

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

**DISSERTAÇÃO**

**EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE *Bidens pilosa* L. USANDO FLUIDO  
SUPERCRÍTICO: ATIVIDADE BIOLÓGICA E MODELAGEM  
MATEMÁTICA**

**RAMON GREDILHA PASCHOAL**

**2018**



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

**EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE *Bidens pilosa* L. USANDO CO<sub>2</sub>  
SUPERCRÍTICO: ATIVIDADE BIOLÓGICA E MODELAGEM  
MATEMÁTICA**

**RAMON GREDILHA PASCHOAL**

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

Marisa Fernandes Mendes

*e Coorientação do Dr.*

Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

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

Seropédica, RJ  
Abril 2018

Paschoal, Ramon Gredilha, 1991

P279e      Extração do óleo de *Bidens pilosa* L. usando CO<sub>2</sub> supercrítico: atividade biológica e modelagem matemática. / Ramon Gredilha Paschoal. - 2018.  
92 f.: il

Orientadora: Marisa Fernandes Mendes.

Coorientador: Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Engenharia Química, 2018.

1. extração com fluido supercrítico 2. modelagem matemática. 3. terpenos. 4. plantas medicinais. 5. CLAE.  
I. Mendes, Marisa Fernandes, 1972-, orient. II. Silva, Leonardo Lucchetti Caetano da, 1970-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Engenharia Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**Curso De Pós-Graduação Em Engenharia Química**

**RAMON GREDILHA PASCHOAL**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 18 / ABRIL / 2018.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Fernandes Mendes  
(Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ) (Orientadora)

---

Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva  
(Departamento de Produtos Naturais/Farmanguinhos/FIOCRUZ) (Coorientador)

---

D.Sc. Bernadete Elizardo Pereira da Costa Delgado  
(Escola de Química/UFRJ)

---

D.Sc. Reinaldo Coelho Mirre  
(CIEnAm/Escola Politécnica/UFBA)

---

Dr. João Batista de Freitas Tostes  
(Departamento de Produtos Naturais/Farmanguinhos/FIOCRUZ)

*Dedico esta dissertação aos meus pais, Lucia Gredilha e Jorge Paschoal (in memoriam) e a todos aqueles que, de alguma forma, estiveram e estão próximos a mim, fazendo este trabalho acontecer.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar nos meus caminhos e nessa vida maravilhosa;

Aos meus pais, Jorge Candido Paschoal (*in memoriam*) e Lucia Elena Gredilha Paschoal e meu irmão Romulo Gredilha Paschoal, que sem eles não teria forças de seguir com meu sonho;

À minha namorada, Érika Maria Gomes Ferreira Teixeira, pelo amor, companheirismo, compreensão pelos estresses e pela linda amizade;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Marisa Fernandes Mendes, pela orientação, dedicação, críticas, incentivos e muita paciência durante toda a realização do trabalho;

Aos meus iniciadores científicos Leonardo Lucchetti e Dulcineia Teixeira que me deram uma oportunidade mágica de começar um estágio na FIOCRUZ, pela paciência e instrução de uma vida no mundo da pesquisa;

Aos amigos do Laboratório Produtos Naturais 4, Marcos Jun e Elizete Lima pela ajuda primordial que sempre me foi dada;

Aos novos amigos da UFRRJ;

Aos professores da pós-graduação, pela base de ensino;

Ao grupo do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis, em especial Bruno, Igor, Matheus e Isac, com os quais tive o grande privilégio de trabalhar e foram fundamentais para a realização deste trabalho;

À aluna de iniciação científica Marianne Higino, por toda ajuda durante todas as etapas do trabalho;

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

A todos que, de alguma forma, direta ou indireta, colaboraram na realização deste trabalho e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer o meu agradecimento e

Aos órgãos de fomento FIOTEC, FAPERJ e CNPq.

## RESUMO

PASCHOAL, Ramon Gredilha. **Extração do óleo de *Bidens pilosa* L. usando fluido supercrítico: atividade biológica e modelagem matemática.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A *Bidens pilosa* L. (Asteraceae), mais conhecida como picão-preto, é uma planta popularmente usada no tratamento da malária, inflamações e diversos tipos de tumores e, atualmente, se encontra amplamente disseminada por toda a região tropical e subtropical do mundo. Dentre os diversos componentes do extrato dessa planta, destaca-se a presença de flavonoides, poliacetilenos e terpenos, cuja abundância sugere que a maioria das atividades biológicas estejam diretamente ligadas a presença desses metabólitos. Na busca pela extração e obtenção seletiva desses compostos, a extração com fluido supercrítico é uma tecnologia alternativa aos problemas encontrados nas extrações convencionais, visto que há um forte poder de solvatação não necessitando da utilização de solventes orgânicos. Diante do que foi exposto, este estudo teve como objetivo extrair prioritariamente as substâncias de alto valor agregado presentes nessa planta, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, em diferentes condições de pressão e temperatura. Para isso, 8 g de folhas de *Bidens pilosa*, previamente secos e moídos, foram alimentados a um extrator de 42 mL. A unidade experimental ainda consiste de uma bomba de alta pressão e uma válvula micrométrica para remoção da amostra. Foram investigadas diferentes condições operacionais (150 bar - 60 °C; 179 bar - 46 °C; 179 bar - 74 °C; 250 bar - 40 °C; 250 bar - 80 °C; 321 bar - 46 °C; 321 bar - 74 °C, 350 bar - 60 °C e 250 bar - 60 °C), de acordo com um planejamento experimental. Observou-se que o rendimento do extrato aumentou com o aumento da pressão. De acordo com os resultados, a melhor condição para extração foi a 321 bar e 74 °C, capaz de obter um rendimento de 0,082% (6,6 mg). As análises dos óleos extraídos foram realizadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) e cromatografia gasosa (CG-EM). Nas condições de 321 bar a 74 °C e 250 bar a 40 °C foram encontrados sinais que apresentaram espectros ultravioleta de terpenos característicos de óleos essenciais. Os extratos analisados mostraram ser promissores inibidores nas duas linhagens de células tumorais utilizadas, a de melanoma, SK-MEL-28 (68%) e a de leucemia, K562 (90%), ambos em concentração de 150 µg/mL. Posteriormente, os dados experimentais foram correlacionados aos modelos de Esquível *et al.* (1999), Reverchon e Osseo (1994), Zeković *et al.* (2003), Sovová (1999), Brunner (1984) e Kandiah e Spiro (1999), apresentando bom comportamento. Os modelos de Chrastil (1982), Adachi e Lu (1983), Del Valle e Aquilera (1988) e Gordillo (1999) conseguiram representar o comportamento da solubilidade dos óleos com a variação de temperatura e pressão, corroborando os dados experimentais.

**Palavras-Chave:** extração com fluido supercrítico, modelagem matemática, flavonoides, plantas medicinais, CLAE.

## ABSTRACT

PASCHOAL, Ramon Gredilha. **Extraction of *Bidens pilosa* L. oil using supercritical fluid: biological activity and mathematical modeling.** Dissertation (Master in Chemical Engineering, Chemical Technology). Technology Institute, Chemical Engineering Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

*Bidens pilosa* L. (Asteraceae), better known as Black Jack, is a plant popularly used in the treatment of malaria, inflammation and various types of tumors, and is now widely disseminated throughout the tropical and subtropical region of the world. Among the several components present in the extract of this plant, the presence of flavonoids, polyacetylenes and terpenes are abundant, suggesting that most biological activities are directly linked to the presence of these metabolites. The selective extraction of these compounds with supercritical fluid is an alternative technology to the problems found in the conventional extractions, since there is a strong solvation power, and does not require the use of organic solvents. Therefore, this study had as objective the extraction of the high aggregated value substances present in this plant using supercritical CO<sub>2</sub> in different pressure and temperature conditions. For this, 8 g of previously dried and milled *Bidens pilosa* leaves were fed in an extractor with 42 mL of volume. The unity also contained a high pressure pump, and a micrometric valve for sample removal. Different operating conditions were investigated (150 bar - 60 °C; 179 bar - 46 °C; 179 bar - 74 °C; 250 bar - 40 °C; 250 bar - 80 °C; 321 bar - 46 °C; 321 bar - 74 °C and 350 bar - 60 °C and 250 bar - 60 °C), according to an experimental design. It was observed that the extraction yield increased with increasing pressure. According to the results, the best extraction condition was 321 bar and 74 °C, obtaining a yield of 0.082% (6.6 mg). The analyses of the extracted oils were performed using high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) and gas chromatography (GC-MS). Under conditions of 321 bar at 74 °C and 250 bar at 40 °C, signals were found showing ultraviolet spectra of terpenes characteristics of essential oils. The extracts analyzed showed promising inhibition in two tumor cell lines used, melanoma, SK-MEL-28 (68%) and leukemia, K562 (90%), both at a concentration of 150 µg/mL. Subsequently, the experimental data were modeled by the models of Esquivel et al. (1999), Reverchon e Osseo (1994), Zeković et al. (2003), Sovová (1999), Brunner (1984) and Kandiah e Spiro (1999), showing good correlation. The models of Chrastil (1982), Adachi e Lu (1983), Del Valle e Aquilera (1988) and Gordillo (1999) were able to represent the behavior of the solubility of the oils in different conditions of temperature and pressure.

**Keywords:** supercritical fluid extraction, mathematical modeling, flavonoids, medicinal plants, HPLC.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Bidens pilosa</i> L. em ambiente espontâneo.....	4
Figura 2: Inflorescência de <i>Bidens pilosa</i> L. ....	4
Figura 3: Conjunto de aquênios de <i>Bidens pilosa</i> L.....	5
Figura 4: Estrutura geral dos flavonoides.....	8
Figura 5: Exemplos de estruturas das principais subclasses de flavonoides. ....	9
Figura 6: Exemplos de poliacetilenos relatados na literatura de <i>Bidens pilosa</i> .....	10
Figura 7: Principais terpenos encontrados em <i>Bidens pilosa</i> , sendo A: óxido de cariofileno, B: $\beta$ -cariofileno, C: $\alpha$ -copaeno, D: germacreno-D e E: Fitol. ....	11
Figura 8: Exsicata de <i>Bidens pilosa</i> depositada no Banco de dados do Herbário Farmácias Verdes de Farmanguinhos - FIOCRUZ.....	19
Figura 9: Esquema das etapas de preparo do material vegetal e extração.....	21
Figura 10: Esquema das etapas após as extrações de <i>Bidens pilosa</i> . ....	22
Figura 11: Esquema da unidade de extração supercrítica montada no Laboratório de Termodinâmica aplicada e Biocombustíveis (LTAB), sendo: A: Cilindro de CO <sub>2</sub> , B: Bomba de alta pressão, C: Banho termostático, D: Extrator, E: Válvula micrométrica, F: Coletor de amostra, G: Medidor de vazão.....	25
Figura 12: Esquema ilustrativo de uma placa cromatográfica (CCF). ....	27
Figura 13: Esquema básico ilustrativo de um espectrofotômetro com detecção na região do ultravioleta/visível. ....	28
Figura 14: Exemplos genéricos de espectros na região do ultravioleta de flavonoides (A) e poliacetilenos (B).....	28
Figura 15: Três períodos distintos da cinética de extração com fluido supercrítico. ....	31
Figura 16: Curvas de extração para todas as condições experimentais presentes no planejamento realizado.....	39
Figura 17: Curvas das extrações para as condições de 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C. ....	40
Figura 18: Curvas das extrações para as condições de 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74 °C. ....	40
Figura 19: Curvas das extrações para as condições de 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C. ....	41

Figura 20: Gráfico de Pareto para a análise do rendimento obtido com CO <sub>2</sub> supercrítico.....	42
Figura 21: Superfície de resposta relacionando o rendimento da extração em função da temperatura e da pressão.....	43
Figura 22: Resultado da cromatografia em camada fina, com revelação por vanilina/ácido sulfúrico, dos extratos obtidos no planejamento experimental da extração por fluido supercrítico. ....	45
Figura 23: Resultados da cromatografia em camada fina, com revelação por NP-PEG e inspeção sob luz ultravioleta a 365 nm, dos extratos obtidos no planejamento experimental da extração por fluido supercrítico. ....	45
Figura 24: Resultados da cromatografia em camada fina, com revelação por anisaldeído sulfúrico, dos extratos obtidos por maceração, em aparelho de Soxhlet, infusão e com fluido supercrítico nas condições de 321 bar e 74 °C, com e sem etanol. ....	46
Figura 25: Comparação entre os espectros na região do ultravioleta das extrações convencionais realizadas. ....	47
Figura 26: Comparação entre os espectros na região do ultravioleta/visível das extrações com CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	48
Figura 27: Cromatograma obtido por CLAE-DAD (280 nm) do extrato realizado por Soxhlet. ....	49
Figura 28: Cromatograma obtido por CLAE-DAD (280 nm) do extrato realizado por maceração. ....	49
Figura 29: Cromatograma obtido por CLAE-DAD (280 nm) do extrato realizado por infusão. ....	49
Figura 30: Espectros na região do ultravioleta de sinais obtidos por CLAE-DAD dos extratos convencionais, sendo A e B: representativos de flavonoides e C e D: de poliacetilenos.....	50
Figura 31: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda de 235 nm do extrato 179 bar e 46 °C obtido por fluido supercrítico. ....	51
Figura 32: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda de 235 nm dos extratos 179-74, 321-46, 321-74, 250-40 e 250-80 (bar - °C) obtidos por fluido supercrítico.....	52
Figura 33: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda de 235 nm dos extratos 150-60, 350-60 e 250-60 (bar - °C) obtidos por fluido supercrítico. ....	53
Figura 34: Espectros no ultravioleta dos sinais de maior concentração obtidos nos extratos com CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	53
Figura 35: Cromatograma referente ao comprimento de onda de 280 nm do extrato supercrítico na condição de 321 bar e 74 °C. ....	54

