoneno (11,9%) e p-cimeno (14,3%). Outro estudo constatou 17 compostos no óleo essencial, sendo predominantes as seguintes espécies de monoterpenos: Δ^3-careno (30,37%), o limoneno (17,44%), α-felandreno (12,60%), α-pineno (12,59%), mirceno (5,82%) e o o-cimeno (3,46%) (COLE, 2008). Santana e colaboradores (2012), investigaram a composição química e citotoxicidade do óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolius*, bem como a identificação de compostos ativos, e identificaram 49 constituintes no óleo (97,9% do total), com germacreno D (23,7%), bicicclogermacreno (15,0%), β-pineno (9,1%) e β-longipineno (8,1%) como principais compostos. De forma geral, tais variações de composição podem ser justificadas pela alta complexidade química dos óleos essenciais, uma vez que sua composição química e atividades biológicas são impactadas pelo local de colheita da matéria-prima e condições climáticas, a variabilidade genética da espécie, as etapas de pré-tratamento da matéria-prima, o tipo de técnica de extração aplicada e as condições operações dos processos de extração (BANDONI, 2003; CHAMORRO *et al.*, 2012; KARAM *et al.*, 2016).

Além dos compostos voláteis presentes nos frutos da *S. terebinthifolius*, também podem ser encontrados os não voláteis, que apresentam uma maior massa molecular e algumas atividades biológicas, como os compostos fenólicos (apigenina, ácido elágico e naringina) e os caratenóides, estes são responsáveis principalmente pela atividade antioxidante dos frutos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004; BERTOLDI, 2006; PAGANI *et al.*, 2014).

A Figura 2 apresenta as estruturas moleculares de alguns compostos mencionados, sendo válido ressaltar que a composição dos extratos naturais é determinada principalmente por fatores genéticos e ambientais. Além deles, a época de colheita, horário e modo de secagem da matéria-prima, influenciam na composição química e rendimentos dos extratos (LIVIA, 2013).

Figura 2 – Algumas substâncias identificadas em *S. terebinthifolius*.



Fonte: Gilbert *et al.* (2011).

1.2 O *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença parasitária causada pelo protozoário *T. cruzi*. No ser humano, tem-se como as principais consequências a cardiopatia chagásica e as dilatações de órgãos cavitários que influenciam principalmente o aparelho digestivo, podendo levar a mortalidade especialmente em sua fase crônica (REY, 2008). Essa doença é classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma “doença negligenciada” que apresenta baixo investimento para descoberta, desenvolvimento e entregas de novas alternativas, sendo capaz de afetar milhões de pessoas. Além disso, os medicamentos

são limitados e altamente tóxicos para a doença, e existem poucos tratamentos em desenvolvimento clínico mesmo com demanda (BARRETT; CROFT, 2012).

Desta forma, o estudo de compostos naturais é importante para o desenvolvimento de novas alternativas. Alguns estudos, avaliaram a atividade anti-*T. cruzi* de *S. terenthifolius*. Morais *et al.* (2014) e Sartorelli *et al.* (2012) estudaram a atividade antiparasitária frente ao *T. cruzi* de compostos isolados das folhas e dos frutos de *S. terebinthifolius*, porém não utilizando a extração por fluido supercrítico ou realizando investigação das condições operacionais da destilação por arraste a vapor.

1.3 Processos de extração

A extração é uma operação unitária baseada no princípio de transferência de massa e consiste na remoção de um ou mais componentes através da solubilidade. Dependendo da natureza da mistura, essa operação pode acontecer entre duas fases líquidas ou entre uma líquida e uma sólida (MATOS, 2015).

Para isolar extratos e óleos essenciais de plantas aromáticas são utilizados diferentes processos de extração, como a hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, extração por solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico, entre outros (SILVEIRA *et al.*, 2012). Sendo a hidrodestilação e a destilação por arraste a vapor os processos mais tradicionais utilizados no laboratório e na indústria, respectivamente, para a obtenção de óleos essenciais (SARTOR, 2009).

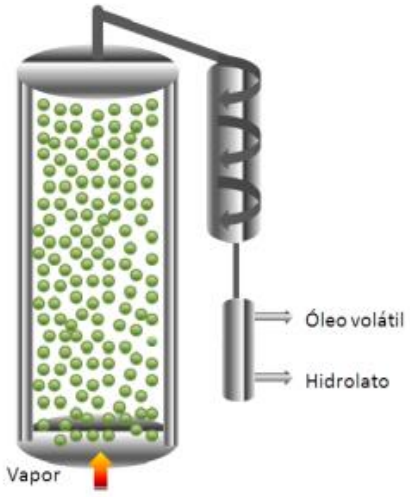
1.3.1 Extração por arraste a vapor

A extração por arraste a vapor se baseia no princípio de destilação por arraste a vapor, técnica aplicável a misturas de líquidos imiscíveis. Nessa operação unitária, a mistura de líquidos imiscíveis entrará em ebulição a uma temperatura menor que os pontos de ebulição de quaisquer dos componentes puros separados (ENGEL *et al.*, 2012).

Na indústria, em uma planta de destilação, uma corrente de vapor saturado ou superaquecido, gerado por uma caldeira externa, alimenta o extrator ou coluna que está empacotada com matéria-prima e extrai os componentes voláteis presentes na matriz vegetal, devido a passagem do vapor saturado pela matéria-prima, provocando a volatilização dos compostos voláteis. A mistura de vapor de água com esses componentes voláteis é condensada, e devido a imiscibilidade dos componentes da mistura, ocorre formação de duas fases líquidas

que podem ser facilmente separadas. A Figura 3 representa o esquema de destilação com vapor direto utilizado industrialmente (SARTOR, 2009; LEAL, 2009).

Figura 3 – Sistema de destilação por arraste a vapor.



Fonte: Leal (2008).

Dessa forma, o diferencial do presente estudo está na definição de parâmetros operacionais visando a aplicação industrial, sendo avaliados os efeitos das condições operacionais sobre o desempenho da extração de óleo essencial. Essas informações são extremamente importantes para a redução de custos de produção, principalmente, se a intenção é agregar valor às matérias-primas brasileiras.

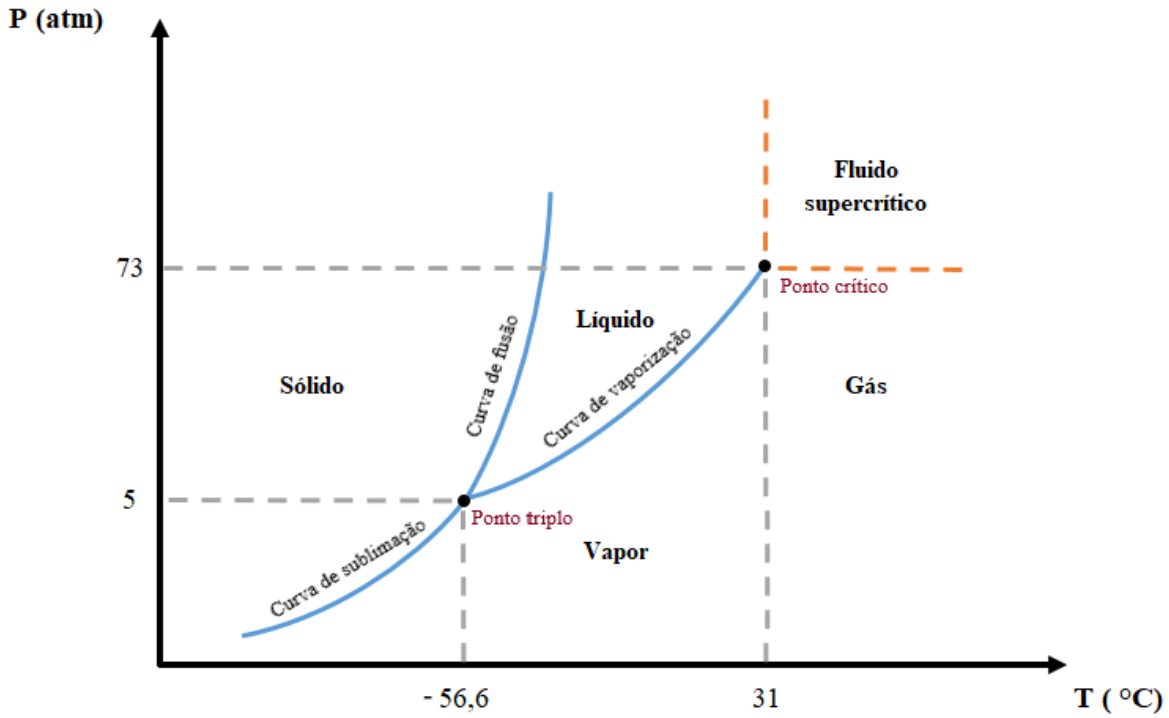
1.3.2 Extração com fluido supercrítico

A extração supercrítica (SFE, sigla em Inglês de "*Supercritical Fluid Extraction*") é uma operação unitária de transferência de massa, apresentando temperatura e pressão acima dos valores críticos em sua operação. A técnica possui a característica do meio extrator ser um fluido supercrítico, mas com alta densidade de modo que interações polares e seletividade do poder extrativo sejam mais intensas quando comparadas a de um gás comum, e a difusão de outras substâncias nele, seja menor. Com isso, essa tecnologia tem sido cada vez mais desenvolvida e se tornou uma alternativa as técnicas tradicionais de extração. Além disso, o processo pode ser considerado sustentável, pois utiliza de fluidos supercríticos e assegura a ausência de solventes tóxicos no produto final (MATOS, 2015; MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996).

Os fluidos supercríticos apresentam propriedades que possibilitam a extração, como a sua alta difusividade, baixa tensão superficial e densidade, o que permite transferências significativas de massas. Geralmente, o CO_2 é o fluido supercrítico utilizado, pois apresenta valores de temperatura e pressão relativamente baixos (73,8 bar e 31,1 °C), não é inflamável, é inerte, atóxico, capaz de sair do extrato após a descompressão, além de apresentar menor custo e alta pureza. Como vantagens, esta operação unitária evita a degradação de compostos termossensíveis, a oxidação de compostos devido à ausência de luz e oxigênio, os extratos não necessitam de esterilização e os resíduos sólidos podem ser reaproveitados, pois não possuem solventes (MATOS, 2015).

A Figura 4 é um diagrama de fases do CO_2, solvente utilizado no processo, que representa as diversas fases termodinâmicas da substância pura, divididas em regiões no diagrama de temperatura-pressão. As linhas do diagrama representam a coexistência entre duas fases termodinâmicas, que em determinada pressão a coexistência de duas fases é apenas possível em temperaturas específicas. O ponto crítico, é o ponto de encontro entre as três fases termodinâmicas, no qual as fases líquido e vapor são indistintas (DE OLIVEIRA, 2005). Nele, o extrator apresenta características dos gases e algumas dos líquidos, tais como: a compressibilidade semelhante a um gás; dissolução de solutos como um líquido quando está comprimido suficiente; baixa viscosidade como a de um gás; e difusão intermediária entre gases e líquidos, variando com a densidade (MAUL *et al*., 1996).

Figura 4 – Diagrama de fases do dióxido de carbono (CO_2).



Fonte: Adaptado De Oliveira (2005).

1.4 Planejamento experimental

Em indústrias químicas normalmente são encontrados problemas envolvendo o estudo de várias propriedades simultaneamente e que por sua vez, são afetadas por um grande número de fatores experimentais. A estatística é uma ferramenta capaz de contribuir na investigação dos efeitos de todos os fatores sobre todas as propriedades, minimizando a quantidade de trabalho necessário e o custo de experimentos, além de contribuir para a qualidade de um produto através de fatores experimentais controlados (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Para a aplicação da técnica de planejamento fatorial de experimentos é necessário primeiramente definir quais são as variáveis independentes e dependentes do processo, e suas faixas de estudo. Em seguida, é necessário escolher o planejamento adequado de acordo com o número de variáveis independentes; determinar a influência das variáveis sobre as respostas do processo; ajustar os modelos empíricos aos dados experimentais; analisar a qualidade de ajuste do modelo através da Análise de Variância (ANOVA); construir as superfícies de respostas e curvas de contorno para os modelos validados estatisticamente; por fim, determinar as

condições operacionais ótimas pela análise de superfície de resposta e curva de contorno (SILVA, 2017).

Alguns estudos mostram as vantagens do uso da metodologia de planejamento de experimentos. DiCiaula *et al.* (2014), utilizaram a técnica para estudar os efeitos de diferentes solventes e suas misturas no rendimento, teor de polifenóis totais e capacidade antioxidante dos extratos brutos da casca de *S. terebinthifolius*. Em Amaral e colaboradores (2021), um planejamento fatorial 3^3 e um planejamento composto central (PCC) foram aplicados na extração de *S. terebinthifolius*, obtendo um ponto ótimo de extração (35,24%) com massa de 13,49 g e tempo de extração de 2 horas, à 60 °C.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral realizar a extração de compostos bioativos dos frutos da *S. terebinthifolius*, visando investigar a sua atividade *in vitro* anti-*T. cruzi*. A seguir, encontram-se os objetivos específicos definidos para alcançar o objetivo geral:

a) determinar a cinética da extração do óleo essencial por arraste a vapor;

b) avaliar os efeitos das condições operacionais do arraste a vapor, em escala piloto, sobre a qualidade e quantidade do óleo essencial dos frutos da *S. terenbinthifolius*;

c) otimizar o processo de extração por arraste a vapor utilizando a ferramenta de planejamento de experimentos;

d) realizar a obtenção o extrato dos frutos da *S. terebinthifolius* utilizando CO_2 supercrítico como solvente;

f) caracterizar os componentes presentes nos produtos obtidos nas extrações;

e) investigar e comparar a atividade antiparasitária dos produtos obtidos nas extrações em análise *in vitro* frente ao parasita *T. cruzi*.