Figura 36: Cromatograma referente ao comprimento de onda de 280 nm do extrato supercrítico na condição de 250 bar e 40 °C. ....	54
Figura 37: Espectros correspondentes aos sinais característicos das substâncias de interesse.	54
Figura 38: Ensaio de inibição do crescimento da linhagem celular SK-MEL-28. ....	58
Figura 39: Ensaio de inibição do crescimento da linhagem celular K562. ....	59
Figura 40: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999), a 150 – 60 °C, 179 bar – 46 °C e 179 bar – 74 °C. ....	62
Figura 41: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999), a 250 – 40 °C, 250 bar – 60 °C e 250 bar – 80 °C. ....	62
Figura 42: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999), a 321 – 46 °C, 321 bar – 74 °C e 350 bar – 60 °C. ....	63
Figura 43: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon e Osseo (1994), a 179 bar – 46 °C, 179 bar – 74 °C e 150 bar – 60 °C. ....	65
Figura 44: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon e Osseo (1994), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C. ....	65
Figura 45: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon e Osseo (1994), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C. ....	66
Figura 46: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003), a 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74°C. ....	66
Figura 47: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C. ....	67
Figura 48: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C. ....	67
Figura 49: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Sovová (1994), a 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74 °C. ....	69
Figura 50: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Sovová (1994), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C. ....	69
Figura 51: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Sovová (1994), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C. ....	70
Figura 52: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Brunner (1984), a 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74 °C. ....	71

Figura 53: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Brunner (1984), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C. ....	72
Figura 54: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Brunner (1984), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C. ....	72
Figura 55: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Kandiah e Spiro (1990), a 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74 °C.....	74
Figura 56: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Kandiah e Spiro (1990), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C.....	74
Figura 57: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Kandiah e Spiro (1990), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonômica de <i>Bidens pilosa</i> L. ....	3
Tabela 2: Usos etnofarmacológicos de <i>Bidens pilosa</i> em algumas regiões do mundo. ....	7
Tabela 3: Condições operacionais, classes químicas e atividade biológica de diferentes extratos obtidos com CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	17
Tabela 4: Tabela de fatores e níveis correspondentes ao experimento. ....	25
Tabela 5: Matriz de Planejamento Fatorial Composto Rotacional aplicada a extração supercrítica de <i>Bidens pilosa</i> . ....	26
Tabela 6: Gradiente de eluição da fase móvel desenvolvido para a técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência. ....	29
Tabela 7: Densidade aparente do leito e porosidade do leito. ....	37
Tabela 8: Rendimentos obtidos nas extrações em aparelho de Soxhlet, maceração e infusão das folhas de <i>Bidens pilosa</i> . ....	38
Tabela 9: Experimentos, massas e rendimentos obtidos da extração de <i>B. pilosa</i> com CO <sub>2</sub> -SC. ....	39
Tabela 10: Coeficientes de regressão, erro padrão e p-valor, obtidos para o rendimento da extração com CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	42
Tabela 11: Análise de Variância para o rendimento dos extratos obtidos com CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	42
Tabela 12: Comparação entre as massas e rendimentos das extrações com e sem cossolvente. ....	44
Tabela 13: Componentes identificados no óleo, KIs tabelados, IRs calculados, tempos de retenção e teores de cada um em relação a cada experimento. ....	56
Tabela 14: Rendimento calculado, parâmetros e desvio relativo obtido para o modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999) nas diferentes condições de pressão e temperatura. ....	61
Tabela 15: Dados calculados e desvio relativo obtido para o modelo de Reverchon e Osseo (1994) nas diferentes condições de pressão e temperatura. ....	64
Tabela 16: Dados calculados e desvio relativo obtido para o modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003) nas diferentes condições de pressão e temperatura. ....	64
Tabela 17: Parâmetros do modelo e desvios relativos para cada condição de operação para o modelo de Sovová (1994). ....	68
Tabela 18: Parâmetros do modelo e desvios relativos para cada condição de operação para o modelo de Brunner (1984). ....	71

Tabela 19: Parâmetros do modelo e desvios relativos para cada condição de operação para o modelo de Kandiah e Spiro (1990).....	73
Tabela 20: Desvios relativos para os modelos matemáticos aplicados às curvas de extração. 76	
Tabela 21: Parâmetros dos modelos de solubilidade utilizados e seus desvios médios relativos. .....	77

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> – Densidade aparente do leito.....	22
<b>Equação 2</b> – Porosidade do leito.....	22
<b>Equação 3</b> – Calculo da viabilidade celular .....	30
<b>Equação 4</b> - Modelo de Esquivel <i>et al.</i> (1999).....	32
<b>Equação 5</b> - Modelo Reverchon e Osseo (1994).....	33
<b>Equação 6</b> – Modelo de Zekovic <i>et al.</i> (2003).....	33
<b>Equação 7</b> – Modelo de Sovová (1994).....	33
<b>Equação 8</b> – Cálculo do $q_m$ do modelo de Sovová (1994).....	33
<b>Equação 9</b> – Cálculo do $q_n$ do modelo de Sovová (1994).....	33
<b>Equação 10</b> – Cálculo do $Z_w$ do modelo de Sovová (1994).....	34
<b>Equação 11</b> – Modelo de Brunner (1984).....	34
<b>Equação 12</b> – Modelo de Kandiah e Spiro (1990).....	34
<b>Equação 13</b> – Modelo de Chrastil (1982).....	35
<b>Equação 14</b> – Modelo de Adachi e Lu (1983).....	35
<b>Equação 15</b> – Modelo de Del Valle e Aquilera (1988).....	35
<b>Equação 16</b> – Modelo de Gordillo <i>et al.</i> (1999).....	35
<b>Equação 17</b> – Desvio Relativo Médio (DRM).....	36
<b>Equação 18</b> – Rendimento padrão (R%).....	37
<b>Equação 19</b> – Rendimento por carga livre de soluto (e%).....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Etino
CCF	Cromatografia em camada fina
CG	Cromatografia em fase gasosa
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos
CO <sub>2</sub> -SC	Dióxido de carbono supercrítico
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DMEM	Meio de cultura Dulbecco MEM
DMSO	Sulfóxido de dimetila
DRM %	Desvio relativo médio
e%	Rendimento de extração por carga livre de soluto
EBPC- INF	Extração de <i>Bidens pilosa</i> cultivada – infusão
EBPC- SC	Extração de <i>Bidens pilosa</i> cultivada – supercrítico
EBPC-MC	Extração de <i>Bidens pilosa</i> cultivada – maceração
EBPC-SOX	Extração de <i>Bidens pilosa</i> cultivada – Soxhlet
EC 9706	Linhagem de células esofageais humanas cancerígenas
EFSC	Extração por fluido supercrítico
F	Distribuição
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (Em inglês, Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCEC	Células endoteliais de córnea humana



IC50	Concentração responsável por 50% da atividade de inibição
IR	Índice de retenção calculado
K562	Células de linhagens de leucemia mielóide crônica
KI	Índice de Kovats
LTAB	Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis
MeOH	Metanol
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]
NP	Difenilboriniloetilamina (revelador de Produtos Naturais)
PAF	Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos da FIOCRUZ
PDE	Período decrescente de extração
PEG	Poli(etil)enoglicol
PHT	Fenileptatriino (Em inglês, <i>phenylheptatriyne</i> )
PN4	Laboratório de Produtos Naturais 4
p-valor	Nível de confiança ou valor de probabilidade
q <sub>m</sub>	Quantidade específica de solvente no início da extração do interior das partículas
q <sub>n</sub>	Quantidade específica de solvente no final da extração do soluto facilmente acessível
R%	Rendimento padrão
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
R <sub>f</sub>	Fator de retenção (Em inglês, <i>retention factor</i> )
RPMI 1640	Meio de cultura Instituto Memorial Park Roswell
SFB	Soro fetal bovino
CFS	Cromatografia em fluido supercrítico
SK-MEL-28	Células de linhagens de melanoma
SMA	Serviço de Métodos Analíticos
SUS	Sistema Único de Saúde

TCE	Taxa constante de extração
TEB/DC	Taxa de extração baixa/Difusão controlada
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UV-Vis	Ultravioleta – Visível
$Z_w$	Parâmetro do período de extração rápida

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>Bidens pilosa</i> L. ....	3
2.2 Descrição Botânica .....	4
2.3 Alelopatia.....	5
2.4 Atividade biológica de <i>Bidens pilosa</i> L.....	6
2.5 Composição química de <i>Bidens pilosa</i> .....	8
2.5.1 Flavonoides .....	8
2.5.2 Poliacetilenos .....	9
2.5.3 Terpenos .....	10
2.6 Processos Extrativos Convencionais .....	12
2.7 Extração com Fluido Supercrítico .....	14
2.7.1 Dióxido de carbono supercrítico .....	15
2.8 Considerações Sobre a Revisão Bibliográfica .....	18
3- MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1 Material vegetal.....	19
3.1.1 Cultivo e identificação do Espécime .....	19
3.1.2 Coleta .....	20
3.1.3 Seleção .....	20
3.1.4 Secagem .....	20
3.1.5 Moagem.....	20
3.2 Análise granulométrica da amostra.....	20
3.3 Solventes utilizados .....	21
3.4 Métodos .....	21
3.5 Densidade aparente do leito e porosidade do leito .....	22
3.6 Teor de Umidade .....	22
3.7 Procedimento experimental aplicado na extração convencional .....	23
3.7.1 Extração por Maceração.....	23
3.7.2 Extração em Soxhlet.....	23
3.7.3 Extração por Infusão .....	23
3.7.4 Extração por Fluido supercrítico .....	24
3.7.4.1 Procedimento Experimental .....	24

3.7.4.2 Planejamento experimental aplicado à extração usando CO <sub>2</sub> como fluido supercrítico .....	25
3.8 Métodos Analíticos .....	26
3.8.1 Cromatografia em camada fina .....	26
3.8.2 Análise na região do ultravioleta/visível .....	27
3.8.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD).....	29
3.8.4 Cromatografia em fase gasosa acoplado à espectrometria de massas (CG-EM) .....	29
3.9 Ensaio de viabilidade celular.....	30
4- MODELAGEM MATEMÁTICA.....	31
4.1 Cinética de extração.....	31
4.2 Modelos Matemáticos.....	32
4.2.1 Modelo de Esquivel <i>et al.</i> (1999).....	32
4.2.2 Modelo de Reverchon e Osseo (1994) e Modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003) .....	32
4.2.3 Modelo de Sovová (1994).....	33
4.2.4 Modelo de Brunner (1984).....	34
4.2.5 Modelo de Kandiah e Spiro (1990).....	34
4.3 Modelos de Solubilidade .....	35
5- RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	37
5.1 Tratamento do material vegetal .....	37
5.2 Extração Convencional .....	37
5.3 Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico.....	38
5.4 Extração utilizando CO <sub>2</sub> Supercrítico com Cossolvente .....	44
5.5 Análises Cromatográficas .....	44
5.5.1 Cromatografia em Camada Fina (CCF) .....	44
5.5.2 Análise na região do ultravioleta/visível.....	47
5.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) .....	48
5.5.4 Cromatografia em fase gasosa acoplado a espectrometria de massas.....	55
5.6 Atividade Antitumoral .....	58
5.7 Modelagem matemática .....	61
5.7.1 Modelos cinéticos.....	61
5.7.2 Modelos de solubilidade .....	76
6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	78
7 – REFERÊNCIAS .....	79

## 1- INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, as alternativas terapêuticas que surgem a partir do uso da fitoterapia medicinal vêm sendo mais estudadas e valorizadas devido ao alto custo dos medicamentos sintéticos presentes no mercado. Sabe-se que 80% da população mundial utiliza as plantas no tratamento primário das enfermidades como alternativa ou medicina complementar. Por isso, o Ministério da Saúde (MS) introduziu como política nacional o uso da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Para esse uso, ainda são necessários estudos mais precisos a respeito desta forma de terapia e, principalmente, da comprovação da regularidade dos extratos, frações ou substâncias utilizadas. Os relatos de comunidades tradicionais com relação à utilização das plantas, seus registros e formas terapêuticas resultam em bases de estudo e material de suporte para diversas linhas de pesquisa. Sendo assim, a escolha da planta *Bidens pilosa* baseou-se na lista de plantas medicinais de interesse para o SUS, denominado RENISUS, na qual apresenta aproximadamente 71 espécies. Podem ser encontrados inúmeros artigos etnofarmacológicos apontando a mesma para diversos usos, sendo a presença de terpenos, flavonoides e poliacetilenos, os responsáveis diretos na maioria das atividades farmacológicas.