3 METODOLOGIA

Os frutos secos da *S. terebinthifolius* foram obtidos em maio de 2022, de produtores do Espírito Santo, Brasil. Como a *S. terebinthifolius* é uma espécie nativa do Brasil, o cadastro de acesso no SisGen foi realizado e encontra-se sob o número A13F4B4. As amostras foram trituradas em um processador (NINJA, AUTO-IQ) e, em seguida, foram armazenadas em embalagens plásticas herméticas e mantidas refrigeradas até o início dos ensaios.

3.1 Teor de umidade

O teor de umidade em base seca (M) e o conteúdo da umidade em base úmida (M^*) foram determinados para analisar a umidade dos frutos da *S. terenbinthifolius*, tais parâmetros são relacionados na Equação 1.

$$M = \frac{M^*}{1 - M^*} \qquad (1)$$

O teor de umidade em base seca foi determinado pela Equação 2.

$$M = \frac{m_{su} - m_{ss}}{m_{ss}} \qquad (2)$$

Em que m_{su} é a massa úmida de sólido e m_{ss} é a massa seca de sólido.

A massa seca foi determinada pelo método da estufa, no qual aproximadamente 5 g de frutos secos foram colocados em placas de petri e mantidos em estufa (DeLeo®, modelo A5DG) à temperatura de 105 °C durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram mantidas em dessecador à vácuo (Nalgon®, modelo 0810) até atingir a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica (SHIMADZU®, modelo AUY220, precisão de 0,0001 g). O teor de umidade em base seca da matéria-prima foi de aproximadamente 0,0858 e o teor em base úmida de aproximadamente 7,9%.

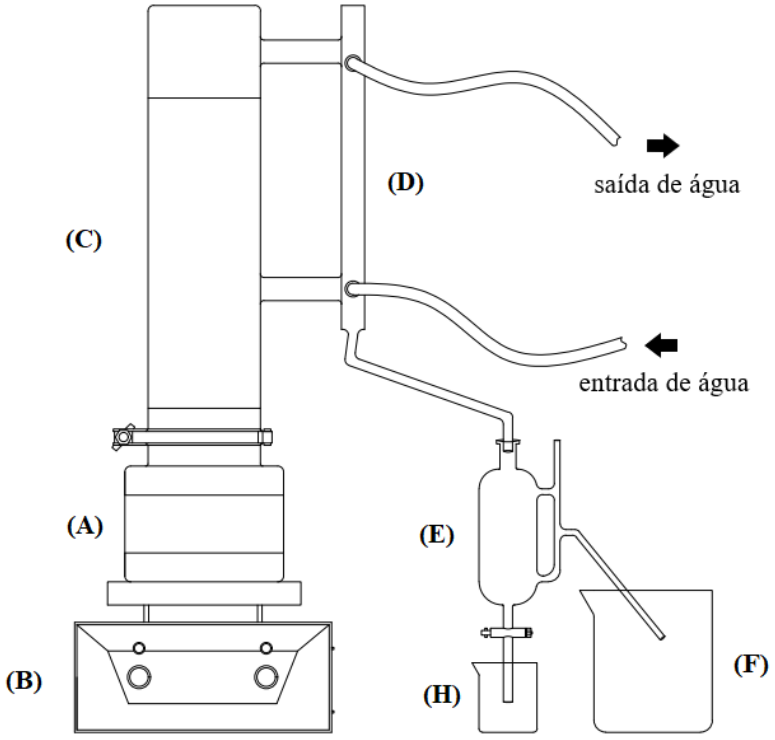
3.2 Extração por arraste a vapor

Para estudar o processo de extração por arraste a vapor foi realizado o uso da metodologia de planejamento de experimentos. Desta forma, a metodologia do processo foi dividida em: metodologia experimental; e planejamento experimental.

3.2.1 Metodologia experimental

O processo de extração do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* foi realizado por arraste a vapor em um equipamento que realiza o processo realizado industrialmente, mas em uma escala menor (Figura 5).

Figura 5 – Esquema do sistema de extração de óleo essencial utilizado no estudo.



Legenda: (A): Caldeira para geração do vapor d'água; (B): Chapa de aquecimento; (C) Coluna de destilação contendo massa de leito; (D) Condensador; (E) Coletor de produto; (H) Recipiente de destinado óleo essencial; (F): Recipiente de destinado do hidrolado.

Anteriormente a cada extração, os frutos foram retirados do *freezer* e adicionados aos poucos na coluna de destilação (C). No fundo e na entrada da coluna foi colocado um tecido metálico, e após colocar um suporte na entrada, na caldeira (A) foi adicionado 1 L de água. Em seguida, a caldeira foi colocada sobre a chapa de aquecimento (B) (Biothec®, modelo BT40AL, 400 W) e a coluna foi conectada. O sistema de aquecimento foi mantido em ebulição durante todo o processo de extração. A água e os compostos voláteis foram vaporizados e, em seguida, condensados (D) através do contato indireto com água a temperatura ambiente. O hidrolato que estava na parte inferior do coletor (E) foi direcionado com auxílio do tubo do equipamento para

saída em um béquer de 1 L (F) e o óleo essencial, na parte superior, foi retirado cuidadosamente com auxílio do coletor (E).

A massa do óleo essencial foi determinada em uma balança semi-analítica (ACCULAB®, precisão de 0,01 g) para o cálculo de rendimento, em base seca, da destilação por arraste a vapor (Y_0), segundo a Equação 3.

$$Y_0 = \frac{m_o}{m_{ss}} \cdot 100 \qquad (3)$$

Em que m_o é a massa do óleo essencial e m_{ss} é a massa seca da matéria-prima utilizada na extração por arraste a vapor.

Em seguida, o óleo essencial foi armazenado em frasco de vidro e mantido refrigerado a -18 °C, até a realização das demais análises.

3.2.2 Planejamento experimental

A metodologia do planejamento fatorial de experimentos foi utilizada para avaliar as influências da massa do leito e da potência de aquecimento da caldeira sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*. Os níveis das variáveis independentes investigadas neste trabalho podem ser observados na Tabela 1, sendo que os valores máximos e mínimos foram definidos de acordo com a capacidade do equipamento.

Tabela 1 – Níveis das variáveis independentes da extração por arraste a vapor.

Variável	**Nível**		
	-1	**0**	**1**
Massa do leito (g)	100	150	200
Potência (W)	160	280	400

Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento experimental, no qual foi explorado um Delineamento de Face Centrada com 11 ensaios da extração por arraste a vapor, composto por um planejamento fatorial completo (2^2), incluindo três repetições no ponto central.

Tabela 2 – Planejamento experimental da extração por arraste a vapor.

Ensaio	**Massa do leito (g)[1]**	**Potência (W)[1]**
1	100 (-1)	160 (-1)
2	200 (+1)	160 (-1)
3	100 (-1)	400 (+1)
4	200 (+1)	400 (+1)
5	100 (-1)	280 (0)
6	200 (+1)	280 (0)
7	150 (0)	160 (-1)
8	150 (0)	400 (+1)
9	150 (0)	280 (0)
10	150 (0)	280 (0)
11	150 (0)	280 (0)

Fonte: Dados da pesquisa.
Nota:[1]Valores codificados entre parênteses.

Todos os ensaios apresentados na Tabela 2 foram realizados em ordem aleatória. Os dados experimentais foram analisados com o auxílio do *software Protimiza Experimental Design*®, utilizando um nível de significância de 5%. Para determinar o tempo de extração, foi realizado um ensaio de destilação por arraste a vapor na massa do leito de 200 g e potência de aquecimento de 160 W, ou seja, nas condições teóricas de maior tempo de extração. Durante a realização dos experimentos cinéticos, foram utilizados vários frascos para a coleta do óleo essencial ao longo do tempo, em intervalos de 30, 60, 120 minutos até o final da extração (6 horas).

Os efeitos significativos das variáveis independentes do processo foram calculados e com esses resultados foram determinados os coeficientes de regressão $(\beta_0, \beta_1, \beta_{11}, \beta_2, \beta_{22}, \beta_{12})$ do modelo codificado (Equação 4).

$$Y_{ext} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{11} {x_1}^2 + \beta_2 x_2 + \beta_{22} {x_2}^2 + +\beta_{12} x_1 x_2 \qquad (4)$$

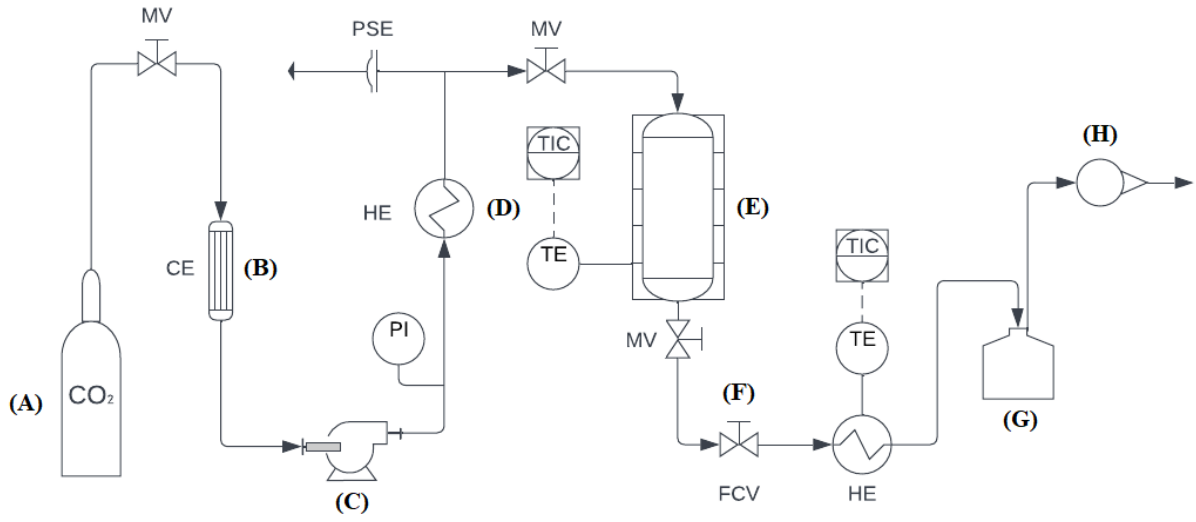
A Equação 4 é um modelo polinomial de segunda ordem e relaciona as respostas do processo de extração (Y_{ext}) com as variáveis independentes: massa do leito (x_1) e potência de aquecimento (x_2), que foram codificadas de acordo com Tabela 1. Para analisar a qualidade de ajuste dos modelos, a Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada. Caso o modelo seja válido,

foram obtidas as superfícies de resposta e curvas de nível para determinação das condições ótimas da extração por arraste a vapor.

3.3 Extração com fluido supercrítico

O processo de extração com CO_2 supercrítico foi realizado no equipamento da *Singularity Extraction Technologies* (modelo PD-Basic-2213-CLP), utilizando o vaso de 100 mL (Figura 6). O CO_2 (99,985%, Oxilumen) oriundo de um reservatório (A) é resfriado em um banho de refrigeração (B), antes de ser pressurizado através de uma bomba de alta pressão (C), a fim de atingir a pressão necessária no processo. O solvente é aquecido através de um trocador de calor (D) e encaminhado para alimentar o vaso de extração encamisado (E). Com as condições de temperatura e pressão estabelecidas nas condições supercríticas, o solvente supercrítico passa através de um leito fixo de sólidos (frutos empacotados no vaso), seguido da separação do extrato na válvula micrométrica (F). O extrato foi coletado no frasco de coleta (G) e a vazão do CO_2 foi medida em um rotâmetro (H). O rendimento dos extratos obtidos foi determinado com base na massa de extrato recuperada em relação à massa de amostra inicialmente adicionada no vaso extrator.

Figura 6 – Esquema do sistema de extração por fluido supercrítico.



Legenda: (A): Cilindro de CO_2; (B): Banho de refrigeração; (C): Bomba de alta pressão; (D): Trocador de calor; (E): Coluna de extração; (F): Válvula micrométrica; (G): Frasco de coleta; (H): Rotâmetro.
Notas: MV – Válvula manual;
HE – Trocador de calor;
TE – Elemento de temperatura;
PI – Indicador de pressão;
TIC – Controlador e indicador de temperatura;
FCV – Válvula controladora de fluxo.

As condições ótimas utilizadas no processo de extração foram determinadas por Silva (2017): pressão de 300 bar; temperatura de 60 °C; massa específica do CO_2 de 0,831 g/cm^3; vazão média de CO_2 de aproximadamente 10 g/min; e razão entre massa de solvente e a massa seca da matéria-prima (S/F) de aproximadamente 70, com isso, garantindo taxas de extração insignificantes ao final de todas as extrações.

3.4 Análises cromatográficas

As amostras de óleo essencial e extrato supercrítico foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso (Varian 4000, modelo CP-3800) com espectrômetro de massas (Varian 4000, modelo CP-8400), operando com ionização de elétrons (70 eV) e analisador do tipo quadrupolo linear. Antes de cada análise, todas as amostras foram preparadas através da diluição da amostra em acetato de etila, obtendo a concentração final de 10 mg/mL. O gás de arraste usado foi o hélio, com vazão na coluna de 1 mL/min. O injetor estava na temperatura de 220 °C e o detector de 250 °C. A coluna capilar utilizada foi a HP-5MS® (5% fenil e 95% dimetilpolissiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura de filme) com programação linear de temperatura do forno de 60 a 240 °C e taxa de aquecimento de 3 °C/min (ADAMS, 2007). Para a injeção das amostras no sistema, foi utilizado um injetor automático que inseria no sistema alíquotas de 1 μL de cada amostra com divisão de fluxo de 30:1. Para a identificação dos compostos das amostras extraídas foi realizada a comparação de espectros de massas obtidos e os encontrados na literatura (ADAMS, 2007).

3.5 Atividade antiparasitária

O óleo essencial obtido nas condições ótimas de extração e o extrato supercrítico foram avaliados em relação as suas atividades antiparasitárias, sendo os ensaios realizados no Instituto Adolfo Lutz com a colaboração do Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

3.5.1 Cultura de parasitas

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em células LLC-MK2 em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino, à temperatura de 37 °C em estufa com 5% CO_2 (KESPER *et al*., 2000).

3.5.2 Determinação *in vitro* da atividade antiparasitária e da concentração inibitória 50% (CI_{50}) do óleo essencial e extrato supercrítico

O óleo essencial e extrato supercrítico foram dissolvidos em MeOH (não ultrapassando a concentração de 0,5% para não causar danos aos parasitas), diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas em diferentes concentrações, com o objetivo de se determinar as respectivas $CI_{50.}$ As formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas no primeiro dia da cultura de células LLC-MK2 (células de rins de macacos rhesus) foram aplicadas na concentração de $1x10^6$/poço em placas de 96 poços contendo os diferentes compostos em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa de CO_2 (5%) por 24 horas e a viabilidade dos tripomastigotas foi determinada pelo método MTT (LANE *et al*., 1996). O fármaco benznidazol foi usado como controle positivo do ensaio (100% morte).

A viabilidade dos parasitas foi realizada através da observação de sua morfologia e motilidade por microscópio óptico e também através da atividade oxidativa mitocondrial, por meio de incubação com 20 μL de MTT, por 4 horas, seguida por incubação com 80 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS). Após 24 horas, o sobrenadante foi lido a 550 nm em leitor de placas (*Multiskan reader* 30®).

3.5.3 Determinação da citotoxicidade

Com o objetivo de se determinar a toxicidade dos compostos com comprovada atividade antiparasitária, foram utilizadas células de mamíferos LLC-MK2, cultivadas conforme descrito anteriormente e aplicadas na concentração de $4x10^4$/poço em placas de 96 poços, contendo os diferentes compostos diluídos serialmente em meio RPMI-1640. As placas foram incubadas por um período de 48 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 e a viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico com MTT.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse tópico está apresentando os resultados das metodologias de extração por arraste a vapor, extração por fluido supercrítico e análises de atividade antiparasitária.

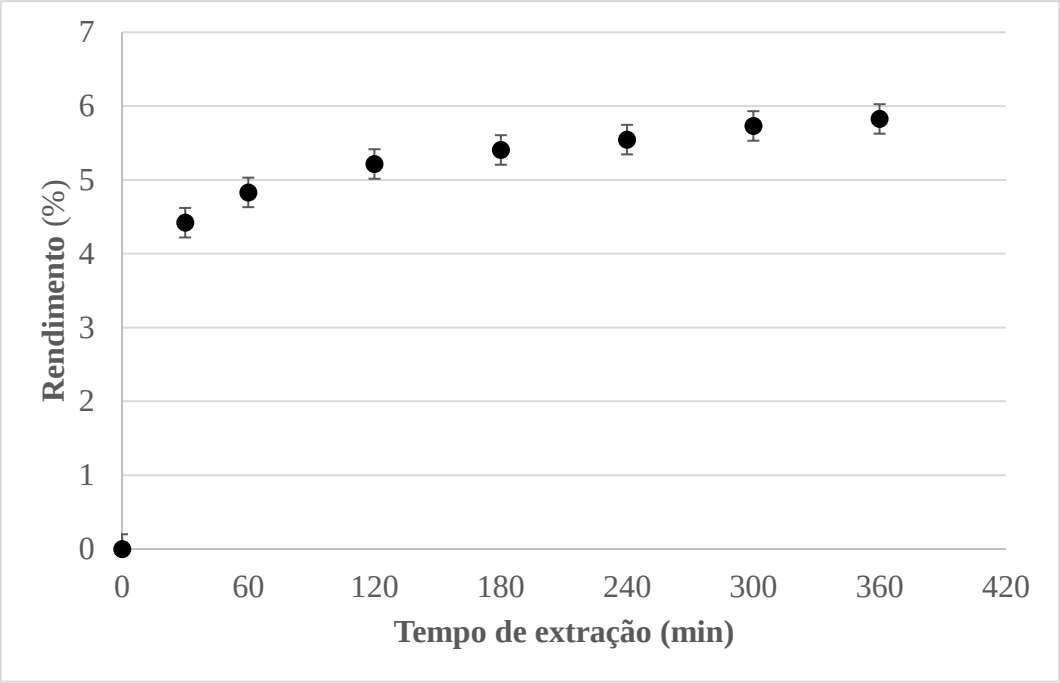
4.1 Extração por arraste a vapor

Os resultados do processo de extração por arraste a vapor foram divididos de acordo com a definição do tempo de extração, a composição química do óleo essencial, os efeitos das condições operacionais e a otimização.

4.1.1 Definição do tempo de extração

A Figura 7 representa a cinética da extração por arraste a vapor realizada com o ensaio 2 do planejamento experimental (Tabela 2), ou seja, ensaio de maior massa de leito e menor potência de aquecimento e que teoricamente apresentaria o maior tempo de extração.

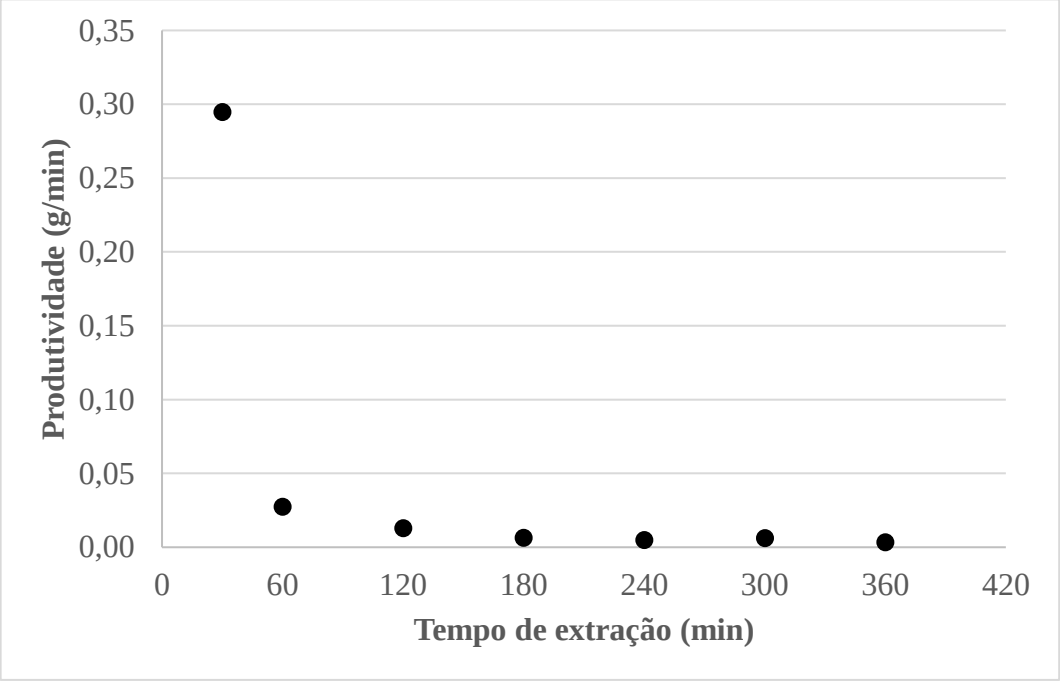
Figura 7 – Rendimento da extração por arraste a vapor (desvio padrão de 0,2%) ao longo do tempo para o ensaio 2 (200 g e 160 W).



Fonte: Dados da pesquisa.

A cinética da extração (Figura 7) apresentou um comportamento típico de processos de destilação por arraste a vapor, com duas etapas características (ZHANG *et al.*, 2020; ROMDHANE; TIZAOUI, 2005). Na etapa inicial extração, chamada de *fast oil distillation*, uma grande quantidade de óleo essencial é extraída em um tempo muito pequeno. Em 30 minutos de extração, segundo ponto da curva apresentada na Figura 7, cerca de 76% da massa total do óleo essencial foi extraída. Segundo Silva (2017) durante a fase inicial acontece a extração do soluto presente na superfície externa das partículas, rompidas pelo processo de moagem, contendo o óleo essencial. Já durante a etapa final da extração, denominada de *slow oil distillation*, a extração é controlada pela difusão do óleo essencial (presente em reservatórios intactos) no interior das partículas para a superfície delas, seguida pela destilação do óleo essencial presente na superfície. Portanto, ao final da extração todo o óleo foi extraído do interior das partículas, sendo o processo controlado pela difusão do óleo essencial presente no interior da matéria-prima.

Figura 8 – Produtividade da extração por arraste a vapor ao longo do tempo para o ensaio 2 (200 g e 160 W).



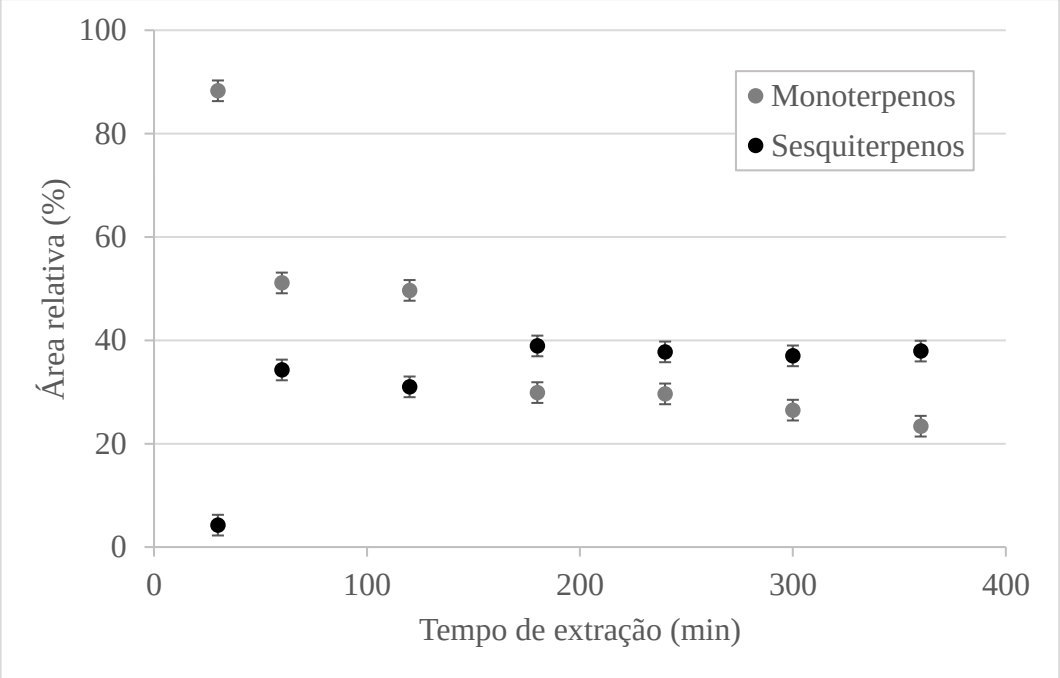
Fonte: Dados da pesquisa.

A definição do tempo ideal para a extração por arraste a vapor depende da finalidade para a qual o óleo essencial será utilizado. Assim, como observado na Figura 7, se o objetivo for a obtenção dos maiores rendimentos, períodos de extração de 2 a 5 horas são suficientes

para garantir a exaustão da matéria-prima, uma vez que cerca de 90 a 98% do óleo essencial (obtido em 6 h de extração) é extraído. Além disso, de acordo com a Figura 8, a produtividade da extração por arraste a vapor é praticamente nula após 2 horas. Com isso, para a realização dos ensaios de 1 a 11 da Tabela 2 foi definido um tempo de 2 horas do processo.