A *Bidens pilosa* L. é uma planta da família *Asteraceae*, conhecida popularmente por picão-preto e carrapicho, nativa da América do Sul e, atualmente, se mostra amplamente distribuída por todo o mundo. No Brasil, sua utilização ocorre principalmente no tratamento da malária, inflamações e de tumores, podendo ainda ser usada no tratamento de sintomas como febre, dor, angina, edema, diabetes, infecções e inflamações. Já foram isolados cerca de 200 metabólitos secundários de *B. pilosa*, sendo os terpenos, flavonoides e poliacetilenos as classes mais importantes. Apesar do grande número de estudos envolvendo a *B. pilosa* nos artigos etnofarmacológicos, a comprovação do seu potencial farmacológico ainda é carente em relação às outras espécies botânicas. Para a obtenção de extratos enriquecidos com estas substâncias ativas, as técnicas de extração e purificação são fundamentais. No entanto, as técnicas convencionais (soxhlet, maceração ou infusão) apresentam problemas como a baixa seletividade do solvente e seu uso em altas proporções, riscos de degradação das substâncias e excesso de etapas de purificação. De forma a minimizar esses problemas, a extração com fluido supercrítico torna-se uma técnica alternativa, pois não necessita da utilização de solventes orgânicos agressivos. Por isso, tornam-se essenciais estudos sobre essa técnica, uma vez que há uma escassez de trabalhos científicos que realizam a extração do óleo de *B. pilosa* usando fluido supercrítico.

Nesse contexto, a presente dissertação tem como objetivo estudar a viabilidade técnica da extração por fluido supercrítico do óleo na *Bidens pilosa*, utilizando-se dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solvente, a fim de avaliar a composição em relação aos compostos bioativos. Para esta finalidade, alguns objetivos específicos foram realizados, tais como:

- 1- realizar uma comparação entre o método de extração por fluido supercrítico com os métodos convencionais existentes na literatura;
- 2- verificar a influência das variáveis temperatura e pressão na cinética de extração em fluido supercrítico;
- 3- caracterizar o óleo extraído por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para monitorar a presença de terpenos, poliacetilenos, flavonoides e demais componentes identificáveis;
- 4- analisar a correlação entre os compostos químicos extraídos e suas atividades biológicas testadas em células de melanoma (SK-MEL-28) e leucemia (K562);

- 5- modelar matematicamente o processo de cinética de extração do fluido supercrítico usando os modelos de Esquível *et al.* (1999), Reverchon e Osseo (1994), Zeković (2003), Sovová (1994), Brunner (1984) e Kandiah e Spiro (1990);
- 6- correlacionar a solubilidade do óleo usando os modelos de Chrastil (1992), Gordillo (1999), Del Valle e Aquilera (1988) e Adachi e Lu (1983).

Para isso, essa dissertação está dividida em 6 capítulos. O capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica, que aborda assuntos acerca das características de *Bidens pilosa*, bem como sua descrição botânica, efeitos alelopáticos e as atividades biológicas ligadas direta e indiretamente a espécie. Além disso, relata-se um breve estudo sobre a composição química da espécie e as principais técnicas de extração convencionais e por fluido supercrítico. No capítulo 3, têm-se todos os materiais, os métodos, as análises químicas e cromatográficas empregadas, os testes experimentais para inibição de crescimento celular que foram utilizados nesta dissertação, bem como a descrição do processo extrativo utilizado para promover a extração das substâncias de alto valor agregado contidos em *Bidens pilosa*. No capítulo 4 apresentam-se todos os modelos aplicados nesta dissertação, incluindo os cinéticos e os de solubilidade. No capítulo 5 são apresentados os resultados experimentais, as análises cromatográficas, os testes de inibição de crescimento celular e das modelagens aplicadas nas cinéticas de extração. As conclusões e sugestões para trabalhos futuros encontram-se no capítulo 6.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a planta utilizada nesse trabalho, *Bidens pilosa* L., mostrando suas características, composição química e atividades descritas na literatura, assim como as principais técnicas de extração de seus componentes. São exemplificados trabalhos que apresentam os rendimentos de extração utilizando técnicas convencionais, em que são obtidos os compostos de interesse. Em seguida, é apresentada uma revisão sobre a tecnologia de extração supercrítica e seus fundamentos, apresentando os trabalhos encontrados usando a planta de interesse.

### 2.1 *Bidens pilosa* L.

O gênero *Bidens* é muito utilizado na medicina popular, sendo considerado um dos mais utilizados da família Asteraceae. Foi coletado e identificado primeiramente pelo pesquisador Carl Linnaeus, em 1753 e classificado taxonomicamente conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação taxonômica de *Bidens pilosa* L.

Reino	<i>Plantae</i>
Sub-reino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisão	<i>Spermatophyta</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Subclasse	<i>Asteridae</i>
Ordem	<i>Asterales</i>
Família	<i>Asteraceae</i>
Gênero	<i>Bidens</i>
Espécie	<i>Bidens pilosa</i>

Fonte: Adaptado de Bartolome *et al.*, 2013.

*Bidens pilosa* – uma das 280 espécies que compõem o gênero – é de crescimento anual e originária da América do Sul, mas está amplamente distribuída na maioria das áreas pantropicais do mundo (XUAN e KHANH, 2016). Pode ser citada por diversos nomes populares como: amor seco, coambi, picão-das-horas, carrapicho, carrapicho-de-duas-pontas, carrapicho-picão, cuambri, cuambu, erva-picão, fura-capá, picão-preto, guambu, macela-do-campo, picão, picão-amarelo, picão-do-campo, pico-pico e piolho-de-padre. Dentre esses, os nomes mais encontrados são carrapicho e picão-preto (GILBERT *et al.*, 2013).

A planta em estudo (Figura 1) apresenta elevado poder competitivo e apresenta características alelopáticas, sendo também capaz de permitir um alto nível de extração de nutrientes quando comparada ao feijão ou à soja. Como apresenta capacidade de acumular grandes níveis de nitrogênio e fósforo, ela se mostra bastante competitiva na captação de água e nutrientes frente a espécies da cultura local (BRITO, 2016), demonstrando seu alto poder de adaptação e de resistência – daí a espécie ser considerada como daninha ou ruderal. Plantas daninhas têm seu crescimento aumentado em áreas agrícolas, em parte, devido ao uso indiscriminado de fertilizantes (SANTOS e CURY, 2011). Como estão amplamente disseminadas em diversas terras, acabam causando perdas e danos significativos nas culturas do milho, soja e, principalmente, na de algodão, diminuindo a qualidade dos produtos e seus rendimentos.



Figura 1: *Bidens pilosa* L. em ambiente espontâneo.

Originária da América do Sul, atualmente é encontrada em quase todo território tropical, localizada desde o nível do mar até cerca de 3000 metros de altitude. A distribuição no Brasil ocorre em todos os Estados, sendo que sua maior ocorrência está nos campos agrícolas das regiões Centro-Oeste e Sul (BARTOLOME *et al.*, 2013). Gilbert *et al.* (2013) citam que apenas uma única planta de *Bidens* pode produzir de 3000 a 6000 sementes, das quais muitas germinam, dando origem a até quatro gerações por ano. Essa planta se dispersa por intermédio de seus aquênios: em formato de “arame farpado”, prendem-se nas roupas e na pele de animais, tendo um maior espalhamento nas culturas de lavoura. Devido a isso, juntamente com a habilidade alelopática e a fácil adaptação ao local, são consideradas uma praga (LUCCHETTI *et al.*, 2009; XUAN e KHANH, 2016).

## 2.2 Descrição Botânica

A planta apresenta, normalmente, uma variação de altura entre 60 e 150 cm. Em campos de soja, porém, podem ser encontradas com alturas de até 200 cm. É uma erva que possui caule ereto e de porte herbáceo, ramificado e com superfície lisa, podendo apresentar tricomas, estrias e até mesmo manchas avermelhadas. Apresenta pequenas flores reunidas em capítulos tubulares e terminais (Figura 2).



Figura 2: Inflorescência de *Bidens pilosa* L.



Suas folhas são opostas e simples e possuem margens serrilhadas. São de uma única cor, com base verde, têm base cuneada e sua consistência se assemelha à de uma membrana fina. São resistentes e flexíveis, apresentando brácteas pilosas. Além disso, seus frutos, quando maduros, são escuros e com formato de aquênios longos e de cor preta (Figura 3) e com ganchos nas extremidades, aptos à foresia para facilitar sua propagação. Sua raiz é pivotante e de calibre compatível com o porte da planta (ROIG E MESA, 1992; BORGES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014;).



Figura 3: Conjunto de aquênios de *Bidens pilosa* L.

Fonte: [www.agrolink.com.br](http://www.agrolink.com.br), 2017.

### 2.3 Alelopatia

O efeito alelopático é definido por Ferreira e Aquila (2000), como a influência de cada indivíduo sobre o outro, com a produção de biomoléculas e a liberação no ambiente, prejudicando assim seu crescimento ou desenvolvimento.

Santos e Cury (2011) informam que *B. pilosa* apresenta substâncias características da espécie que possuem efeitos alelopáticos sobre plantas e alguns tipos de pragas e patógenos. Um dos principais fatores que influenciam é a presença do fenileptatriino, o PHT, um poliacetileno capaz de produzir radicais livres que são tóxicos para insetos herbívoros, bactérias, fungos, vírus ou outras plantas.

Baseado na produção de radicais livres tóxicos e na elevada produção de sementes em um curto período (SALGADO *et al.*, 2014), *Bidens* torna-se uma planta que pode propagar o crescimento de outras culturas, assim como destruir e/ou prejudicar o de outras. Por apresentar alta variabilidade genética e alto teor de absorção de nutrientes, culturas de milho, soja e algodão têm sido fortemente prejudicadas com danos diretos e indiretos (BRITO, 2016). Em 2002, Freitas *et al.* já informavam que os frutos de *Bidens* se prendem aos capulhos do algodão e, com isso, diminuem a qualidade da fibra e dificultam sua colheita. O estudo das plantas com alto teor alelopático ajuda no desenvolvimento da síntese de novos produtos em substituição aos herbicidas (SILVA *et al.*, 2007).

Diversos autores descrevem experimentos de alelopatia utilizando *Bidens* como planta avaliada. Dentre eles, Rabêlo *et al.* (2008) demonstraram que o extrato aquoso da folha foi capaz de inibir um alto percentual de germinação das sementes e influenciou até mesmo na taxa de crescimento do nabo e da alface.

Diversos ácidos orgânicos podem ser liberados pelas raízes de acordo com seus fatores genéticos, onde as concentrações de ácido málico, acético, cítrico e oxálico, dentre outros, dependem do fator de estresse ao qual a planta é submetida. Estudos de Santos e Cury (2011)

indicam que a quantidade desses ácidos em *Bidens pilosa* é superior à das outras plantas estudadas. Esta quantidade superior ajuda na solubilização dos nutrientes encontrados no solo, além de servir como proteção aos ataques de patógenos e marcadores da simbiose com organismos promotores de desenvolvimento e crescimento.

#### 2.4 Atividade biológica de *Bidens pilosa* L.

Em 1970, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) promoveu o cultivo de *Bidens pilosa* na África, por ser espécie de fácil manuseio, comestível, palatável e segura (BARTOLOME *et al.*, 2013). Seu uso etnofarmacológico vem sendo adotado até os dias de hoje, principalmente na África e nas culturas indígenas. Devido às suas atividades no tratamento contra inflamações, malária e tumores em geral, *Bidens pilosa* é usada como erva ou como ingrediente em chás medicinais (LIEN-CHAI *et al.*, 2003). Além disso, apresentam indicações para o uso antifebril, analgésico para ouvido e vias urinárias, tumores de mama, dores de garganta e asma (LUCCHETTI *et al.*, 2009). Outras atividades populares são exemplificadas por Abrogoua *et al.* (2012) e Bartolome *et al.* (2013) que destacam seu uso para diarreia, gastrite, infecção renal, febre amarela e tuberculose.

Um estudo realizado no Rio Grande do Sul descreveu o uso desta espécie no tratamento contra inflamação nos ovários, como antibiótico e para congestão nasal (VENDRUSCULO e MENTZ, 2006). Em Santa Catarina, o picão-preto é utilizado como analgésico e antirreumático (SILVA *et al.*, 2009).

No estudo realizado por Nadia *et al.* (2017), comparou-se os extratos metanólicos e em acetato de etila de *Bidens pilosa* com relação à eficácia nos ensaios de inibição do crescimento das cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis à cloroquina (Pf3D7) e à prova de cloroquina (PfINDO). Ambos os extratos apresentaram boa atividade, porém a fração mais eficaz foi a obtida em acetato de etila, apresentando maior atividade antiplasmodial sem citotoxicidade.

Thien *et al.* (2017) analisaram a atividade inibitória da  $\alpha$ -glucosidase de acordo com as frações utilizando hexano, clorofórmio e água, dos extratos metanólicos de *Bidens pilosa*. O extrato fracionado com clorofórmio mostrou ser o mais promissor e dele foram isoladas duas substâncias novas (chalconas) e 7 conhecidas, além de apresentar a maior atividade hipoglicemiante.

Shen *et al.* (2018) avaliaram a eficácia da atividade anticancerígena do extrato de *Bidens pilosa* obtido com éter de petróleo. Os autores constataram que foi obtido um extrato rico em uma mistura de triterpenos e compostos alifáticos, como fitol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. Assim, o mesmo se mostrou ser um potencial agente quimioterapêutico para câncer de pulmão em ensaios de inibição de crescimento.

De maneira geral, o uso medicinal popular (sem evidência científica) abrange uma série de doenças que, possivelmente, são relacionadas com as propriedades antimicrobianas e outras relatadas acima. Na maior parte dos casos, as folhas são empregadas frescas ou em decocção (BARTOLOME *et al.*, 2013; GILBERT *et al.*, 2013).

Segundo o estudo do site Raintree (1996), a espécie é utilizada para diversos tratamentos em comunidades locais. A Tabela 2 apresenta as diferentes aplicações por regiões.

Apesar de ser utilizado por comunidades indígenas e, principalmente, na África para diversas enfermidades, ainda não existe comprovação científica para a maioria de seus usos. A utilização desta planta de maneira desorientada apresenta um perigo para quem a consome, pois não se tem informações suficientes para a comprovação de sua eficácia.