De outro modo, se o objetivo for a extração da maior quantidade de sesquiterpenos, períodos mais longos de extração são recomendados para a extração por arraste a vapor, conforme observado na Figura 9, que mostra os perfis cromatográficos do óleo essencial obtido ao longo do tempo de extração, utilizando 200 g de massa de leito e 160 W de potência de aquecimento. Esses perfis foram semelhantes aos encontrados por Barbosa *et al.* (2007), que estudaram a cinética da hidrodestilação dos frutos da *S. terebinthifolius*, e relataram que de forma geral, nos primeiros 20 minutos do processo, os monoterpenos foram quase que completamente extraídos.

Figura 9 – Variação do teor de monoterpenos e sesquiterpenos por CG-EM (área relativa e desvio padrão de 2%) ao longo do tempo de extração do ensaio 2 (Tabela 2).



Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados quantitativos da composição química do óleo essencial ao longo do tempo de extração por arraste a vapor estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Variação na composição química (CG-EM) ao longo do tempo de extração por arraste a vapor para o ensaio com 200 g de massa de leito e 160 W de potência de aquecimento.

		Área relativa (%)[2]						
Composto	**t_R[1]**	**30 min**	**60 min**	**120 min**	**180 min**	**240 min**	**300 min**	**360 min**
α-pineno	6,0	16,23	6,83	5,92	3,58	3,36	2,91	2,28
Sabineno	7,3	1,15	-	-	-	-	-	-
β-pineno	7,6	1,82	1,00	0,97	0,50	0,56	0,44	-
Δ^3-careno	8,2	35,16	22,36	21,78	12,29	12,37	11,15	9,86
α-terpineno	8,3	19,21	10,63	10,26	6,91	6,44	6,01	5,62
o-cimeno	8,8	3,87	2,97	3,12	1,94	2,08	1,82	1,79
Limoneno	9,0	13,03	8,81	9,19	5,53	5,86	5,01	4,69
n.i.[3]	9,1	3,60	3,20	2,84	1,83	1,52	1,71	1,51
Terpinoleno	11,1	1,68	1,47	1,55	1,08	1,05	0,98	0,93
δ-elemeno	21,7	-	1,47	1,31	1,38	1,48	1,52	1,64
Cariofileno	24,0	-	1,35	-	1,46	1,61	1,59	1,80
α-himachaleno	25,2	1,83	8,15	6,80	7,20	7,41	7,69	7,72
n.i.[3]	26,7	-	-	-	1,17	1,22	1,05	0,99
n.i.[3]	27,5	-	-	-	-	1,09	1,16	1,31
Germacreno D	27,7	2,41	17,91	14,10	14,19	13,26	11,90	12,00
n.i.[3]	28,2	-	-	-	1,32	1,44	1,44	1,54
n.i.[3]	29,0	-	-	-	-	-	0,82	0,90
n.i.[3]	29,2	-	1,62	1,69	2,30	3,05	3,09	3,49
α-farneseno	30,4	-	5,39	8,80	12,58	11,83	12,18	12,58
δ-cadineno	30,8	-	-	-	1,21	1,27	1,17	1,20
n.i.[3]	32,9	-	-	-	0,86	-	0,91	0,91
Germacreno B	33,4	-	-	-	0,89	0,91	0,96	0,98
γ-eudesmol	34,6	-	6,84	9,72	2,89	2,93	3,13	3,42
n.i.[3]	35,0	-	-	-	14,14	14,67	15,46	16,54
n.i.[3]	36,7	-	-	-	1,52	1,48	1,67	1,69
n.i.[3]	38,6	-	-	1,96	3,22	3,11	3,39	3,72
n.i.[3]	39,1	-	-	-	-	-	0,85	0,89

Fonte: Dados da pesquisa.
Notas: [1]Tempo de retenção;
[2]Porcentagem relativa obtida a partir da área do pico dos cromatogramas;
[3]Não identificado.

Conforme observado na Tabela 3, durante a extração por arraste a vapor, cada classe de terpenos apresentou sua própria cinética de extração. Em geral, o teor de monoterpenos diminuiu com o tempo de extração, e consequentemente, o teor de sesquiterpenos aumentou ao longo do tempo (Figura 9), tendência mencionada por Barbosa *et al.* (2007) que estudaram a cinética da hidrodestilação dos frutos da *S. terebinthifolius*. Segundo os autores, os monoterpenos foram quase totalmente extraídos durante os primeiros 20 minutos da hidrodestilação, algo que indica a influência da volatilidade dos compostos durante o processo. De acordo com Chatzopoulou e Katsiotis (1995), durante a fase inicial da hidrodestilação, os monoterpenos são destilados de forma mais rápida devido à sua volatilidade relativamente elevada. Outra justificativa para a variação do teor de terpenos durante o processo, seria de que os monoterpenos e sesquiterpenos estão localizados em diferentes estruturas de armazenamento, conforme mencionado por Mettal *et al.* (1988). Deste modo, o soluto de fácil acesso é composto majoritariamente por monoterpenos, enquanto o de difícil acesso é composto por sesquiterpenos.

4.1.2 Composição química do óleo essencial

A CG-EM fornece dados quantitativos da composição química do óleo essencial obtido durante 2 horas de extração, podendo ser observados na Tabela 4, referente aos ensaios de 1 a 11 da Tabela 2.

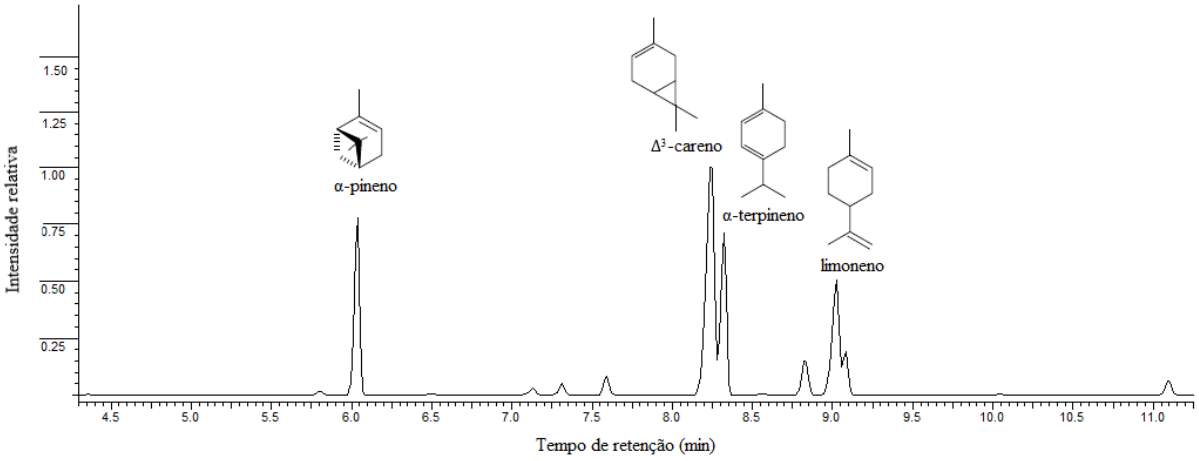
Tabela 4 – Composição química do óleo essencial (CG-EM) dos frutos da *S. terebinthifolius* para cada ensaio do planejamento experimental (ensaios de 1 a 11) nas condições operacionais da Tabela 2.

		Área relativa (%)[2]										
Composto	**t_R[1]**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
α-pineno	6,0	14,44	14,24	14,20	13,99	14,89	13,75	14,69	13,28	14,30	14,05	12,87
Sabineno	7,3	-	-	-	-	0,98	1,01	1,02	-	1,05	1,03	-
β-pineno	7,6	1,62	1,64	1,71	1,59	1,55	1,60	1,59	1,56	1,65	1,67	1,65
Δ^3-careno	8,2	32,88	32,08	30,81	31,66	32,34	32,96	32,67	30,75	31,65	32,21	32,23
α-terpineno	8,3	17,48	17,43	15,31	15,74	15,16	15,65	15,47	14,97	16,06	15,55	15,20
o-cimeno	8,8	3,77	3,65	3,54	3,34	3,50	3,59	3,52	3,62	3,69	3,69	3,54
Limoneno	9,0	13,07	13,92	13,40	13,49	13,12	13,20	13,61	12,79	13,28	13,15	14,11
n.i.[3]	9,1	4,11	3,21	3,74	3,21	3,06	3,84	3,77	3,76	4,01	3,21	3,34
Terpinoleno	11,1	1,58	1,63	1,51	1,55	1,53	1,57	1,53	1,47	1,56	1,53	1,61
α-himachaleno	25,2	2,66	3,00	3,30	3,21	3,12	3,03	2,94	3,51	3,04	3,05	3,41
Germacreno D	27,7	4,61	5,39	6,09	5,96	5,65	5,47	5,09	6,60	5,28	5,44	6,23
α-farneseno	30,4	1,80	1,73	2,84	2,90	2,37	2,03	1,94	3,58	2,04	2,50	2,73
γ-eudesmol	35,0	1,99	2,09	3,53	3,34	2,73	2,28	2,16	4,11	2,39	2,92	3,07

Fonte: Dados da pesquisa.
Notas:
[1]Tempo de retenção;
[2]Porcentagem relativa obtida a partir da área do pico dos cromatogramas;
[3]Não identificado.

A análise por CG-EM permitiu a detecção de 13 compostos no óleo essencial dos frutos da *S. terenbinthifolius* (Tabela 4), sendo que 12 deles foram identificados, o que representa em média, 96% da composição química do óleo essencial. Os compostos majoritários do óleo essencial foram o Δ^3-careno (30,75% - 32,96%), *α*-terpineno (14,97% - 17,48%), *α*-pineno (12,87% - 14,89), limoneno (12,79% - 13,92%) e germacreno D (4,61% - 6,60%). Esses estão presentes em cerca de 80% de composição química do óleo essencial. A Figura 10 apresenta o cromatograma do óleo essencial obtido nas condições operacionais do ponto central do planejamento (ensaio 9 da Tabela 2), indicando os monoterpenos majoritários presentes no óleo essencial.

Figura 10 – Recorte do cromatograma (CG) e estrutura dos monoterpenos majoritários do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* obtido nas condições operacionais do ponto central do planejamento experimental (ensaio 9 da Tabela 2).



Fonte: Dados da pesquisa.

Dentre os compostos identificados, é importante ressaltar que o germacreno D e o *α*-himachaleno foram os sesquiterpenos majoritários no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*. Os monoterpenos e sesquiterpenos encontrados neste trabalho foram similares, com pequenas variações, aos resultados encontrados em estudos anteriores com o óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*. Silva (2007) cita que os compostos majoritários identificados em seu trabalho foram: Δ^3-careno, *α*-felandreno, limoneno, *α*-pineno e germacreno D. Enquanto que Barbosa *et al.* (2007), os majoritários foram Δ^3-careno, *α*-felandreno, *β*-felandreno, *α*-pineno, cariofileno e germacreno D. Essa variação na composição química pode ser justificada pela alta complexidade química dos óleos essenciais, que pode ser influenciada por fatores como o local de colheita da matéria-prima e condições climáticas, a variabilidade genética da espécie, as etapas de pré-tratamento da matéria-prima, o tipo de técnica de extração aplicada e as condições operacionais dos processos de extração (BANDONI, 2003; CHAMORRO *et al.*, 2012; KARAM *et al.*, 2016).

4.1.3 Efeitos das condições operacionais

Os resultados de rendimento da extração e teores de monoterpenos e sesquiterpenos no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* de cada um dos ensaios do DFC podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições operacionais da extração por arraste a vapor, rendimento da extração em base seca e teor de terpenos presentes no óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*.