Tabela 2: Usos etnofarmacológicos de *Bidens pilosa* em algumas regiões do mundo.

Local	Aplicações
África	Hemorragias, inflamação, malária, pneumonia, hemorragia pós-parto, infecções respiratórias, reumatismo, feridas, dores de estômago, tuberculose, vermes, coágulos sanguíneos, queimaduras, cataratas, colite, conjuntivite, constipação, diarreia, dor de ouvido, feridas e como um antisséptico;
Floresta Amazônia	Angina, calafrios, diabetes, disenteria, edema, distúrbios oculares, cefaleia, hepatite, icterícia, laringite, malária, distúrbios menstruais, parasitas, boca dolorida, dor de garganta, dor de estômago, dor de dente, insuficiência urinária, vermes, feridas;
Bahamas	Câncer, febre, erupção cutânea, coceira, gases intestinais, lacerações, feridas na pele, retenção de água, feridas;
Brasil	Inflamação, picadas de insetos, icterícia, auxílio à lactação, tônico do fígado, obstruções hepáticas, distúrbios pulmonares, malária, parasitas, faringite, reumatismo, esclerose, escorbuto, dor de garganta, dor de dente, amigdalite, úlceras, infecções urinárias, insuficiência urinária;
Haiti	Angina, catarro, diabetes, febre aftosa, transtornos mentais, produção de leite, choque nervoso, estomatite, tonsilite, vômitos;
México	Coágulos de sangue, problemas no peito, diabetes, febre, gastroenterite, hemorroidas, inflamação, icterícia, rim, distúrbios hepáticos, bolhas na boca, problemas nervosos, mordida de cobra, problemas estomacais e como um antisséptico e diurético;
Panamá	Resfriados, dor de cabeça, distúrbios intestinais, tumores de próstata, reumatismo;
Peru	Abscessos, angina, anúria, calvície, estimulação biliar, parto, calafrios, conjuntivite, cistite, diabetes, disenteria, edema, febre aftosa, febre, infecções fúngicas, cefaleia, hemorragia, hepatite, inflamação, icterícia, laringite, problemas hepáticos, suporte hepático, feridas na boca;
Outros lugares	Abortos, sangramento, limpeza do sangue, furúnculos, bronquite, queimaduras, câncer, candidíase, resfriados, cólicas, colite, conjuntivite, tosses, cortes, diabetes, diarreia, disenteria, problemas oculares, febre, flatulência, perda de cabelo, hepatite, hiperglicemia, hipertensão, inflamação, infecções intestinais, doenças do fígado, promoção menstrual, parasitas, infecções respiratórias, reumatismo, problemas de pele, mordida de cobra, distúrbios estomacais, promoção do suor, sapinhos, dores de dentes, úlceras, colite ulcerativa, infecções, problemas urinários, vermes, feridas, antisséptico, adstringente, diurético.

Fonte: Adaptado de Raintree, 1996.

## 2.5 Composição química de *Bidens pilosa*

A composição química da planta inclui cumarinas, fenilpropanoides, ácidos carboxílicos, aldeídos, derivados do ácido benzóico e, principalmente, terpenos, flavonoides e poliacetilenos, que são os principais responsáveis pela maioria das atividades descritas (BARTOLOME *et al.*, 2013). Dentre todas essas classes, já foram isoladas cerca de 200 substâncias. Diante disso, estas três principais classes de metabólitos naturais foram detalhadas nos próximos tópicos para melhor compreensão de suas características.

### 2.5.1 Flavonoides

São metabólitos naturais da classe dos polifenóis e seu esqueleto básico é formado por 15 átomos de carbono e apresentam subunidades C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, sendo dois anéis fenólicos, geralmente substituídos (A e B), e um heterocíclico oxigenado (C) acoplado ao anel A, como é mostrado na Figura 4 (OLIVEIRA, 2014).

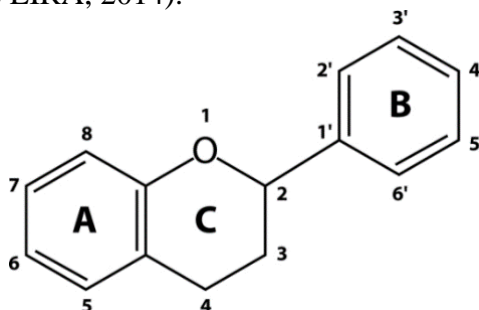


Figura 4: Estrutura geral dos flavonoides.  
Fonte: Coelho, 2013.

A presença dos flavonoides se mostra extremamente marcante nas plantas, sendo possível de serem encontrados em altas proporções. São distribuídos nas folhas, flores, frutos, sementes e raízes (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009) e desempenham inúmeras funções nas plantas. De maneira geral, estão relacionados ao mecanismo de defesa da planta ou no desempenho de atividades para seu desenvolvimento. Como exemplo, pode-se destacar as folhas, que bloqueiam a radiação ultravioleta extrema, e as flores, que podem atuar como sinais visuais para polinizadores (LOPES *et al.*, 2003; COELHO, 2013).

Segundo Santos (2014), já foram identificadas mais de 9000 variedades de flavonoides, que apresentaram diversas atividades, dentre elas: antialérgica, antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e antimalária (KRETTLI *et al.*, 2001; TEWTRAKUL *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2007; TOBINAGA *et al.*, 2009; NAKAMA *et al.*, 2012; CORTES-ROJAS *et al.*, 2013). De modo geral, os flavonoides podem ser divididos/organizados em subclasses (Figura 5), como flavonas, flavanonas, flavonóis, chalconas e auronas, dentre outras.

Diversos artigos também atribuem a essas substâncias alguma atividade antitumoral relacionada. Ujiki *et al.* (2006) e Khan e Sultana (2006) descreveram em seus trabalhos que o flavonoide apigenina apresenta ação direta contra o câncer de mama, pâncreas, próstata, carcinoma cervical e hepatoblastoma. Modzelewska *et al.* (2006) apresentaram diversas chalconas com promissora atividade contra o câncer de mama. O foco desse trabalho era desenvolver um produto com inibidores altamente potentes, para que pudessem ser utilizados como drogas anticancerígenas. Outro flavonoide muito estudado e com boa reputação de atividade biológica é o kaempferol. Deng *et al.* (2016) o correlaciona à promissora atividade contra células EC9706 (linhagem de células esofageais humanas cancerígenas) presentes em seus ensaios. Ahmed *et al.* (2016) fizeram uma comparação entre diferentes tipos de solventes em sua extração. O extrato metanólico apresentou a maior atividade contra células HCEC

(células endoteliais de córnea humana) e o mesmo foi justificado devido à presença dos flavonoides quercimeritrina, escutelareína e rutina.

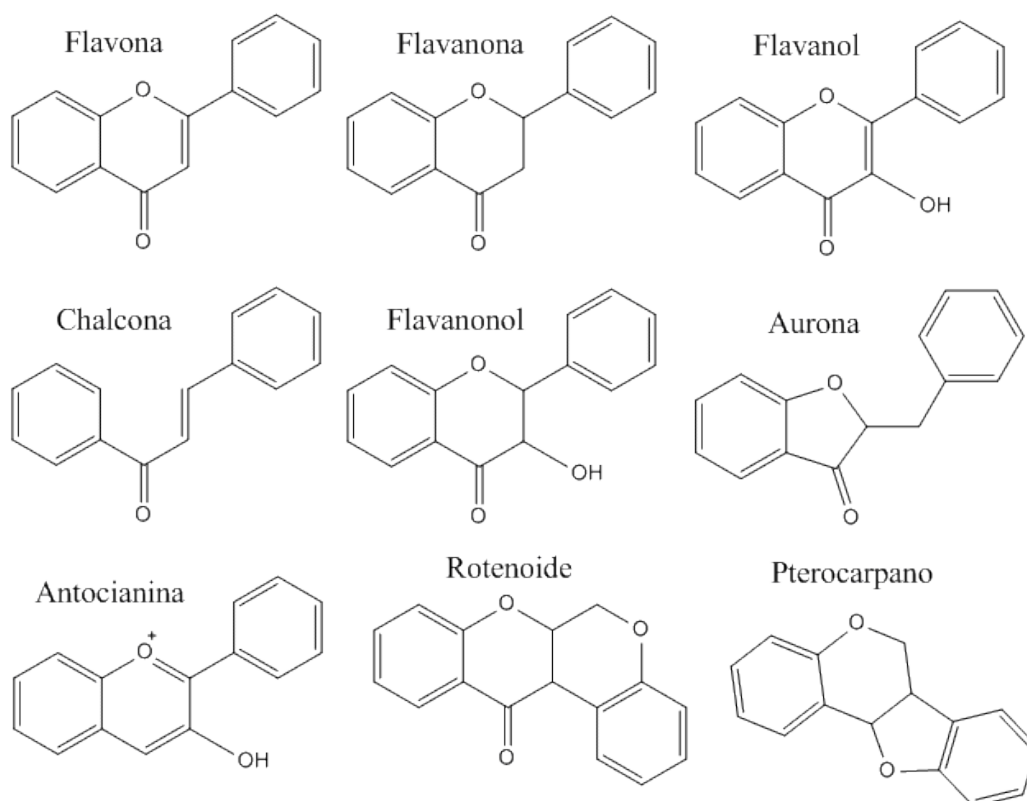


Figura 5: Exemplos de estruturas das principais subclasses de flavonoides.  
 Fonte: Adaptado de Santos, 2014.

### 2.5.2 Poliacetilenos

Os poliacetilenos (Figura 6) são classificados como substâncias orgânicas com a unidade repetida de  $(C_2H_2)_n$  e sua estrutura consiste em uma longa cadeia de átomos de carbono com ligações simples e duplas se alternando. Além disso, são metabólitos derivados da via biossintética do acetato e podem apresentar múltiplas ligações triplas conjugadas (RAMOS, 2007).

Estes podem ser encontrados largamente em espécies da família Asteraceae. No gênero *Bidens*, estão presentes principalmente nas partes aéreas e nas raízes das espécies. Esta classe, juntamente com a dos flavonoides, são as que predominam em relação aos metabólitos mais isolados até o momento e as que apresentam atividades farmacológicas mais relevantes (LUCCHETTI *et al.*, 2009; SILVA, 2009).

Diversas atividades já foram relacionadas a esses metabólitos, como hipoglicemiante, imunomoduladora, antimalárica, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antifúngica e antimicrobiana (UBILLAS *et al.*, 2000; CHIANG *et al.*, 2007; TOBINAGA *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2016; YOON *et al.*, 2011; MARCETIC *et al.*, 2012). Os estudos mais importantes descritos na literatura são referentes às atividades antitumorais. Devido a isso, Buskuhl *et al.* (2009) buscaram um novo poliacetileno proveniente de espécie vegetal, para que pudesse ser utilizado como potencializador em medicamentos antitumorais. Um novo poliacetileno [5-octa-2,4,6-triil-furan-2(5H)-ona] foi obtido através do fracionamento com diclorometano do extrato hidroalcoólico das folhas de *Vernonia scorpioides*. Com a investigação do potencial do novo poliacetileno, foram encontrados resultados que sugeriram

genotoxicidade e citotoxicidade, podendo ser interessantes do ponto de vista terapêutico e também tóxicos para quem os consumir.

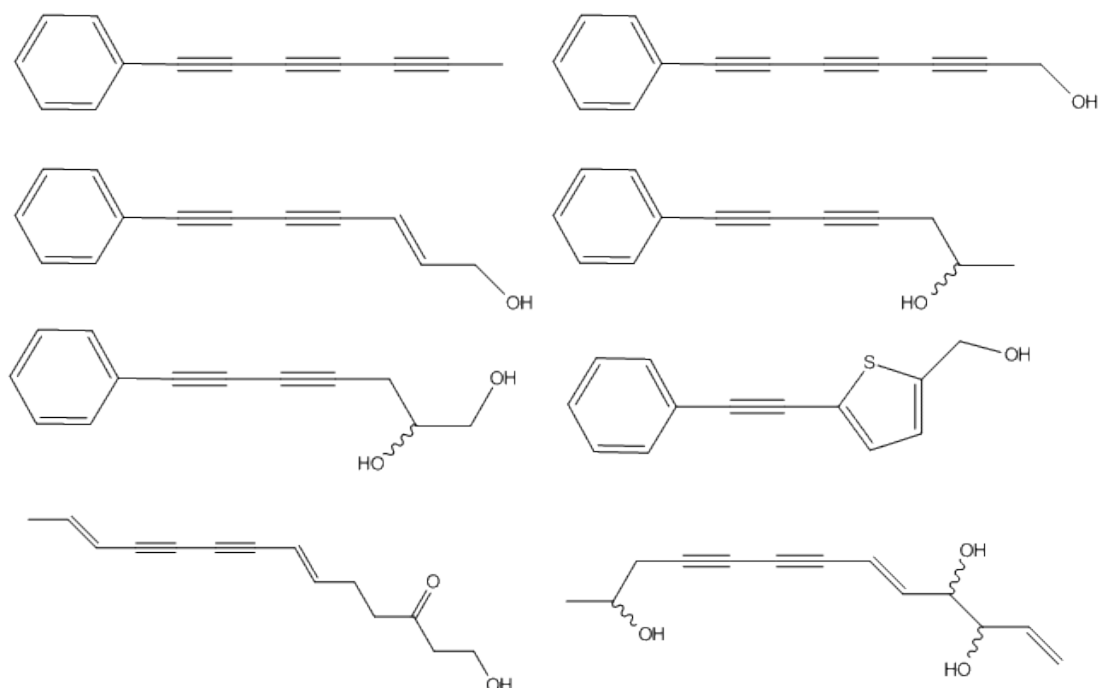


Figura 6: Exemplos de poliacetilenos relatados na literatura de *Bidens pilosa*.  
Fonte: Adaptado de Wang *et al.*, 2010.

O 1-fenil-hepta-1,3,5-triino, um poliacetileno isolado do extrato de *Bidens pilosa* por Kumari *et al.* (2009), apresentou uma potencial atividade anticancerígena. O mesmo foi isolado a partir de um extrato em hexano, sendo de grande importância devido às necessidades encontradas atualmente no mercado para medicamento com atividade antitumoral. Já Nakama *et al.* (2011) demonstraram o alto poder inibitório, contra células leucêmicas, dos poliacetilenos presentes no extrato aquoso de *B. pilosa*.

### 2.5.3 Terpenos

Os terpenos abrangem uma grande variedade das substâncias de origem vegetal, e apresentam grande importância ecológica para as plantas, servindo para atrair ou afastar insetos de acordo com a conveniência biológica (JUNIOR, 2003).

São derivados de unidades de isopreno (5 átomos de carbono) e são classificados baseado no número destas unidades que apresentam: aqueles com 10 carbonos, que contêm duas unidades C<sub>5</sub>, são chamados de monoterpenos; os com 15 carbonos e três unidades isoprênicas são chamados sesquiterpenos; com 20 carbonos e quatro unidades isoprênicas, diterpenos. Triterpenos têm 30 carbonos, tetraterpenos têm 40 e os politerpenos são formados por 8 ou mais unidades de isopreno (GARCÍA e CARRIL, 2009).

Na espécie trabalhada pode ser encontrada uma série de mono e sesquiterpenos. Dentre eles, são destacados na Figura 7 os encontrados em maior concentração (germacreno-D,  $\beta$ -cariofileno, óxidos de cariofileno,  $\alpha$ -copaeno e fitol).

Um dos principais compostos naturais com atividade antitumoral é o taxol. Este diterpeno foi isolado das raízes da planta *Taxus brevifolia*; seu mecanismo de ação já está totalmente descrito e é indicado para cânceres de mama, pulmão, ovário e fígado (MONTEAGUDO, 2015).

Diversos terpenos encontrados em *B. pilosa* apresentam alguma atividade biológica atribuída. Deba *et al.* (2008) apresentam algumas atividades, podendo ser citada a antibacteriana, que foi atribuída à presença dos terpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e limoneno. Tal efeito é exercido pela ação tóxica contra os microorganismos estudados.

Outra atividade importante, a antifúngica, é atribuída a outros componentes presentes no óleo de *B. pilosa*, como o trans-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e canfeno, porém seu mecanismo de atividade ainda é desconhecido.

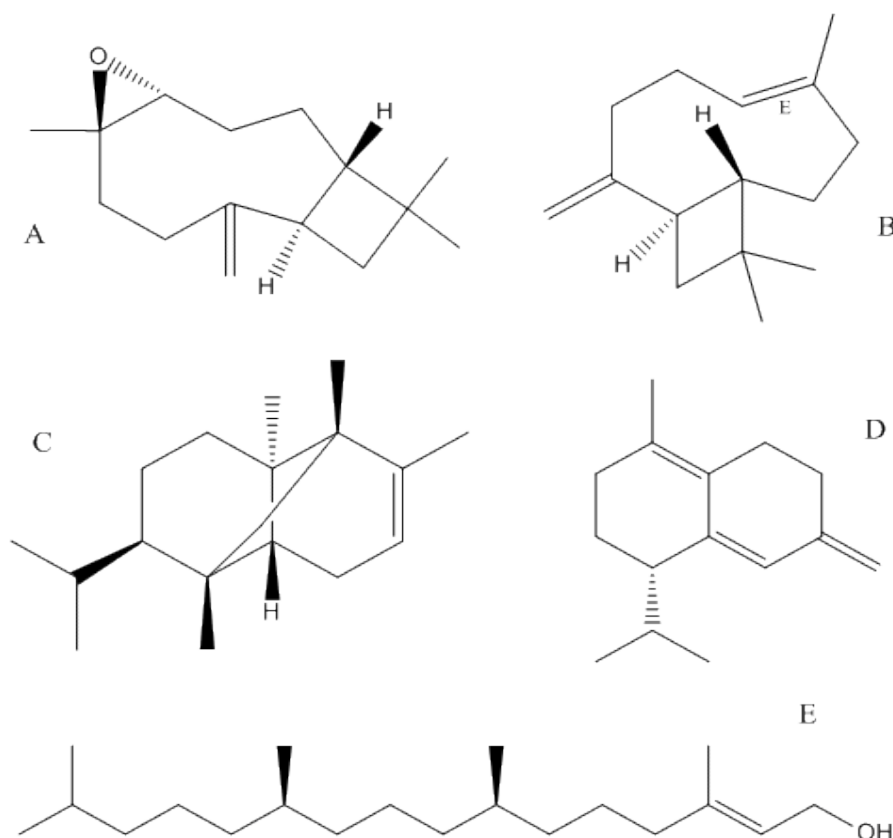


Figura 7: Principais terpenos encontrados em *Bidens pilosa*, sendo A: óxido de cariofileno, B:  $\beta$ -cariofileno, C:  $\alpha$ -copaeno, D: germacreno-D e E: Fitol.

Fonte: Adaptado de Deba *et al.*, 2008.

Em 2013, Moreira realizou uma revisão sobre os diterpenos que apresentam atividade antitumoral e que relaciona 862 estudos *in vitro* em células leucêmicas de 27 linhagens diferentes. Foi comprovada a eficiência de, aproximadamente, 84% dos diterpenos, mostrando alguma atividade frente às células leucêmicas estudadas. Os diterpenos citados foram: asperdiol, cefalomanina, crassolido, dilofolido, enanderianin, gnidilatidina, ingenol, muricelina, oridonina e fitol.

Santos e Pinheiro (2016) realizaram uma revisão sobre a terapia etnofarmacológica associada à atividade antitumoral. São destacados os estudos de validação do potencial antitumoral em paralelo à medicina tradicional. A espécie *Synadenium umbellatum* é utilizada no combate à cultura de células tumorais de Ehrlich. Sua atividade foi diretamente atribuída à presença de terpenos e flavonoides no extrato etanólico, identificados por CLAE-DAD (MOTA *et al.*, 2012).

Os carotenoides (tetraterpenos) são um grupo de moléculas que desempenham diversas funções importantes em todos os organismos vivos. O  $\beta$ -caroteno é, dentre os carotenoides, o

mais estudado. Apresenta um papel importante na modulação da imunidade e na prevenção de riscos à saúde para muitas espécies. Estudos demonstraram apresentar efeitos antibacterianos contra infecções e revelaram que dietas ricas em  $\beta$ -caroteno reduzem a incidência de cânceres de pulmão e mama. Além disso, têm sido relatados os efeitos sobre as subpopulações linfocitárias, especialmente de linfócitos T auxiliares e *killers* (SANTOS *et al.*, 1996; MASSIMINO *et al.*, 2003; ZAINE *et al.*, 2014).

A atividade do óleo contendo esses compostos ou até mesmo a atividade isolada dos mesmos só pode ser testada e verificada após a extração dos óleos da planta. Para a extração seletiva desses compostos, encontram-se três tipos de técnicas mais utilizadas.

## 2.6 Processos Extrativos Convencionais

Segundo Lucchetti *et al.* (2009) e Gilbert *et al.* (2013), as técnicas convencionais mais utilizadas para a extração das substâncias de interesse são:

**Maceração:** é um dos processos mais utilizados pelos autores na busca de novas substâncias presentes em plantas. É um processo no qual certa quantidade de solvente entra em contato com o material vegetal previamente pulverizado e em tamanho determinado, podendo ser com ou sem agitação constante. Pode ocorrer por um período mínimo de 7, 8 ou mais dias definidos (ANVISA, 2011). Os recipientes utilizados para esse tipo de extração devem ser âmbar ou com algum tipo de material que não permita a passagem de luz. É um método de extração que não é seletivo para uma determinada classe de substâncias e, normalmente, é escolhido quando o objetivo é a obtenção de princípios ativos que sofrem degradação, quando são termolábeis ou fotossensíveis (FARMACOPÉIA, 1996; ANVISA, 2011). É influenciado principalmente por um equilíbrio entre o solvente e o material vegetal, porém acaba sofrendo influência de variáveis como o tamanho de partícula, umidade, tempo de operação, relação solvente/carga e seletividade. Dentre as desvantagens da técnica, tem-se o tempo de operação, a limitação do poder extrativo e a real possibilidade de contaminação (MELECCHI, 2005).

**Soxhlet:** esse método é caracterizado por Melecchi (2005) como um caso diferenciado da lixiviação, sendo também de maneira contínua até determinado tempo. A 5ª edição da Farmacopeia Brasileira preconiza o uso de 7 horas de extração para hidroalcoólicos (ANVISA, 2011). A proporção mais utilizada de carga/solvente para obtenção de extratos ricos e com atividade biológica promissora é de 10% em etanol P.A. 99% (POLITI, 2009). O aparelho usado é separado em 3 partes: balão de ebulição, reservatório extrator e condensador. Segundo Simões *et al.* (2010), o aparelho extrator de Soxhlet se torna um excelente equipamento devido aos ciclos realizados pelo solvente, sendo possível alcançar uma extração eficiente com altos teores de rendimento mediante o uso de quantidades reduzidas de solvente, em comparação a outras técnicas convencionais. Outro benefício seria a utilização do calor, gerando maior rendimento de extração; porém, esse calor utilizado pode causar degradação das substâncias (MELECCHI, 2005). Na extração, o solvente que entra em contato com o material vegetal estará sempre puro, pois é proveniente de uma destilação e o extrato sempre ficará concentrado no balão, onde inicialmente é colocado só o solvente de extração. Este solvente é aquecido pela manta elétrica, chegando à ebulição. Após entrar em contato com o condensador, goteja no cartucho de celulose que contém o material vegetal, permeando-o e realizando a extração. Este reservatório também tem presente um sifão, que faz com que, ao alcançar uma certa altura, o extrato retorne ao balão, renovando o ciclo de extração (COSTA *et al.*, 2004; NASCIMENTO, 2015).

**Infusão:** é uma técnica em que um certo volume de água, aquecido acima de 90 °C, é adicionado ao material vegetal. O mesmo é mantido em repouso e tampado ou abafado (VANONI, 2016; ANVISA, 2011; FELITO *et al.* 2016). Segundo Caetano *et al.* (2014), é uma das técnicas mais



utilizadas no preparo de fitoterápicos para etnofarmacologia, juntamente com a decocção. É um método aconselhado para ser aplicado em partes vegetais de consistência menos rígida e mais fáceis de serem extraídos, como folhas, inflorescências, flores, sementes e frutos (REZENDE e COCCO, 2002; SILVA 2009). Devido à alta temperatura do solvente utilizado, é possível obter compostos que normalmente não são extraídos à temperatura ambiente; ao mesmo tempo, pode ser capaz de degradar substâncias termolábeis (OLIVEIRA *et al.*, 2004; CORTES-ROJAS, 2011; FELITO *et al.*, 2016).

Vários trabalhos são encontrados na literatura citando esses métodos aplicados à extração do óleo de *Bidens pilosa*. Diante disso, foi realizada uma revisão bibliográfica, cobrindo o período dos últimos 10 anos, exemplificando as condições operacionais utilizadas para a obtenção de flavonoides ou poliacetilenos, os rendimentos obtidos e as atividades relacionadas ao extrato.

Chiang *et al.* (2007) realizaram uma maceração com as folhas frescas de *B. pilosa* em metanol (1:10 p/v); em seguida, foi realizada uma partição com ordem crescente de polaridade, cuja fração em acetato de etila apresentou um rendimento de 0,96%. Foi identificada a presença de poliacetilenos na fração, que apresentou atividade hipoglicêmica. Utilizando-se de metodologia semelhante, Chang *et al.* (2007) realizaram a infusão de folhas frescas (100 °C) e uma partição em n-butanol. Foi atribuída uma atividade imunomoduladora devido à presença do flavonoide centaureidina identificado na fração.

Já em 2008, Kwiecinsk *et al.* obtiveram 8,3% de uma fração (rica em poliacetilenos) com atividade antitumoral obtida a partir de uma coluna cromatográfica empacotada com gel de sílica, eluída com clorofórmio, utilizando o extrato etanol-água oriundo da maceração dinâmica. Tobinaga *et al.* (2009) também realizaram uma maceração das folhas secas; no entanto, o solvente extrator utilizado foi a acetona. Partindo desse extrato, os autores realizaram uma partição em diclorometano e, com uma coluna em gel de sílica e eluição com hexano, obtendo uma fração rica em poliacetilenos que demonstrou promissora atividade antimalárica. Uma extração realizada por infusão das folhas de *Bidens pilosa* por 15 minutos gerou um rendimento de, aproximadamente, 5,3% e apresentou atividade antibacteriana segundo os modelos experimentais realizados por Ashafa e Afolayan (2009). Uma extração em aparelho de Soxhlet foi realizada por Yadav e Tangpu (2009). Os extratos metanólicos obtidos das folhas e inflorescências secas apresentaram atividade antidiarreica em experimentos realizados em ratos. Wang *et al.* (2010) realizaram extração etanólica por maceração durante 7 dias, com sucessivas partições com éter de petróleo, acetato de etila e n-butanol. A fração de menor polaridade obtida foi a escolhida para isolamento em coluna com gel de sílica. As frações apresentaram perfis de flavonoides e poliacetilenos em análises cromatográficas posteriores.