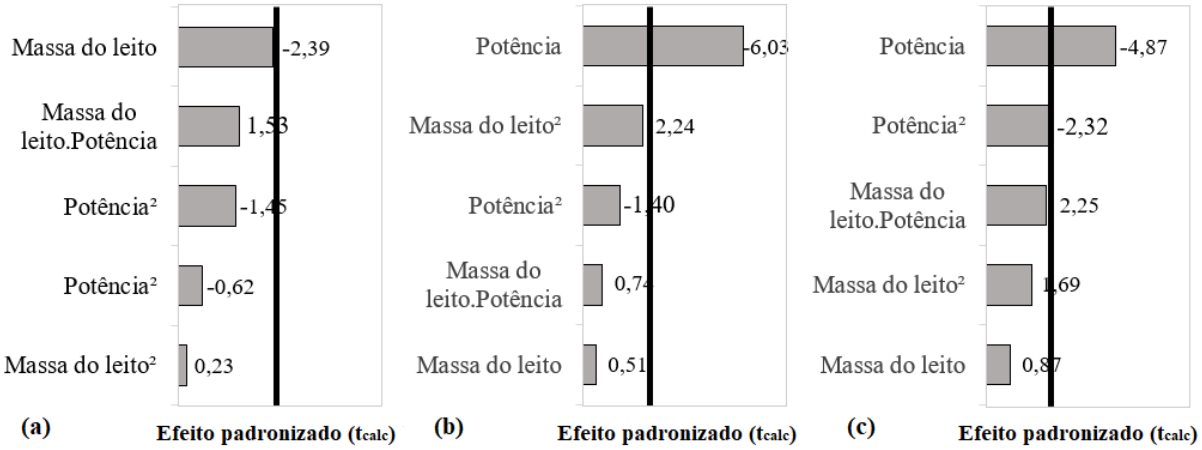
Ensaio	Massa do leito (g)	Potência (W)	Rendimento da extração (%)	Teor de monoterpenos (%)[1]	Teor de sesquiterpenos (%)[1]
1	100	160	5,84	81,07	9,06
2	200	160	5,73	80,94	10,12
3	100	400	5,93	76,95	12,23
4	200	400	5,40	78,04	12,07
5	100	280	5,87	79,57	11,14
6	200	280	4,53	79,75	10,53
7	150	160	5,62	80,58	9,97
8	150	400	6,05	74,82	13,69
9	150	280	5,64	79,55	10,36
10	150	280	5,76	79,19	10,99
11	150	280	5,79	77,68	12,37

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: [1]Porcentagem relativa obtida a partir da área do pico do cromatograma.

De acordo com a Tabela 5, o rendimento da extração em base seca variou de 4,5% (200 g de massa de leito e 280 W de potência de aquecimento) a 6,1% (150 g e 400 W), com desvio padrão de 0,1%. O teor de monoterpenos presentes no óleo essencial variou de 75% (150 g e 400 W) a 81% (100 g e 160 W), com desvio padrão de 1%. Já o teor de sesquiterpenos, variou de 9% (100 g e 160 W) a 14% (150 g e 400 W), com desvio padrão de 1%. Os resultados indicam que o rendimento e qualidade do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* dependem das condições operacionais do processo de extração por arraste a vapor. Deste modo, os efeitos padronizados da massa de leito e potência de aquecimento sobre o rendimento em base seca da extração (Figura 11a), o teor de monoterpenos (Figura 11b) e de Δ^3-careno (Figura 11c) são apresentados nos diagramas de Pareto da Figura 11.

Figura 11 – Diagramas de Pareto para as respostas: (a) rendimento em base seca; (b) teor de monoterpenos; (c) teor de Δ^3-careno no óleo essencial.



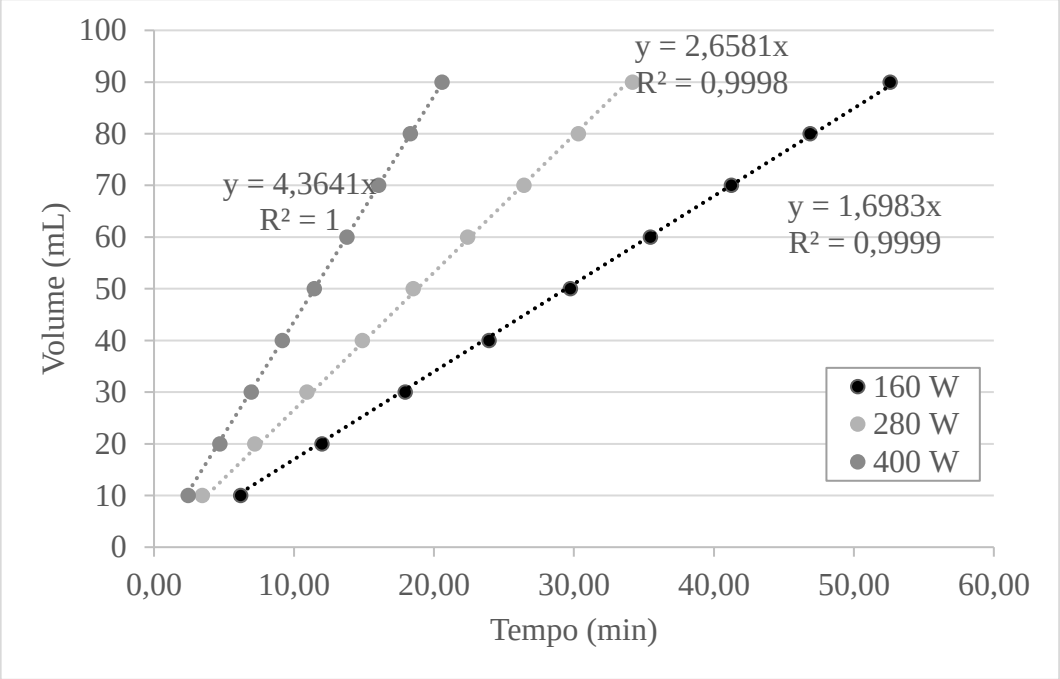
Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme a Figura 11, apenas a potência apresentou efeito estatisticamente significativo sobre o teor de monoterpenos e de Δ^3-careno do óleo essencial. Esse efeito está de acordo com os resultados descritos em Wang *et al.* (2007), na otimização da extração da pectina assistida por micro-ondas de bagaço de maça; e Gomes (2018), na obtenção do extrato seco padronizado à base de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Assim como no presente trabalho, Kallel *et al.* (2019) avaliou a influência das condições operacionais na destilação por arraste, mas para a extração da *Cinnamomum zeylanicum* Blume.

Os efeitos negativos da potência de aquecimento sobre os teores de monoterpenos e Δ^3-careno indicam que um aumento da potência, do nível mais baixo para o mais alto, ocasionou uma diminuição no teor de monoterpenos, bem como o teor de Δ^3-careno. De acordo com a Figura 12, a vazão de vapor das potências de 160, 280 e 400 W foi de 1,70, 2,66 e 4,36 mL/min, respectivamente. Com isso, quanto maior a potência de aquecimento maior é a vazão de vapor d'água (4,36 mL/min), e consequentemente, há mais compostos extraídos. Com o decorrer da extração há um aumento na quantidade de sesquiterpenos, o que reduz o teor relativo de monoterpenos. Por exemplo, o ensaio 8, em que foi utilizado 150 g de massa de leito e 400 W de potência de aquecimento, houve a maior extração de sesquiterpenos e menor rendimento de monoterpenos (Tabela 5). Por sua vez, quando utilizou uma massa de leito de 100 g e potência de aquecimento de 160 W (ensaio 1), houve a maior extração de monoterpenos e menor de sesquiterpenos. De acordo com a Tabela 4, os ensaios 6 (200 g e 280 W), 1 (100 g e 160 W) e 7 (150 g e 160 W) apresentaram 32,96%, 32,88% e 32,67% de teor de Δ^3-careno,

respectivamente. O ensaio 6 apresenta maior teor de Δ^3-careno e difere quanto a potência dos ensaios 1 e 7, e isso pode ter relação com seu rendimento de extração estar muito abaixo dos resultados obtidos (Tabela 5).

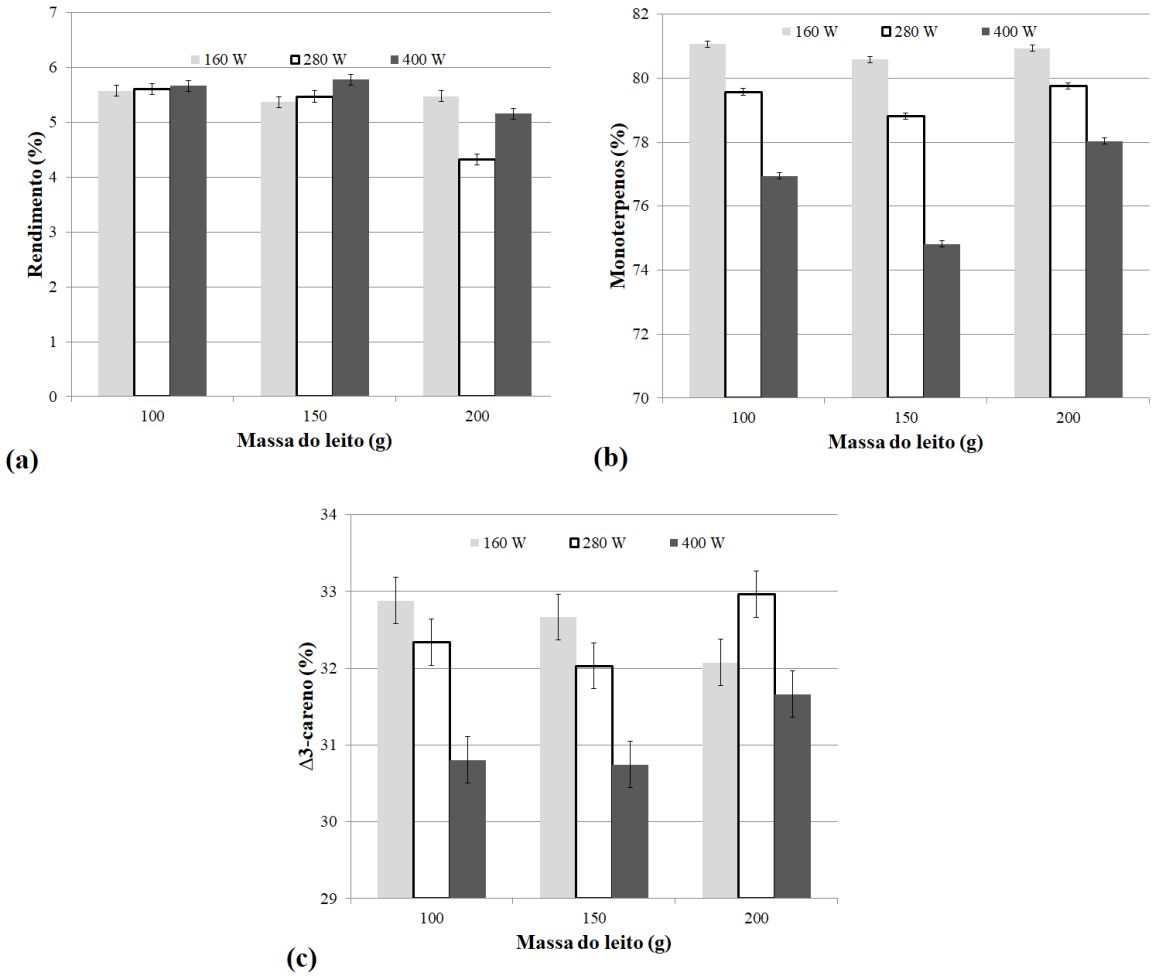
Figura 12 – Vazão de vapor condensado ao longo do tempo para as potências de aquecimento de 160, 280 e 400 W.



Fonte: Dados da pesquisa.

Para melhor visualização dos efeitos da potência discutidos anteriormente, na Figura 13, são apresentados o rendimento em base seca, o teor de monoterpenos e o teor de Δ^3-careno no óleo essencial em função das condições experimentais do planejamento utilizado neste trabalho (Tabela 2).

Figura 13 – Repostas do processo de arraste a vapor em função das condições operacionais de extração (a) rendimento em base seca, desvio padrão 0,1%; (b) teor de monoterpenos (área relativa), desvio padrão de 0,1%; e (c) teor de Δ^3-careno (área relativa), desvio padrão 0,3%.



Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme observado na Figura 13, os efeitos da potência de aquecimento foram mais evidentes para os teores de monoterpenos e do componente majoritário, o Δ^3-careno. A massa do leito não apresentou influência nos rendimentos e teores. O que indica que os teores de monoterpenos e do componente majoritário é mais pronunciado em menores potências de aquecimento. Assim, de acordo com os diagramas de Pareto da Figura 11, a potência do equipamento apresentou efeitos estatisticamente significativos sobre os teores de monoterpenos e de Δ^3-careno.

4.1.4 Otimização

Com auxílio do *software Protimiza Experimental Design*® e com os dados da Tabela 5 foi avaliado o ajuste de modelos matemáticos (Equação 4) para o rendimento em base seca (Equação 5), para o teor de monoterpenos (Equação 6) e para o teor de Δ^3-careno no óleo essencial (Equação 7) em função da massa seca do leito (x_1) e potência de aquecimento da caldeira (x_2). Essas variáveis foram codificadas de acordo com a Tabela 1.

$$Rendimento = 5{,}64 - 0{,}33x_1 - 0{,}31{x_1}^2 + 0{,}03x_2 + 0{,}33{x_2}^2 - 0{,}10x_1x_2 \qquad (5)$$

$$Teor_{monoterpenos} = 78{,}67 + 0{,}18x_1 + 1{,}23{x_1}^2 - 2{,}15x_2 - 0{,}77{x_2}^2 + 0{,}32x_1x_2 \qquad (6)$$

$$Teor_{\Delta^3-\text{careno}} = 32{,}10 + 0{,}13x_1 + 0{,}40{x_1}^2 - 0{,}75x_2 - 0{,}55{x_2}^2 + 0{,}42x_1x_2 \qquad (7)$$

As Tabelas 6, 7 e 8 apresentam os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para os modelos e contribuem para avaliar a qualidade de ajustes dos modelos codificados.

Tabela 6 – ANOVA do modelo (Equação 5) para o rendimento em base seca da extração por arraste a vapor.