Em 2011, Adedapo *et al.*, Hassan *et al.*, Cortes-Rojas e Kwiecinsk *et al.* utilizaram a técnica da maceração das folhas para obtenção de extratos ricos em flavonoides. Cada trabalho mostrou uma variação de parâmetros, no que diz respeito ao tempo de contato da planta com o solvente, ou até mesmo a proporção entre os mesmos. As características que as diferenciam estão relacionadas à presença de diferentes substâncias químicas em cada extrato, apresentando assim, atividades diferenciadas como antioxidante, cicatrizante e hepatoprotetora. Cortes-rojas *et al.* (2013) conseguiram obter um extrato rico em flavonoides utilizando outra técnica extrativa. Com o método em aparelho de Soxhlet, a extração durou 35 minutos em etanol-água e levou a um rendimento próximo de 1,6%. A presença dos flavonoides rutina e quercetina-3-O-glicosídeo no extrato demonstrou atividade antioxidante.

Fotso *et al.* (2014) e Mohamed *et al.* (2014) isolaram flavonoides a partir de *B. pilosa* utilizando a maceração como técnica extrativa. Usando metanol como solvente, o trabalho de Fotso *et al.* (2014) manteve um período de 35 minutos em contato com o material vegetal, enquanto o segundo determinou que terminaria a extração somente ao alcançar o esgotamento do material. Compostos como quercetina-3,3-dimetiléter-7-O-β-D-glucopiranosídeo e a

isoocanina-7-O-β-D-(2, 4, 6 - triacetil)-glucopiranosídeo foram isolados e ambos relacionaram uma atividade anti-inflamatória promissora ao extrato. Zhang *et al.* (2016) foram capazes de obter um rendimento de 19% utilizando a infusão como técnica extrativa. Foi considerado um resultado excelente baseado na utilização das folhas secas de *Bidens* em água a 100 °C, durante 20 minutos e com uma proporção de 1:5 de material vegetal para solvente. Uma fração enriquecida em flavonoides foi obtida por Falowo *et al.* (2016) com 0,007% de rendimento. Inicialmente, realizando a extração com maceração, o extrato após a secagem foi submetido a uma partição em acetato de etila e, em seguida, esta fração obtida foi submetida a uma coluna cromatográfica empacotada com gel de sílica (200–300 mesh) e eluída com uma mistura de éter de petróleo e acetona (3:1). Para determinar o teor de flavonoides presentes na fração, foi realizado um método de determinação de flavonoides totais. Uma alíquota de 0,5 mL de solução 2% de AlCl<sub>3</sub> em etanol foi adicionada a 0,5 mL da fração e a presença dos flavonoides foi calculada a partir da absorbância em espectrofotômetro a 420 nm. Essa fração apresentou promissora atividade antimicrobiana em testes realizados em bactérias Gram-negativas.

Apesar dos inúmeros trabalhos citados, Basaar *et al.* (2015) mencionaram inúmeras desvantagens relacionadas a essas técnicas, como a demora em finalizar o processo, o uso de solventes em altas proporções, a possível contaminação por metais carregados pelo solvente utilizado, contaminação por sais inorgânicos, fraca seletividade do solvente, alto risco de degradação, riscos pelo uso de solventes tóxicos e/ou inflamáveis e excesso de etapas de purificação. Mais ainda, a extração de poliacetilenos não foi observada pelo método em aparelho de Soxhlet.

Assim, diante desses fatos, torna-se necessária a busca por técnicas extrativas mais seletivas e que não impactem o meio ambiente. Existem diversas técnicas como a extração em ultrassom, microextração em fase sólida e a extração com fluido supercrítico. Neste trabalho, busca-se o estudo da extração usando fluido supercrítico como uma promissora técnica na extração de compostos com atividade biológica.

## 2.7 Extração com Fluido Supercrítico

A extração por fluido supercrítico (EFSC) se destaca como principal técnica alternativa para obtenção de óleos fixos, visto que um fluido em condições supercríticas apresenta propriedades intermediárias entre um líquido e um gás (PINTO *et al.*, 2006; FORNARI *et al.*, 2012).

Devido ao fato de ser uma técnica livre de solventes orgânicos, buscando a redução de resíduos, maior seletividade e difusão molecular, esse método de extração tem sido amplamente aplicado para a obtenção de compostos que possam ser utilizados em diversas áreas como: produtos naturais, alimentos, fármacos, agrotóxicos, análises de água, solo e sedimentos, combustíveis fosseis e polímeros (CARRILHO *et al.*, 2006).

O estado supercrítico é obtido elevando-se a pressão e a temperatura de um gás ou de um líquido de forma que se altere o estado de agregação, modificando assim as propriedades da substância de interesse (SAHENA *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-CAMARGO *et al.*, 2014).

O fluido no seu estado supercrítico apresenta um alto poder de solvatação, devido às suas características intermediárias como densidade e difusividade (ZOUAGH *et al.*, 2004).

Dentre as propriedades importantes de um fluido supercrítico, destaca-se a sua alta densidade, próximo à de um líquido, que é capaz de extrair compostos não voláteis e de alta massa molecular. Além disso, é possível obter rápidas extrações devido à sua alta difusividade. A densidade do fluido supercrítico é facilmente ajustada com a variação da temperatura ou pressão (PINTO *et al.*, 2006; DUVAL *et al.*, 2016).

Em geral, um fluido supercrítico possui propriedades semelhantes às de um gás como difusão, viscosidade e tensão superficial, e propriedades semelhantes às de um líquido como

densidade e poder de solvatação (AZMIR *et al.*, 2013). Outras vantagens em comparação às técnicas convencionais são a utilização de solventes conhecidos como “seguros”, menores tempos de extração com maior seletividade e a possibilidade de acoplamento direto com sistemas de técnicas cromatográficas como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia em fluido supercrítico (CFS) (HERRERO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2016).

A fim de se obter uma maior seletividade de extração, é necessário realizar um estudo minucioso para ser possível obter resultados promissores com a utilização da técnica de fluido supercrítico. A otimização da EFSC carece de conhecimento fundamental sobre dados termodinâmicos (solubilidade e seletividade), juntamente com dados cinéticos (coeficientes de transferência de massa), pois a variação da temperatura juntamente com a pressão pode direcionar a um óleo com características químicas particulares (KHODDAMI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016). Além disso, para amostras naturais, o uso de planejamento de experimentos permite a observação estatística da influência dos diferentes parâmetros envolvidos (temperatura, pressão, vazão de CO<sub>2</sub>) em função de uma ou mais variáveis de resposta (SILVA, 2004; GARCEZ, 2016). Em paralelo, a escolha do melhor solvente extrator possui grande importância, visto que deve apresentar baixos parâmetros críticos, baixo grau de toxicidade e de inflamabilidade, ser inerte e não reativo. No sentido oposto às vantagens, raramente são utilizadas em escalas industriais por possuírem um alto valor de investimento restringindo assim seu uso (MARTÍNEZ, 2002).

### 2.7.1 Dióxido de carbono supercrítico

Segundo Dias (2015), o fluido mais usado na pesquisa e na indústria é o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), devido ao fato de possuir condições críticas baixas, 31,2 °C e 73,8 bar, permitindo assim obter um extrato com suas propriedades químicas conservadas, além de ser de baixo custo e fácil obtenção.

As principais vantagens descritas que podem justificar a ampla utilização do CO<sub>2</sub> como solvente são:

- a) temperatura crítica (31,2 °C): risco mínimo de degradação das substâncias químicas extraídas, uma vez que as extrações podem ocorrer em temperaturas baixas (BARROS, 2015);
- b) pressão crítica (73,8 bar): não deixa resíduos e baixo valor gasto para elevar sua pressão pelo compressor (BARROS, 2015);
- c) inerte: não oferece riscos de promover reações secundárias na extração, como por exemplo: oxidação, hidrólise, redução ou degradação química (MICHIELIN, 2002);
- d) seguro: é um gás que não sofre explosão, não é poluente e nem tóxico (MICHIELIN, 2002);
- e) polaridade: apresenta polaridade semelhante aos solventes apolares utilizados em extrações convencionais, como por exemplo, o hexano e o pentano (MICHIELIN, 2002);
- f) versatilidade: a polaridade do CO<sub>2</sub> supercrítico pode ser ajustada com adição de pequenas quantidades de cossolventes (água ou etanol), ou então, com ajustes dos parâmetros de extração, obtendo assim, uma extração com caráter mais polar (MICHIELIN, 2002);
- g) alta disponibilidade: é de fácil obtenção, não apresentando alto custo (MICHIELIN, 2002);
- h) volatilidade: não necessita de etapas posteriores para a separação de solvente, com a técnica de despressurização já é possível obter o extrato “seco” (MICHIELIN, 2002).

Devido às suas propriedades, este solvente pode extrair facilmente compostos voláteis, além de compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas e substâncias polares, como açúcares, aminoácidos, glicosídeos e proteínas (MAUL, 1999). Com isso, também é possível extrair as substâncias de maior interesse no presente trabalho, como já foi possível no trabalho de Kwiecinski *et al.* (2011) que obteve uma fração rica em poliacetilenos, apesar de não os terem identificado.

Na Tabela 3 apresentam-se os inúmeros trabalhos em que os autores obtiveram sucesso na extração de flavonoides ou poliacetilenos, usando CO<sub>2</sub> supercrítico, juntamente com as variáveis utilizadas e as atividades biológicas testadas.

É possível observar nessa tabela que diferentes matérias primas foram utilizadas na extração de flavonoides e compostos fenólicos utilizando dióxido de carbono supercrítico na EFSC. Os rendimentos observados não são altos e as temperaturas utilizadas, em sua maioria, estiveram na faixa de 40 a 50 °C.

Diante de tudo o que foi exposto, observa-se que é possível do ponto de vista técnico extrair os compostos de interesse utilizando o CO<sub>2</sub> supercrítico, porém somente 3 trabalhos foram encontrados referentes à *B. pilosa*. Yang *et al.* (2009) utilizaram 6 g de plantas *Bidens pilosa* L. var. *radiata*, *B. pilosa* L. var. *pilosa* e *B. pilosa* L. var. *minor*, secas e pulverizadas e as adicionaram no extrator por 45 min nas condições de 50 °C e 400 bar com fluxo de 1,5 mL/min de CO<sub>2</sub>. Com rendimentos aproximados de 0,55% (massa extraída por massa total de planta), ambos foram analisados por cromatografia em fase gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência.

Foram identificados 3 poliacetilenos glicosilados que os autores citam como “candidatos” para servirem como controle de qualidade para análises químicas e controle de qualidade de diferentes lotes da planta (marcadores da espécie). Além disso, nesse extrato foi atribuída uma atividade hipoglicêmica referentes aos testes biológicos realizados.

Kwiecinski *et al.* (2011) utilizaram *B. pilosa* coletada na Reserva Botânica Juréia em São Paulo. Um total de 15 g de partes aéreas secas e moídas foram adicionados ao extrator na temperatura de 40 °C e 250 bar de pressão, sob um fluxo de solvente de, aproximadamente, 15 g/min por 240 minutos de extração. As mesmas condições foram repetidas até que fosse possível obter material suficiente para todas as análises. Uma placa de cromatografia em camada fina foi realizada e a principal mancha foi raspada, solubilizada em metanol, centrifugada e, em seguida, analisada em espectrofotômetro na região do Ultravioleta/visível, sendo possível observar um perfil característico de poliacetileno. As análises espectrofotométricas confirmaram a presença dessas substâncias majoritariamente sendo os picos de absorbância máximas foram registados em comprimento de onda (nm): 208, 269, 330, 370, 445, 473 e 667. Após esse extrato foi analisado e os autores concluíram que *B. pilosa* possui constituintes antitumorais ativos contra as células MCF-7 e o carcinoma de ascite de Ehrlich.

Por último, Dieamant *et al.* (2015) utilizaram a *B. pilosa* identificada no Herbário Irina Gemtchujnicov em São Paulo. Suas partes aéreas foram secas em estufa com circulação de ar e trituradas em liquidificador industrial. O extrato foi obtido em condições de 40 °C, 300 bar e CO<sub>2</sub> com fluxo de 5 L/min. Não houve análise de Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a DAD para a possível identificação de flavonoides ou poliacetilenos, sendo somente realizada a cromatografia em fase gasosa, indicando a presença de fitol, ácido palmítico, ácido linoleico e ácido linolênico. Desta forma, o autor atribui ao extrato uma atividade capaz de se tornar um ingrediente ativo e inovador, com potenciais aplicações clínicas para controlar o envelhecimento intrínseco e extrínseco da pele humana. Assim, sendo possível ser utilizado para desenvolver uma preparação à base de plantas com atividade de reparação e anti-envelhecimento da pele, gerando um produto de alto valor comercial.