Fonte de Variação	**Soma dos Quadrados**	**Graus de Liberdade**	**Quadrado Médio**	F_{calc}	F_{tab}	R^2
Regressão	1,107	5	0,221	1,937	5,050	0,660
Resíduos	0,572	5	0,114			
Falta de Ajuste	0,559	3	0,186	29,579	19,164	
Erro Puro	0,013	2	0,006			
Total	1,679	10				

Fonte: Dados da pesquisa.
Legenda: F_{cal}: Distribuição de Fischer (calculada).
F_{tab}: Distribuição de Fischer (tabelada).
R^2: Coeficiente de determinação.

Tabela 7 – ANOVA do modelo (Equação 6) para o teor de monoterpenos da extração por arraste a vapor.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	F_{tab}	R^2
Regressão	32,721	5	6,544	8,577	5,050	0,896
Resíduos	3,815	5	0,763			
Falta de Ajuste	1,955	3	0,652	0,701	19,164	
Erro Puro	1,860	2	0,930			
Total	36,536	10				

Fonte: Dados da pesquisa.
Legenda: F_{cal}: Distribuição de Fischer (calculada).
F_{tab}: Distribuição de Fischer (tabelada).
R^2: Coeficiente de determinação.

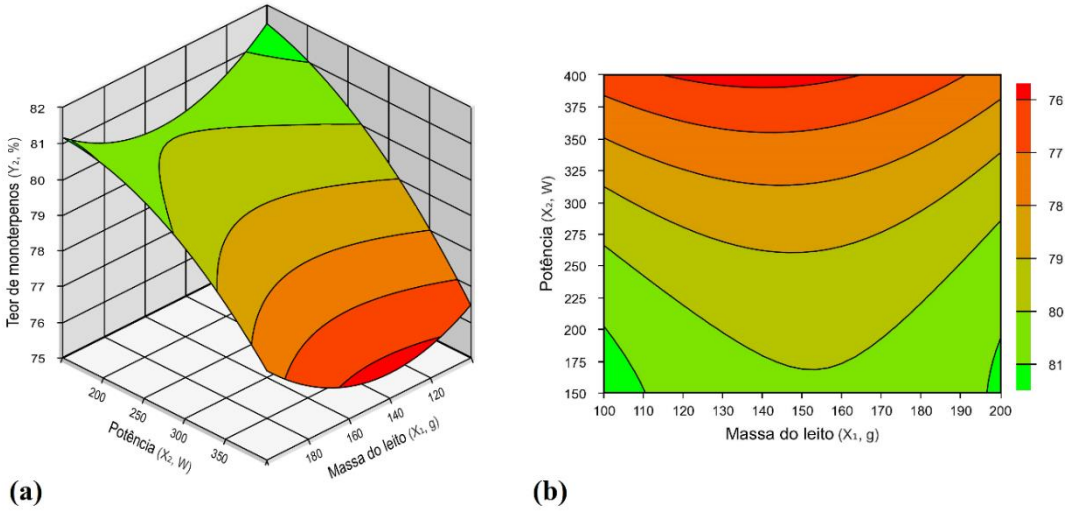
Tabela 8 – ANOVA do modelo (Equação 7) para o teor de Δ^3-careno da extração por arraste a vapor.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	F_{tab}	R^2
Regressão	5,146	5	1,029	7,239	5,050	0,879
Resíduos	0,711	5	0,142			
Falta de Ajuste	0,471	3	0,157	1,308	19,164	
Erro Puro	0,240	2	0,120			
Total	5,856	10				

Fonte: Dados da pesquisa.
Legenda: F_{cal}: Distribuição de Fischer (calculada).
F_{tab}: Distribuição de Fischer (tabelada).
R^2: Coeficiente de determinação.

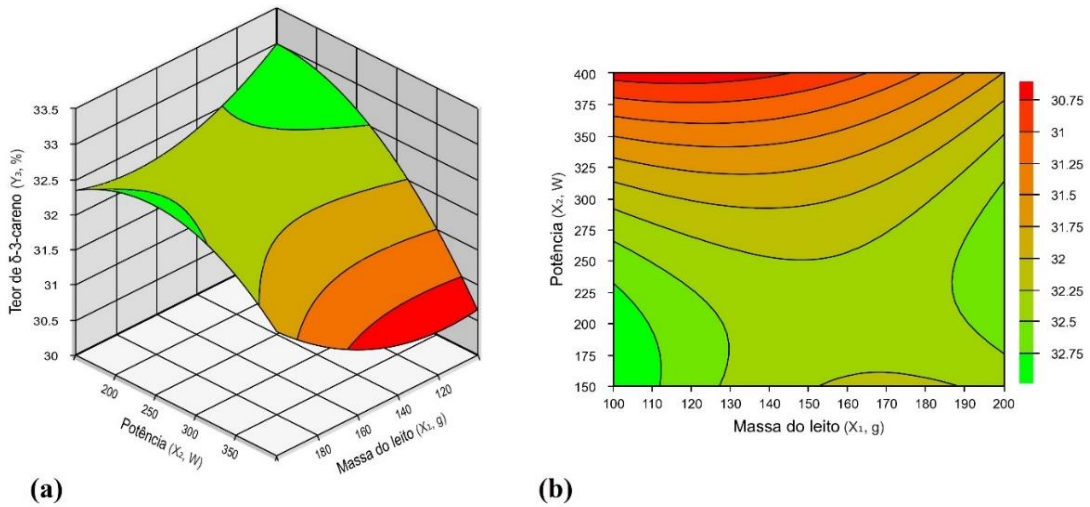
Conforme os dados apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8, é possível observar que os modelos que descreve o teor de monoterpenos (Equação 6) e de Δ^3-careno (Equação 7) podem ser considerados como válidos, pois o coeficiente de determinação (R^2) está próximo a 0,9; o F_{cal} de regressão em relação aos resíduos é maior que o F_{tab}; e o F_{cal} da falta de ajuste em relação ao erro puro é inferior ao F_{tab}. Dessa maneira, ao ajustar os dados experimentais da extração por arraste a vapor, os modelos podem ser utilizados para fins preditivos, satisfazendo os requisitos para a construção das superfícies de resposta e curvas de nível (Figuras 14 e 15).

Figura 14 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o teor de monoterpenos em função da massa do leito e potência de aquecimento da extração por arraste a vapor.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 15 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o teor de Δ^3-careno em função da massa do leito e potência de aquecimento da extração por arraste a vapor.



Fonte: Dados da pesquisa.

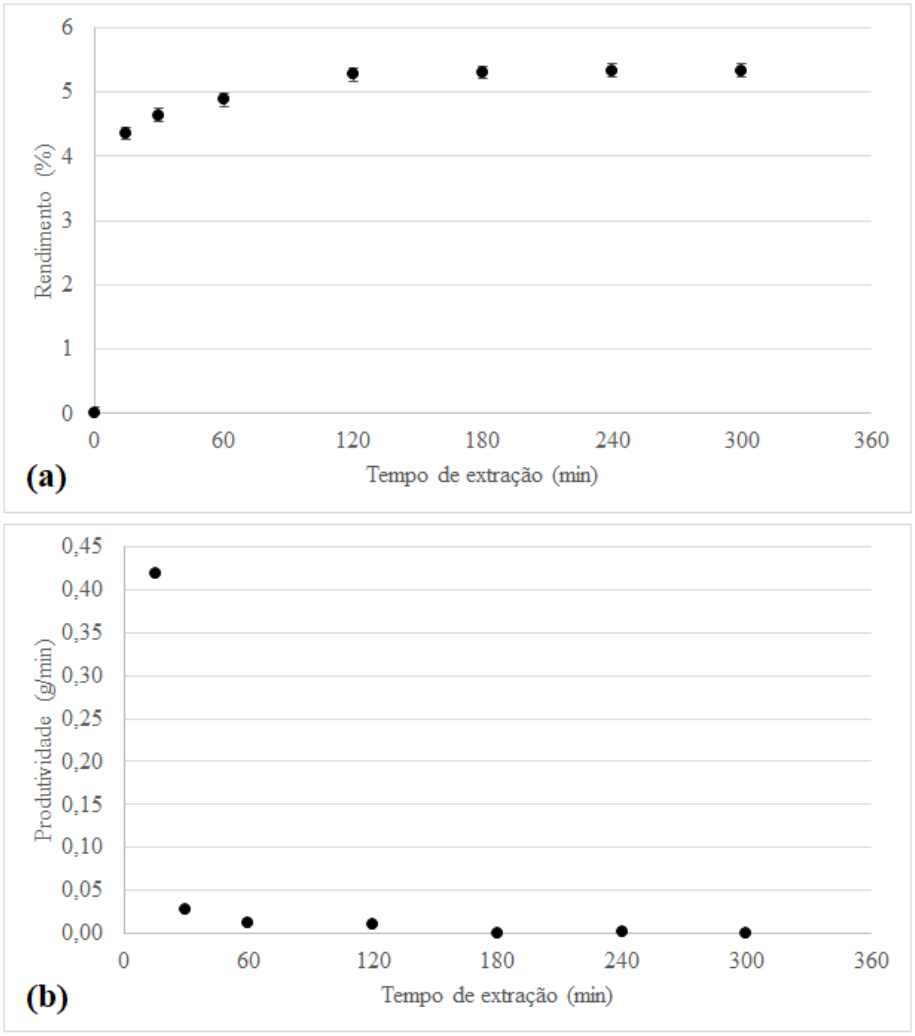
De acordo com as Figuras 14 e 15, o teor de monoterpenos e do componente majoritário (Δ^3-careno) do óleo essencial depende somente da potência de aquecimento da extração por arraste a vapor. Observou-se que um aumento da potência de aquecimento acarreta em uma

diminuição do teor de monoterpenos no óleo essencial, pois em altas potência tem-se uma maior vazão de vapor d'água e assim mais compostos extraídos (por exemplo os sesquiterpenos), o que diminui o teor relativo de monoterpenos (METTAL, 1988).

A definição das condições ótimas para a extração por arraste a vapor depende da finalidade para o qual o óleo essencial será utilizado. Por exemplo, caso a finalidade fosse a obtenção do maior teor de monoterpenos, de acordo com a Figura 14, a configuração ideal do sistema seria na faixa de 196 a 200 g de massa de leito e potência de aquecimento de 150 a 190 W ou de 100 a 110 g e potência de 150 a 200 W. Já se a finalidade fosse a obtenção do maior teor de Δ^3-careno, a configuração ideal do sistema seria na faixa de 100 a 112 g de massa de leito e potência de aquecimento de 150 a 230 W (Figura 15). Como não foi pré-definido um componente alvo neste trabalho, a condição ótima da extração por arraste a vapor foi definida pelo rendimento de óleo essencial. Conforme mostrado na Tabela 5, rendimentos máximos de extração, acima de 5,9%, podem ser obtidos dentro das seguintes faixas ideias de extração: massa de 100 a 150 g de matéria-prima e potência de 400 W. Assim, as condições ótimas do ensaio 8 (150 g, 400 W e 6,05% de rendimento em 2 h de extração) foram selecionadas para prosseguir com o estudo, apresentando aproximadamente 75% de teor de monoterpenos.

A cinética da extração do ponto ótimo (Figura 16) apresentou um comportamento típico de processos de destilação por arraste a vapor, e está de acordo com o que foi discutido no item 4.1.1 sobre a definição do tempo de extração dos ensaios do planejamento experimental. Entretanto, a cinética do ponto ótimo apresentou menor tempo para atingir a exaustão do sistema, isso devido ao aumento da potência de aquecimento.

Figura 16 – Rendimento da extração por arraste a vapor (desvio padrão de 0,1%) (a) e produtividade da extração por arraste a vapor ao longo do tempo (b) do ponto, ensaio 8 da (Tabela 2).

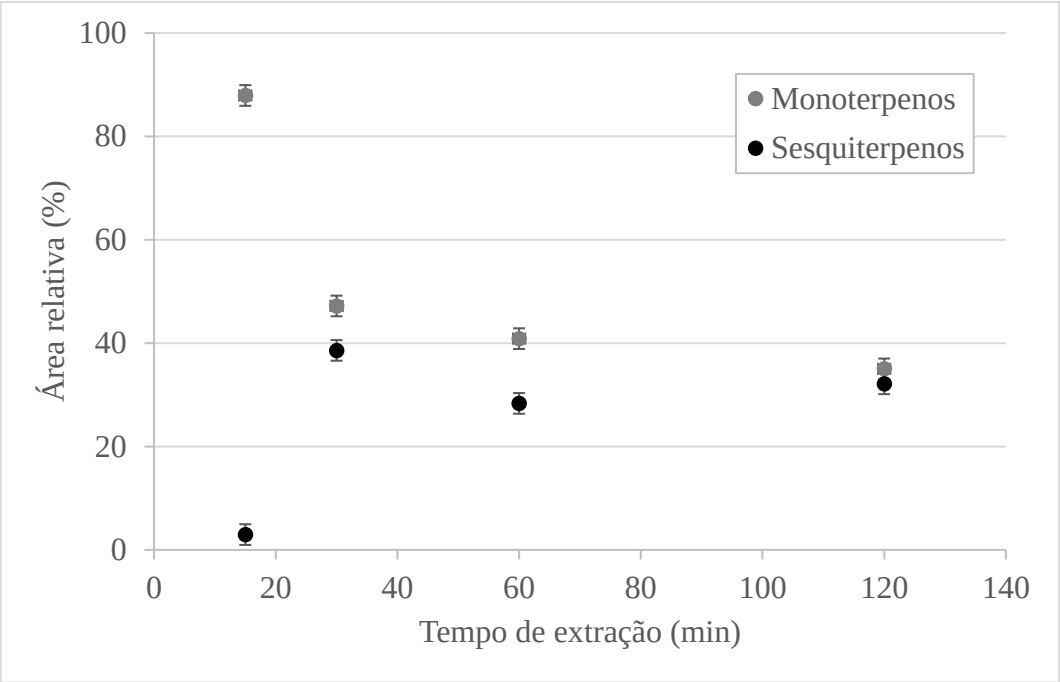


Fonte: Dados da pesquisa.