Tabela 3: Condições operacionais, classes químicas e atividade biológica de diferentes extratos obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Espécie Botânica	P (Bar)	T (°C)	R (%)	Classe Química	Atividade	Referências
<i>Psidium guajava</i> (Goiabeira)	300	50	1,39	Compostos Fenólicos	Antioxidante	Castro-Vargas <i>et al.</i> , 2010.
<i>Citrus sinensis</i> L. (Laranjeira)	200	40	1,10	Flavonoides, Ácidos Fenólicos e Terpenos	Antioxidante, Antimicrobiana	Benelli <i>et al.</i> , 2010.
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	300	40	4,36	Compostos Fenólicos	Antioxidante	Vicente <i>et al.</i> , 2012.
<i>Momordica charantia</i> (Melão-de-são-caetano)	334	46	1,51	Flavonoides	Antioxidante	Shan <i>et al.</i> , 2012.
<i>Citrus grandis</i> L. (Pomelo)	390	80	2,37	Flavonoides	Antioxidante	He <i>et al.</i> , 2012.
<i>Eugenia uniflora</i> L. (Pitanga)	400	60	5,00	Flavonoides	Antioxidante	Garmus <i>et al.</i> , 2014.
<i>Capsicum baccatum</i> (Pimenta aji)	200	50	2,07	Compostos fenólicos	Antioxidante	Dias <i>et al.</i> , 2016.
<i>Litsea japonica</i> (Litsea)	300	60	9,50	Flavonoides	Anti-inflamatório	Song <i>et al.</i> , 2016.
<i>Baccharis dracunculifolia</i> (Alecrim-do-campo)	300	50	4,60	Flavonoides	Antioxidante	Cabral <i>et al.</i> , 2016.
<i>Lycium europaeum</i> (Cambroeira)	300	40	1,20	Flavonoides	Antioxidante	Rosa <i>et al.</i> , 2017.
<i>Picea abies</i> (Abeto-falso)	200	50	2,08	Flavonoides	Antioxidante	Talmaciu <i>et al.</i> , 2017.
<i>Panax ginseng</i> (Ginseng)	300	50	0,49	Poliacetilenos	Adaptogênica	Han <i>et al.</i> , 2011.

R% - Rendimento padrão (massa extraída por massa alimentada); T – Temperatura; P – Pressão.

## 2.8 Considerações Sobre a Revisão Bibliográfica

Com referência a esses estudos, foi observada a utilização de diferentes condições experimentais de temperatura (40 – 50 °C) e pressão (200 – 400 bar) e a possibilidade da não utilização de solventes com modificadores. Sendo assim, é possível eliminar os principais problemas encontrados nas técnicas convencionais citadas anteriormente. Porém, torna-se um desafio a realização da extração dos compostos de interesse do óleo fixo de *Bidens pilosa* com CO<sub>2</sub> supercrítico, visto que não existem muitos trabalhos na literatura que possam auxiliar no estudo da metodologia a ser trabalhada.

Há uma escassez de estudos comparando a extração com fluido supercrítico às técnicas convencionais. Com relação ao uso do aparelho de Soxhlet, alguns trabalhos e resultados podem ser comparados, mas não se tem muitas informações a respeito das melhores condições operacionais para a extração dos acetilenos de modo geral.

Dessa forma, torna-se de grande importância o estudo proposto analisando todas as variáveis, como condições operacionais, constituintes químicos extraídos, seletividade alcançada, cinética de extração e atividade biológica relacionada.

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

São apresentados neste capítulo todo o material e métodos utilizados para a realização desse trabalho. Para tal, foi utilizada uma unidade experimental localizada no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (LTAB) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) com o propósito da extração de metabolitos secundários a partir de folhas secas de *Bidens pilosa*, aplicando um planejamento de experimentos e modelos cinéticos de extração. Foram também abordadas metodologias utilizadas nas análises cromatográficas, como cromatografia em camada fina, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa, realizadas nos Laboratórios de Produtos Naturais 4 (PN4) e Serviço de Métodos Analíticos (SMA) do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, localizado na Fundação Oswaldo Cruz (RJ). A atividade citotóxica foi avaliada no Laboratório de Farmacologia Molecular de Farmanguinhos.

#### 3.1 Material vegetal

##### 3.1.1 Cultivo e identificação do Espécime

A espécie de interesse foi cultivada na Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos (FIOCRUZ), herborizada e coletada de acordo com Mori *et al.* (1989). Após a coleta, foi realizada a determinação do material pelo Botânico responsável técnico Marcelo Neto Galvão utilizando microscópio eletrônico (modelo OPTON TIM-2T), chaves analíticas e literatura taxonômica especializada para comparação. Com sua confirmação estabelecida, a exsicata (Figura 8) foi obtida e depositada no Herbário Farmácias Verdes de Farmanguinhos, cadastradas com número de registro 656. Em seguida, duplicatas foram enviadas para o Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.



Figura 8: Exsicata de *Bidens pilosa* depositada no Banco de dados do Herbário Farmácias Verdes de Farmanguinhos - FIOCRUZ.

### **3.1.2 Coleta**

A coleta foi realizada conforme solicitação, sendo feita uma pré-seleção da matéria-prima, evitando coletar partes degradadas e contaminadas por outras espécies. Ela foi realizada pela manhã observando-se as condições climáticas favoráveis, evitando períodos de chuva, solo molhado e elevada umidade. Os instrumentos utilizados durante todo o processo foram higienizados previamente e livres de óleos e substâncias que pudessem levar à contaminação. A coleta foi realizada na Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos da FIOCRUZ (PAF) em Jacarepaguá, Rio de Janeiro, com coordenadas referentes ao georreferenciamento dos espécimes, que possuem latitude e longitude 22.9404 °S / 43.4044 °O, respectivamente. A coleta ocorreu com o auxílio de um instrumento cortante e o material foi transportado em sacos plásticos transparentes, pesado e armazenado em local resfriado. A limpeza foi realizada com esponja, água, detergente neutro e, posteriormente, álcool a 70%. O material foi seco com tecido não tramado seco e limpo.

### **3.1.3 Seleção**

Foi realizado o processo de inspeção do material vegetal através da verificação visual de contaminação cruzada, avaliando a possível presença de outras espécies de plantas, corpos estranhos, danos ao material, odores e contaminação por pragas, doenças e insetos. O material foi pesado antes da inspeção e foi realizado o descarte de corpos estranhos e partes deterioradas. Tudo o que foi descartado e o material selecionado foram pesados separadamente para calcular o aproveitamento. O material que foi selecionado foi mantido em local refrigerado e limpo.

### **3.1.4 Secagem**

A secagem do material foi realizada em estufa elétrica secadora com circulação e renovação de ar (marca Solab 102/1440). Foram verificadas as condições do aparelho, sendo evitadas altas temperaturas e respeitando a capacidade da estufa sem misturar materiais de diferentes espécies. O aparelho utilizado foi ligado e aquecido até 37 °C e, para garantir a uniformidade do material, foi revolvido durante as primeiras 24 h de secagem. A matéria-prima vegetal foi retirada da estufa após 15 dias (peso constante em 3 pesagens subsequentes).

### **3.1.5 Moagem**

Após a secagem, foi realizado o processo de moagem do material em sistema de moinhos eletrônicos de facas. Os cuidados com o aparelho foram os mesmos utilizados com a estufa. O aparelho utilizado foi da marca Marconi, que possui 6 facas fixas e 4 em rotação, com tamanho da malha de 20 mesh. O equipamento foi ligado e alimentado com baixa quantidade de material. Após o processo, o material foi coletado em uma bandeja e armazenado em saco plástico transparente.

## **3.2 Análise granulométrica da amostra**

A escolha do tamanho da partícula é essencial para a otimização do processo de extração. Assim, este material foi submetido a uma série de tamises (peneiras granulométricas) da marca Bertel, com ordem crescente de tamanho de mesh (9, 16, 32 e 60), sendo a força manual determinante para a velocidade de rotação. O tamanho de partícula de interesse foi coletado no tamanho entre 32 e 60 mesh – ou partículas entre 250 e 500 µm, de tal forma que



esta medida foi selecionada de acordo com a revisão bibliográfica realizada. Todas as extrações foram realizadas com este material tamisado.

### 3.3 Solventes utilizados

Os solventes utilizados nas extrações em aparelho de Soxhlet e maceração dinâmica foram o álcool etílico P.A., adquirido da Tedia Brasil com 99,5% de pureza, água ultrapura obtida em equipamento Milli-Q para a extração por infusão e o dióxido de carbono (99,998% de pureza, White Martins e Air Products) para a extração por fluido supercrítico.

Os demais solventes utilizados para as análises foram provenientes da Vetec Química Fina, sendo eles: ácido sulfúrico P.A. 97%, ácido clorídrico (0,04 N), ácido fórmico P.A. 98% e ácido acético 80%. Utilizou-se metanol grau CLAE (Merck) para as análises dos extratos, realizadas no CLAE-DAD e CG-EM, disponibilizado pelo Laboratório PN4 - FIOCRUZ.

### 3.4 Métodos

Os procedimentos experimentais aplicados a este estudo foram desenvolvidos através de uma série de etapas. Dois diagramas esquemáticos foram criados para melhor compreensão desses processos, podendo ser observados nas Figuras 9 e 10.

É possível observar na Figura 9 o fluxograma de processo inicial, no qual as folhas de *Bidens pilosa* foram secas em estufa, 37 °C por 15 dias e, em seguida, trituradas e peneiradas até a obtenção de tamanho determinado entre 32 e 60 mesh.

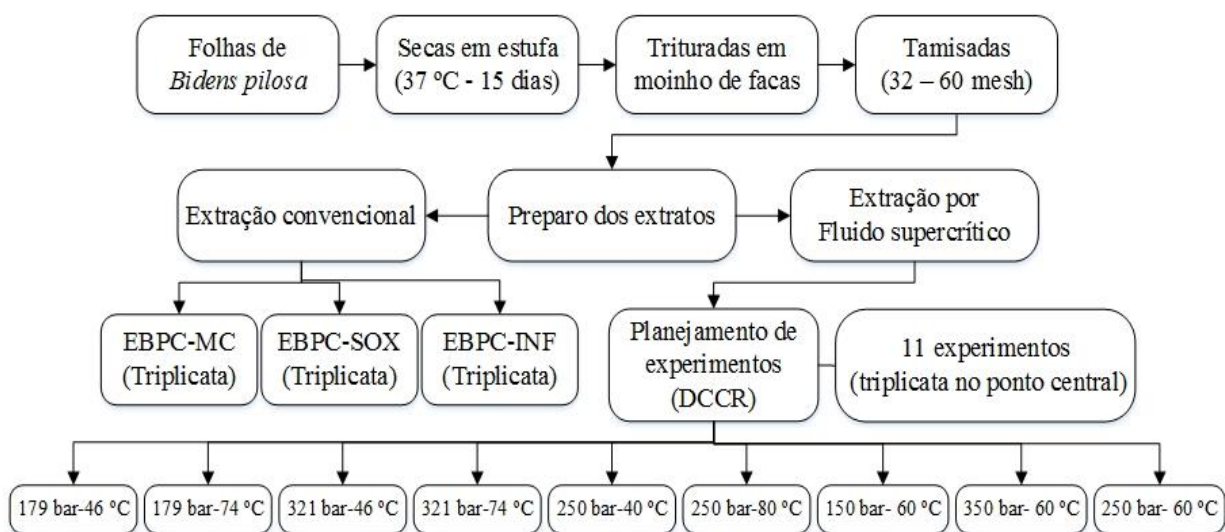


Figura 9: Esquema das etapas de preparo do material vegetal e extração.

Este material vegetal foi utilizado para as extrações convencionais, denominadas EBPC-SOX (extração de *Bidens pilosa* cultivada – Soxhlet), EBPC-MC (extração de *Bidens pilosa* cultivada – maceração) e EBPC-INF (extração de *Bidens pilosa* cultivada – infusão), todas foram realizadas em triplicata. A mesma também foi utilizada para EBPC-SC (extração de *Bidens pilosa* cultivada – supercrítico), utilizando um planejamento experimental (Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR) e uma triplicata no ponto central (250 bar – 60 °C).

Já na Figura 10 podem ser observados os procedimentos aos quais os extratos foram submetidos, onde observa-se que os extratos obtidos pelas 4 técnicas diferentes passaram por 3 tipos de análises, sendo: Análises químicas, análises farmacológicas e análise de modelagem matemática (divididas em solubilidade e cinética).