Como pode-se observar na Figura 16a, se o objetivo for a obtenção dos maiores rendimentos, períodos de extração de 1 a 2 horas são suficientes para garantir a exaustão da matéria-prima nas condições do ponto ótimo (150 g e 400 W), uma vez que cerca de 92 a 99% do óleo essencial é extraído durante esse tempo. De acordo com a Figura 16b, a produtividade da extração por arraste a vapor nas condições do ensaio 8 (Tabela 2) é praticamente nula após 1 hora. De outro modo, se o objetivo for a extração da maior quantidade de sesquiterpenos, períodos mais longos de extração são recomendados para a extração por arraste a vapor,

conforme observado na Figura 17, que mostra os perfis cromatográficos (CG-EM) do óleo essencial obtido ao longo do tempo de extração.

Figura 17 – Variação do teor de monoterpenos e sesquiterpenos por CG-EM ao longo do tempo (área relativa e desvio padrão de 2%) do ensaio 8 (Tabela 2), ponto ótimo.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados quantitativos da composição química do óleo essencial nas condições do ponto ótimo ao longo do tempo de extração por arraste a vapor estão na Tabela 9.

Tabela 9 – Variação na composição química ao longo do tempo de extração por arraste a vapor para o ensaio 8 com 150 g de massa de leito e 400 W de potência de aquecimento.

		Área relativa (%)[1]			
Composto	**t_R (min)[3]**	**15 min**	**30 min**	**60 min**	**120 min**
n.i.[2]	4,5	-	-	-	1,33
α-pineno	6,0	17,99	-	5,57	-
Δ^3-careno	8,2	40,65	26,25	18,78	15,76
α-terpineno	8,3	18,93	13,22	10,76	8,94
o-cimeno	8,8	4,28	3,19	2,85	2,60
Limoneno	9,0	10,36	7,73	5,77	9,18
n.i.[2]	9,0	4,84	2,67	2,84	-
Terpinoleno	11,0	-	-	-	1,14
δ-elemeno	21,7	-	-	-	1,18
α-himachaleno	25,2	-	8,04	5,08	5,58
Germacreno D	27,7	2,96	23,17	12,18	11,59
n.i.[2]	29,2	-	-	2,05	1,99
α-farneseno	30,4	-	7,38	11,08	12,16
δ-cadineno	30,7	-	-	-	1,61
n.i.[2]	32,8	-	-	-	1,33
γ-eudesmol	34,8	-	8,35	16,93	4,64
n.i.[2]	34,9	-	-	-	13,25
n.i.[2]	36,6	-	-	2,45	2,27
n.i.[2]	38,5	-	-	3,67	5,44

Fonte: Dados da pesquisa.
Notas: [1]Porcentagem relativa obtida a partir da área do pico dos cromatogramas;
[2]Não identificado;
[3]Tempo de retenção.

Conforme observado na Tabela 9, durante a extração por arraste a vapor, cada classe de terpenos apresentou sua própria cinética de extração. O teor de monoterpenos diminuiu com o tempo de extração, e consequentemente, o teor de sesquiterpenos aumentou ao longo do tempo (Figura 17), tal tendência está de acordo com os resultados apresentados no item 4.1.1.

A Tabela 10 apresenta a composição química do óleo essencial dos ensaios de validação do ponto ótimo, com condições operacionais do ensaio 8 da Tabela 2 (150 g, 400 W e tempo de extração de 4 horas).

Tabela 10 – Composição química do óleo essencial (CG-EM) dos frutos da *S. terebinthifolius* para a validação do ponto ótimo nas condições operacionais do ensaio 8 (Tabela 2).

Área relativa (%)[1]			
Composto	**1**	**2**	**3**
α-pineno	15,24	14,56	15,73
β-mirceno	1,81	1,85	1,69
Δ^3-careno	38,85	40,35	37,21
α-terpineno	18,91	19,54	19,30
o-cimeno	3,84	4,57	3,83
Limoneno	10,54	11,02	11,97
n.i.[2]	4,24	4,75	4,71
α-himachaleno	2,34	-	1,95
Germacreno D	4,23	3,35	3,60
Total identificado (%)[1]	95,76	95,25	95,29
Monoterpenos (%)[1]	85,35	87,32	85,91
Sesquiterpenos (%)[1]	6,57	3,35	5,55

Fonte: Dados da pesquisa.
Notas: [1]Porcentagem relativa obtida a partir da área nos cromatogramas; [2]Não identificado.

Conforme apresentado na Tabela 10, a quantidade de compostos extraídos nos ensaios de validação foi inferior quando comparada a dos ensaios do planejamento experimental (Tabela 3). Uma hipótese para isso, seria de que houve a degradação de alguns compostos devido ao aumento da temperatura, pois os constituintes dos óleos essenciais serem susceptíveis a sofrer degradação térmica ou hidrólise (STEFFENS, 2010), uma vez que os experimentos de validação foram realizados no tempo até a exaustão do sistema (4 horas).

4.2. Extração por fluido supercrítico

Os rendimentos em base seca e os resultados de CG-EM da extração por fluido supercrítico nas condições operacionais otimizadas de 60 °C e 300 bar, podem ser observados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Rendimento em base seca dos ensaios de extração por fluido supercrítico nas condições de 60 °C e 300 bar.

Ensaio	**Rendimento (%)[1]**
1	9,6
2	8,9
3	9,4
Média	9,3
Desvio padrão	0,4

Fonte: Dados da pesquisa.
Nota: [1]Rendimento em base seca.

Como pode ser observado na Tabela 11, o rendimento em base seca dos ensaios supercríticos variou de 8,9% - 9,6%, com desvio padrão de 0,4%. Quando comparado aos rendimentos dos ensaios de extração por arraste a vapor (Tabela 5), é perceptível que a extração com fluido supercrítico apresentou maiores rendimentos. De acordo com Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007), dependendo das condições de pressão e temperatura da extração com CO_2 supercrítico de plantas aromáticas, pode-se obter maiores rendimentos em relação aos métodos tradicionais, uma vez que a extração com o CO_2 supercrítico realiza a co-extração de substâncias não voláteis, tais como diterpenos, triterpenos, alguns lipídeos e parafinas.

Tabela 12 – Composição química da fração volátil do extrato (CG-EM) obtido pela extração por fluido supercrítico nas condições de 60°C e 300 bar.

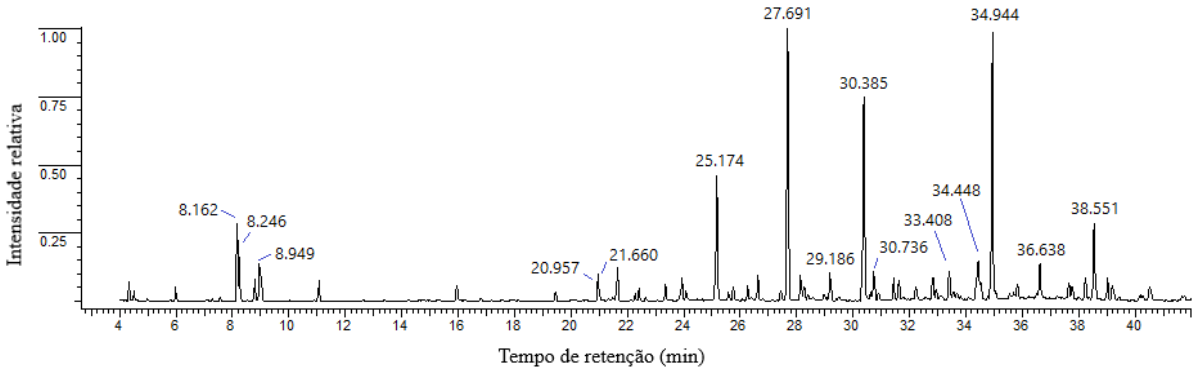
Área relativa (%)[1]			
Composto	**1**	**2**	**3**
β-pineno	-	4,43	-
Δ^3-careno	-	2,41	-
Limoneno	3,43	3,66	3,43
n.i.[2]	-	1,91	-
δ-elemeno	2,96	2,67	2,96
α-himachaleno	9,98	8,88	9,98
Germacreno D	21,93	18,83	21,93
n.i.[2]	-	2,31	-
δ-cadineno	16,44	14,94	16,44
n.i.[2]	-	2,25	-
Germacreno B	2,90	2,41	2,90
γ-eudesmol	8,89	6,08	8,89
n.i.[2]	21,02	18,67	21,02
n.i.[2]	4,98	4,10	4,98
n.i.[2]	7,47	6,44	7,47
Total identificado (%)[1]	66,53	64,32	66,53
Monoterpenos (%)[1]	3,43	10,51	3,43
Sesquiterpenos (%)[1]	54,21	47,73	54,21

Fonte: Dados da pesquisa.
Notas: [1]Porcentagem relativa obtida a partir da área nos cromatogramas; [2]Não identificado.

De acordo com os dados da Tabela 12, a análise por CG-EM permitiu a detecção de 15 compostos voláteis nos extratos supercríticos dos frutos da *S. terebinthifolius*, sendo que 9 compostos foram identificados e representam, em média, 66% da composição química da fração volátil dos extratos. De forma geral, a fração volátil dos extratos supercríticos apresentou apenas os componentes majoritários Δ^3-careno, limoneno e germacreno D do óleo essencial. Entretanto, os extratos supercríticos apresentaram concentração mais elevada de germacreno D e outro componente não identificado quando comparados ao óleo essencial. Os principais componentes identificados foram o germacreno D (18,83% - 21,93%), *δ*-cadineno (14,94% - 16,44%), *α*-himachaleno (8,88% - 9,98%), *γ*-eudesmol (6,08% - 8,89%) e limoneno (3,43% -

3,66%). Esses cinco componentes majoritários correspondem a mais de 58% da composição química da fração volátil dos extratos supercríticos. Além disso, é perceptível que a extração por fluido supercrítico obteve maiores rendimentos de sesquiterpenos do que quando comparada com a extração por arraste a vapor. A Figura 18 ilustra o perfil cromatográfico da fração volátil do extrato supercrítico obtido nas condições operacionais de 60 °C e 300 bar, estas definidas como otimizadas por Silva (2017).

Figura 18 – Cromatograma (CG-EM) da fração volátil do extrato supercrítico dos frutos da *S. terebinthifolius* obtido nas condições operacionais de 60 °C e 300 bar.



Fonte: Dados da pesquisa.
Notas: $t_{r,i\ (\text{tempo de retenção})}$ = 8,246 min referente ao Δ^3-careno;
$t_{r,i}$ = 8,949 min referente ao limoneno;
$t_{r,i}$ = 21,660 min referente ao δ-elemeno;
$t_{r,i}$ = 25,174 min referente ao α-himachaleno;
$t_{r,i}$ = 25,691 min referente ao germacreno D;
$t_{r,i}$ = 30,385 min referente ao δ-cadineno;
$t_{r,i}$ = 33,408 min referente ao germacreno B;
$t_{r,i}$ = 30,385 min referente ao γ-eudesmol.

Os resultados da CG-EM discutidos anteriormente apresentam algumas semelhanças, com pequenas variações, aos dados obtidos por Livia (2013), que realizou a extração de compostos dos frutos de *S. terebinthifolius* utilizando CO_2 supercrítico como solvente. Neste estudo, a fração volátil foi caracterizada em duas condições de extração (35 °C e 80 bar; 45 °C e 220 bar), sendo que os principais monoterpenos identificados foram o α-felandreno, Δ^3-careno e limoneno. Barbosa *et al.* (2007), analisaram uma amostra de extrato supercrítico comercial (marca FLAVEX®) dos frutos da *S. terebinthifolius*, obtido com CO_2 supercrítico como solvente, e a amostra comercial apresentou alto teor de monoterpenos (79,5%), sendo que os principais compostos identificados foram o α-felandreno (23,55%), α-pineno (18,82%), β-felandreno (16,88%), germacreno D (11,89%) e Δ^3-careno (6,32%). Ao comparar tais dados

com os resultados apresentado na Tabela 12, o teor de monoterpenos revelou valores (3,43% - 10,51%) muito abaixo aos publicados na literatura (79,5%). Isso pode ser explicado por fatores como variabilidade genética (quimiotipo), local de coleta diferente, condições de cultivo e processo de pré-tratamento dos frutos, como por exemplo moagem e secagem, podem ter influenciado essa variabilidade no teor de terpenos dos extratos supercríticos dos frutos da *S. terebinthifolius* (BANDONI, 2003; CHAMORRO *et al.*, 2012; KARAM *et al.*, 2016).

4.3 Atividade antiparasitária

Foram realizados ensaios *in vitro* com as amostras de óleo essencial do ponto ótimo (150 g e 400 W) e extrato supercrítico nas condições otimizadas (60 °C e 300 bar) por Silva (2017), cujos dados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Efeitos antiparasitários (anti-*T. cruzi*) e citotóxicos do óleo essencial e extrato supercrítico.

Material	***T. cruzi* (tripomastigotas)[1] (μg/mL)**	**NCTC[2] (μg/mL)**	**IS[3]**
Óleo essencial	4,5 ± 0,3	> 200	> 44,4
Extrato supercrítico	19,7 ± 2,9	> 200	> 10,1
Benznidazol	4,2 ± 1,3	> 200	> 47,6

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: [1]IC_{50} – Concentração inibitória de 50%.

[2]CC_{50} – Concentração citotóxica de 50% (células de mamífero).

[3]Índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}

De acordo com os resultados da Tabela 13, todos os materiais se mostraram atóxicos, uma vez que as suas quantidades máximas das amostras (> 200 μg/mL) não apresentaram efeitos de citotoxicidade *in vitro*. Entretanto, ao comparar os ensaios de IC_{50}, o óleo essencial apresentou um potencial muito semelhante (4,5 ± 0,3 μg/mL) contra o protozoário *T. cruzi* quanto comparado ao benznidazol (4,2 ± 1,3 μg/mL), fármaco padrão utilizado como controle positivo no ensaio. No trabalho de Sartorelli *et al.* (2012), também foi testado o óleo essencial dos frutos maduros da *S. terebinthifolius* frente ao *T. cruzi*, sendo que o componente majoritário desse óleo, o monoterpeno (-)-α-pineno, mostrou atividade frente ao parasita com IC_{50} de 63,56 μg/mL valor próximo ao obtido para o padrão benznidazol (43,14 μg/mL). No presente trabalho, tal composto, presente em 14,56% - 15,73% dos componentes identificados da

amostra (Tabela 10) pode ser um dos responsáveis para pela atividade observada. Por outro lado, o extrato supercrítico apresentou um efeito moderado quando comparado ao óleo essencial e ao benznidazol, o que pode ser atribuído a presença de outros compostos, possivelmente com menor atividade, no extrato supercrítico. Considerando o índice de seletividade, o óleo essencial mostrou um potencial interessante, pois apresentou alta seletividade (> 44,4) quando comparado ao extrato supercrítico.

5 CONCLUSÕES

Com o uso da metodologia de superfície de resposta foi possível estabelecer as condições ideias do processo de extração por arraste a vapor dos frutos da *S. terebinthifolius*, para a condição operacional analisada neste trabalho. Esta questão é bastante valiosa para a redução de custos de produção e avaliação dos efeitos das condições operacionais da extração por arraste a vapor sobre a qualidade do óleo essencial.

Os resultados obtidos neste trabalho, relevaram que o teor de monoterpenos e do composto majoritário foram influenciados pela potência de aquecimento do sistema. A cinética da extração apresentou um comportamento típico de processos de destilação por arraste a vapor, ao qual a composição química dos óleos essenciais apresentou uma variação do teor de monoterpenos e sesquiterpenos ao longo do tempo de extração, sendo que inicialmente houve uma maior concentração de monoterpenos e ao final da extração houve um aumento na concentração de sesquiterpenos. A definição do tempo ideal para a extração por arraste a vapor depende da finalidade para a qual o óleo essencial será utilizado. Por exemplo, se o objetivo for a obtenção de maiores teores de monoterpenos, a configuração ideal do sistema seria na faixa de 100 a 110 g; e potência de aquecimento de 150 a 200 W.

A caracterização por CG-EM permitiu detectar 13 compostos no óleo essencial dos frutos da *S. terenbinthifolius* obtido pela extração por arraste a vapor, sendo que o Δ^3-careno, α-terpineno, α-pineno, limoneno e germacreno D foram os compostos majoritários. Enquanto, a extrato supercrítico apresentou os seguintes principais componentes: germacreno D, δ-cadineno, α-himachaleno, γ-eudesmol e limoneno. Ao comparar ambos os resultados, a extração por fluido supercrítico obteve maiores rendimentos de sesquiterpenos do que a extração por arraste a vapor.

Por fim, quanto aos ensaios de efeitos frente ao parasita *T. cruzi* o óleo essencial apresentou de IC_{50} = 4,5 ± 0,3 μg/mL, resultado bastante semelhante ao do fármaco padrão benznidazol (IC_{50} = 4,2 ± 1,3 μg/mL). De acordo com a literatura, esta atividade pode ser oriunda do componente α-pineno presente no óleo essencial. Além disso, o extrato supercrítico, apresentou um efeito inibitório moderado (IC_{50} = 19,7 ± 2,9 μg/mL). De forma geral, ambas as amostras apresentaram potencial antiparasitário *T. cruzi* e para próximos estudos, seria interessante a investigação, através do fracionamento dos materiais, para identificar qual o componente em específico é responsável pela atividade antiparasitária.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 407 p.

GRISI, F. A. **Aspectos fisiológicos de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), sob níveis distintos de saturação hídrica em ambiente protegido e área ciliar em processo de recuperação.** 2010. 127 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

AMARAL, R. A. G. *et al.* Experimental design for ultrasound-assisted extraction of *Schinus terebinthifolius*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. 1-11, 2021.

BANDONI, A. L. **Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica**: **suaprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores.** 2 ed. Buenos Aires: CYTED, 2003. 418 p.

BARBOSA, L. C. A. *et al.* Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebintifolius* Raddi. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.

BARBOSA, R. P.; VIANA, V. J. **Recursos Naturais e Biodiversidade: Preservação e Conservação dos Ecossistemas.** 1. ed. São Paulo: Érica, 2014. 144 p.

BARRETT, M. P.; CROFT, S.L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Bristish Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, 104, p. 175-196, 2012.

BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Vicosa, 2006.

CESÁRIO, L. F.; GAGLIANONE, M. C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta bot. bras.**, v. 22, n. 3, p. 828-833, 2008.

CHAMORRO, E. R. *et al.* Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography. *In:* SALIH, B.; ÇELIKBIÇAK, O. **Gas Chromatography in Plant Science,**

Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications. 1 ed. Rijeka: InTech, 2012, p. 307-324.

CHATZOPOULOU, P. S.; KATSIOTIS, S. T. Procedures influencing the yield and the quality of the essential oil from *juniperus communis* L. berries. **Pharmaceutica Acta Helveriae,** v. 70, n. 3, p. 247-253, 1995.

COLE, E. R. **Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebebinthifolius Raddi*) e sua eficácia no combate ao dengue.** 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

COSTA C. O. S., *et al.* Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. **Pharmacognosy Magazine,** v. 11, n. 43, p. 607-614, 2015.

DANNENBERG, G. S. *et al.* Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control,** v. 95, p. 115-120, 2019.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2004.

DE OLIVEIRA, M. J. **Termodinâmica**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2005.

DICIAULA, M. C. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Quim. Nova**, v. 37, n. 1, p. 158-163, 2014.

EL-MASSRY, K. F. *et al.* Chemical Compositions and Antioxidant/Antimicrobial Activities of Various Samples Prepared from *Schinus terebinthifolius* Leaves Cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5265-5270, 2009.

ENGEL, R. G. *et al.* **Química orgânica experimental: técnicas de escala pequena.** Tradução por Solange Aparecida Visconti. 3 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012. 1014 p.

GILBERT, G. *et al*. *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, v. 6, n. 1, p. 46-56, 2011.

GOMES, C. L. **Obtenção e avaliação antifúngica e antibacteriana do extrato seco padronizado à base de S*yzygium cumini* (L.) Skeels.** 2018. 114 f. Dissertação (Pós-Graduação em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Aromatic natural raw materials - Vocabulary**: ISO 9235:1997. Genebra: ISO, 1997.

KALLEL, I. *et al.* Optimization of Cinnamon (Cinnamomum zeylanicum Blume) Essential Oil Extraction: Evaluation of Antioxidant and Antiproliferative Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medice,** v. 2019, p. 1-11, 2019.

KARAM, M. C. *et al.* Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 188, p. 32-49, 2016.

KESPER, N. J. R. *et al.* Immunoblot Analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. **Journal of Parasitology,** v. 86, n. 4, p. 862-867, 2000.

LANE, J. E. *et al.* In vitro trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 263-266, 1996.

LEAL, P. F. **Estudo comparativo entre o custo de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor.** 2008. 307 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

LIMA, M. R. F. *et al.* Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 137-47, 2006.

LIVIA, M. A. **Obtenção e separação de compostos bioativos de *Schinus terebinthifolius* Raddi em meio Supercrítico e avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas.**

2013. 131 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 1 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 385 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 1 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 542 p.

MATOS, S. P. **Operações unitárias: fundamentos, transformações e aplicações dos fenômenos físicos e químicos.** 1. ed. São Paulo: Érica, 2015. 161 p.

MATSUO, A. L. *et al.* α-Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Reserach Communications**, v. 411, n. 2, p. 499-454, 2011.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 5, n. 2, p. 185-200, 1996.

METTAL, U. *et al.* Biosynthesis of monoterpene hydrocarbons by isolated chromoplasts from daffodil flowers. **Eur. J. Biochem**. v. 170, n. 3, p. 613-616, 1988.

MORAIS, T. R. *et al.* Antiparasitic Activity of Natural and Semi-Synthetic Tirucallane Triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure/Activity Relationships. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5761-5776, 2014.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 413 p.

OLIVEIRA, V. S. *et al.* Aroeira fruit (*Schinus terebinthifolius* Raddi) as a natural antioxidant: Chemical constituents, bioactive compounds and in vitro and in vivo antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 315, p. 126274, 2020.

PAGANI, A. A. C. *et al.* Quantification of Bioactive Compounds of Pink Pepper (*Schinus Terebinthifolius*, Raddi). **International Journal of Engineering and Innovative Technology**, v. 4, n. 5, p. 37-41, 2014.

PEREIRA, D. P. *et al*. Potencial Biotecnológico da Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius Raddi):* UMA REVISÃO NARRATIVA. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 25-37, 2021.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A,** v. 1163, n. 1-2, p. 2-24, 2007.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 883 p.

ROMDHANE, M.; TIZAOUI, C. The Kinect modelling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 80, n. 7, p. 759-766, 2005.

SANTANA, J. S. Essential oils from *Schinus terebinthifolius* leaves – chemical composition and in vitro cytotoxicity evaluation. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 10, p.1248-1253, 2012.

SARTOR, R. B. **Modelagem, Simulação e Otimização de uma Unidade Industrial de Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor.** 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SARTORELLI, P. *et al*. IN VITRO TRYPANOCIDAL EVALUATION OF PINANE DERIVATIVES FROM ESSENTIAL OILS OF RIPE FRUITS FROM *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE). **Quim. Nova**, v. 35, n. 4, p. 743-747, jan. 2012.

SHALDERS, E. *et al*. Percentual de suplementação de fonte taninífera na ração concentrada de caprinos jovens sobre o desempenho e carga parasitária. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 1100-1105, 2014.

SILVA, B. G. **Extração de compostos dos frutos de *Schinus terebinthifolius Raddi*: tecnologias convencionais e com CO_2 supercrítico; influência da secagem sobre a qualidade da matéria-prima; e atividade antiproliferativa em células tumorais humanas.** 2017. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

SILVA, M. M. *et al. Schinus terebinthifolius:* phenolic constituents and *in vitro* antioxidant, antiproliferative and *in vivo* anti-inflammatory activities. **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 445-452, 2017.

SILVEIRA, J. C. *et al.* Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 2038-2052, 2012.

SINGH, A. K. *et al.* Essential Oil of Leaves and Inflorescence of *Schinus terebinthifolius*: Na Exotic Plant of India. **J. Essent. Oil Res**., v. 10, n. 6, p. 697-699, 1998.

STEFFENS, A. H. **ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS POR DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR EM ESCALA LABORATORIAL E INDUSTRIAL.** 2010. 68 f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

WANG, S. *et al.* Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomance using response surface methodology. **Journal of Food Engineering,** v. 78, n. 2, p. 693-700, 2007.

WILLIANS, L. R. *et al.* Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The Internationl Journal of Aromatherapy,** v. 8, n. 4, p. 30-40, 1998.

ZHANG, Q. *et al.* A novel microwave-assisted steam distillation approach for separation of essential oil from tree peony (Paeonia suffruticosa Andrews) petals: Optimization, kinetic, chemical composition and antioxidant activity. **Journal Elsevier,** v. 154, p. 112669, 2020.