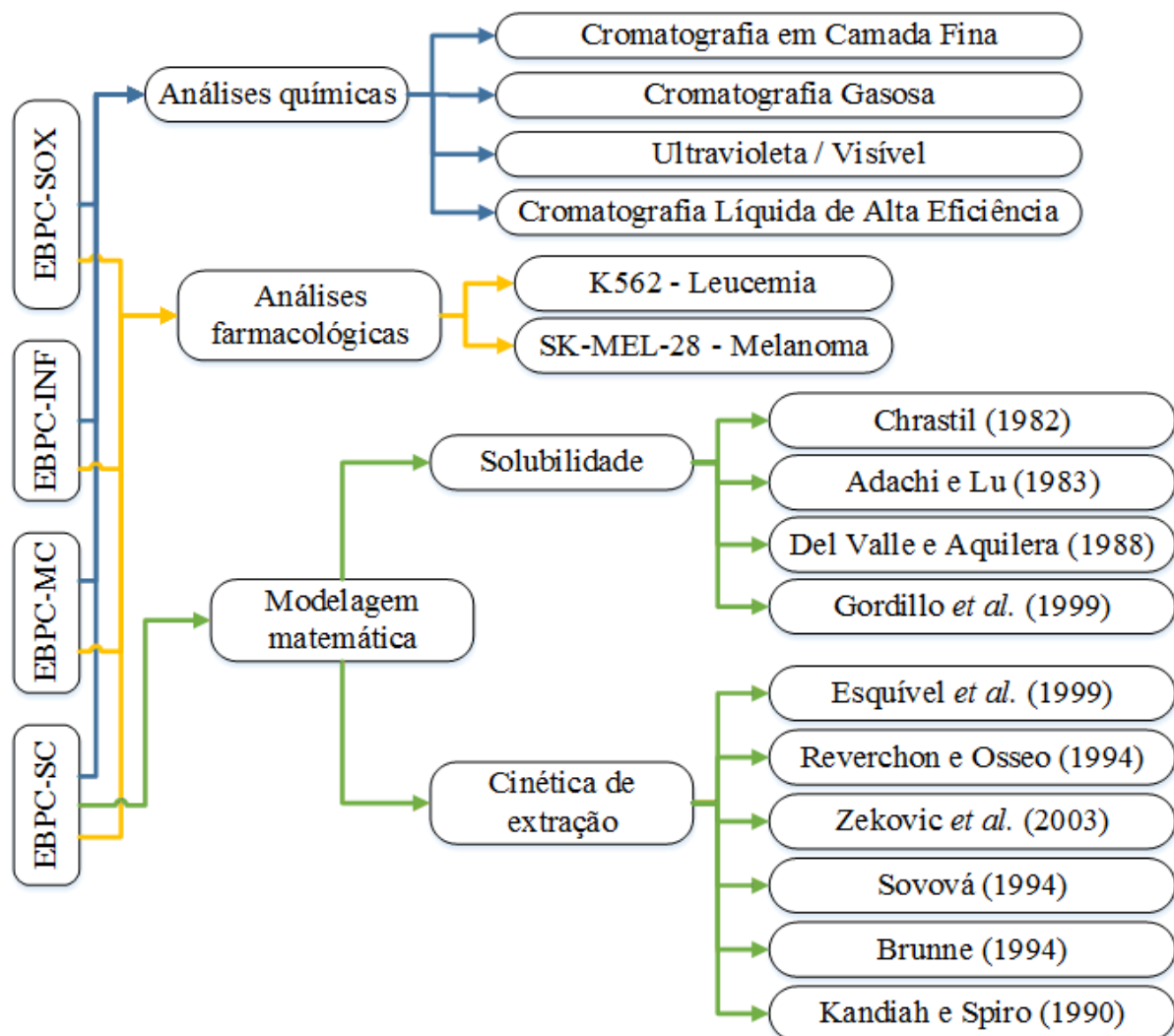


Figura 10: Esquema das etapas após as extrações de *Bidens pilosa*.

### 3.5 Densidade aparente do leito e porosidade do leito

A densidade aparente do leito ( $D$ ) foi calculada pela relação entre a massa da matriz vegetal utilizada para empacotar o leito ( $m_a$ ) e o volume do leito no extrator ( $V$ ), conforme Equação 1.

$$D = \frac{m_a}{v} \quad (1)$$

Já a porosidade do leito ( $\varepsilon$ ) que é determinada pela razão entre o volume de leito que não está ocupado com o material vegetal e o volume total do leito, foi determinada de acordo com a Equação 2, que relaciona o volume de vazios pelo volume total.

$$\varepsilon = \frac{V_l - V_s}{V_l} \quad (2)$$

sendo  $V_l$  o volume ocupado pelo leito e  $V_s$  o volume ocupado pelo sólido.

### 3.6 Teor de Umidade

A umidade do material vegetal, triturado e tamisado, foi determinada através do método gravimétrico com o auxílio de uma balança de umidade da marca Marte (modelo ID50). Este

método foi baseado na perda de peso do material no qual, aproximadamente, 1 g de folhas secas de *Bidens pilosa* foi submetido ao aquecimento a 105 °C. O percentual de umidade é calculado através da diferença entre a massa da amostra inicial e após o aquecimento, em que a massa desidratada permanece constante em 3 medições sequenciais.

### **3.7 Procedimento experimental aplicado na extração convencional**

A obtenção dos extratos foi realizada de acordo com Matos (1997), onde estão descritas técnicas de extração, isolamento e identificação clássica de toda marcha fitoquímica da espécie. De acordo com a classe desejada, devem ser realizadas adaptações. Neste trabalho foram estudados alguns métodos de extração convencional como: maceração dinâmica, em aparelho de Soxhlet e infusão. A descrição dos procedimentos detalhados pode ser observada nos itens a seguir.

#### **3.7.1 Extração por Maceração**

Para a maceração foi utilizado etanol P.A. 99% como solvente, em proporção de 1:10, sendo 10 g (pesados em balança analítica Sartorius BP 221 S) de folhas secas e trituradas, com mesh entre 32 e 60 para 100 mL de solvente. A extração ocorreu por 8 dias, de acordo com a 2ª edição da Farmacopeia Brasileira e corroborada com as monografias presentes no 1º Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1959; ANVISA, 2011). Após o tempo de extração, a mistura foi vertida em um filtro e o resíduo lavado até quantidade suficiente para obtenção do volume inicial. Em seguida, o extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório da marca Büchi (que consiste em um módulo rotatório R215 com módulos controlador de vácuo V850, bomba de vácuo V700 e banho de aquecimento B491). A água residual presente foi retirada em liofilizador da marca Christ (modelo Beta 1-16) e o extrato foi denominado EBPC-MC. A extração foi realizada em triplicata.

#### **3.7.2 Extração em Soxhlet**

O método de extração em Soxhlet usou folhas secas e trituradas de *Bidens pilosa*, com tamanho entre 32 e 60 mesh. Foram adicionados 10 g de folha ao cartucho de celulose Unifil e 100 mL de etanol P.A. 99% em um balão de 250 mL. O aquecimento do mesmo foi realizado em manta aquecedora (Fisatom 22) e conservou-se em refluxo por um tempo determinado. A proporção de etanol para massa de planta foi de 10:1, o tempo de extração foi de 7 horas e a extração foi realizada em triplicata. Os procedimentos foram determinados de acordo com a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2011).

O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório da marca Büchi e, em seguida, o resíduo de água presente eliminado com o uso de liofilizador, conforme descrito anteriormente. Ele foi denominado EBPC-SOX.

#### **3.7.3 Extração por Infusão**

Na produção do extrato por infusão, 10 g de folhas de *Bidens pilosa* (previamente secas em estufa a 37 °C) foram trituradas e tamisadas até tamanho de partícula entre 32 e 60 mesh. Posteriormente, foram submetidas à infusão com água ultrapura em placa de aquecimento (Corning Stirrer) até temperatura de ebulição e deixadas em contato por, aproximadamente, 30 min até que a temperatura ambiente fosse atingida. Foi definida uma proporção de 10% p/v, de acordo com as referências estudadas (BRANDÃO, 2007; CARDOSO, 2013). O extrato foi filtrado com papel de filtro qualitativo, sendo feita a lavagem até atingir o volume inicial (100

mL). Em seguida, congelado, liofilizado, conforme descrito anteriormente, e denominado EBPC-INF. Esta extração foi realizada em triplicata.

No final de cada experimento, após os rendimentos mássicos terem sido calculados, 3 mg de cada amostra foram pesados e diluído para 1 mL com metanol, para que a análise por cromatografia gasosa juntamente com a mistura de hidrocarbonetos lineares fosse realizada. O mesmo extrato diluído também foi enviado para análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

### **3.7.4 Extração por Fluido supercrítico**

#### **3.7.4.1 Procedimento Experimental**

As extrações com fluido supercrítico foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (LTAB) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Primeiramente, o CO<sub>2</sub> (99,998%, White Martins) foi bombeado por uma bomba de alta pressão (Palm modelo G100) a uma vazão de, aproximadamente, 6,04 mL/min, para um extrator de aço inoxidável com um volume de 42 ml. Nesse extrator foram adicionadas telas de 260 mesh no topo e na parte inferior para que não ocorresse a passagem de material vegetal para a bomba ou para a válvula micrométrica, que controla o fluxo e também é usada para o recolhimento dos extratos, não havendo perda de pressão no extrator. Para o controle da temperatura do processo, foi utilizado um banho termostático (modelo Fisatom) e manômetros para medir a pressão durante todo o experimento, localizados na bomba e no topo do extrator e um rotâmetro foi usado para medir a vazão de gás. Todos os equipamentos foram previamente calibrados.

Foram adicionadas 8 g de folhas secas e trituradas (mesh 32 – 60) de *Bidens pilosa* ao extrator. Para uma melhor transferência de massa, foram adicionadas pérolas de vidro junto ao material vegetal, para que assim não ocorresse o empacotamento e a formação de caminhos preferenciais do solvente.

Após isso, foi seguido um protocolo, onde primeiramente foi acionada a bomba externa de ar comprimido (pressão mantida entre 100 e 150 bar), seguida da ligação do banho de aquecimento, para que o mesmo atingisse a temperatura requerida. Nesse momento, o CO<sub>2</sub> foi alimentado ao extrator com o auxílio de uma bomba de alta pressão.

Com os parâmetros programados alcançados, foi preconizado um tempo de 20 minutos de interação entre a planta e o solvente para que houvesse uma expansão uniforme do CO<sub>2</sub> dentro do extrator. A extração foi realizada, de maneira cinética, com intervalos de coleta de 20 minutos. As coletas das frações de óleo foram realizadas através da abertura da válvula micrométrica por meio da técnica de despressurização.

A coleta ocorreu em um tubo de centrífuga de polipropileno, com tampa, previamente pesado, e a remoção do CO<sub>2</sub> da amostra final ocorreu por despressurização. Em seguida, o frasco foi mantido em banho de gelo para que não ocorresse a perda de compostos mais voláteis. Os ensaios foram realizados seguindo um planejamento de experimentos, variando o tempo máximo de extração obtido de acordo com a saturação da matéria prima. O esquema da unidade de extração por fluido supercrítico montada no Laboratório de Termodinâmica aplicada e Biocombustíveis pode ser visualizado na Figura 11.

O óleo obtido na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico foi pesado, e uma parte da amostra foi diluída em metanol, com uma concentração de 1 mg/mL para análise por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa.

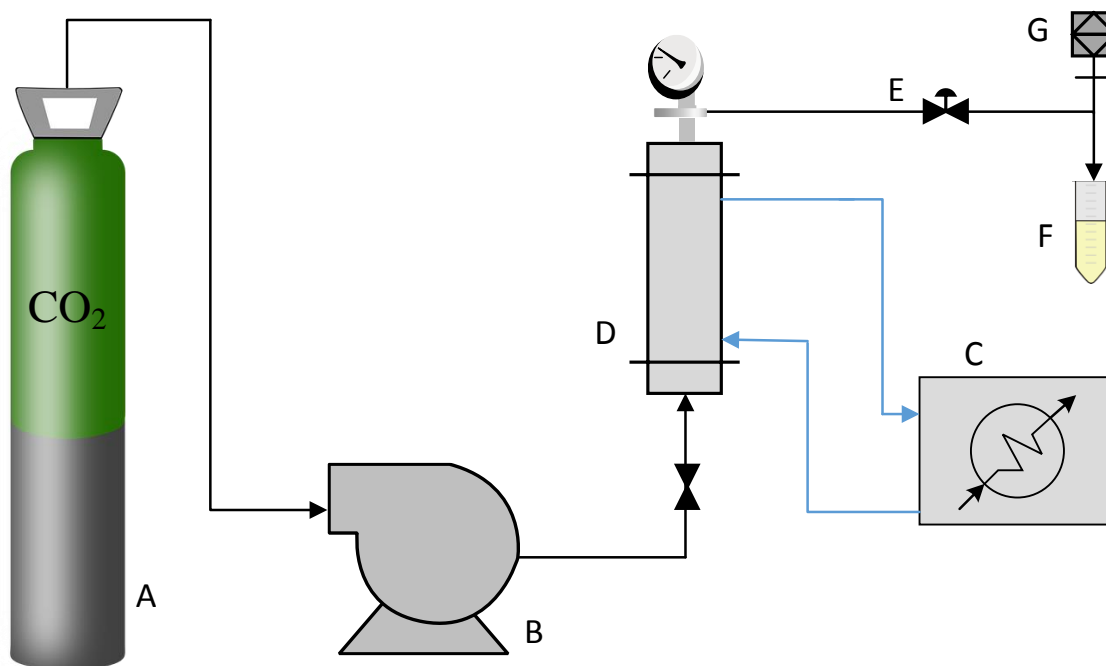


Figura 11: Esquema da unidade de extração supercrítica montada no Laboratório de Termodinâmica aplicada e Biocombustíveis (LTAB), sendo: A: Cilindro de CO<sub>2</sub>, B: Bomba de alta pressão, C: Banho termostático, D: Extrator, E: Válvula micrométrica, F: Coletor de amostra, G: Medidor de vazão.

Fonte: Adaptado de Sartori *et al.*, 2017.

Após a realização de todo o planejamento experimental, uma nova extração foi realizada com a adição de um cossolvente. A mesma foi realizada com a finalidade de comparar os resultados obtidos usando somente CO<sub>2</sub> e usando o CO<sub>2</sub> com etanol como cossolvente. A condição utilizada para essa extração baseou-se no melhor resultado obtido, em rendimento mássico, dentre todas as condições experimentais investigadas. Para isso, 8 g de folhas de *Bidens pilosa* foram umedecidos em 4 mL de etanol PA 99%. Esse volume de solvente foi utilizado por ser uma quantidade capaz de manter o material vegetal umedecido, sem estar em excesso. Em seguida, todo o procedimento foi realizado baseado na descrição no item 4.6.4.1, não sendo realizado o estudo cinético, realizando-se a amostragem após 330 min de extração.

### 3.7.4.2 Planejamento experimental aplicado à extração usando CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico

Foi aplicado um planejamento fatorial composto rotacional (DCCR), utilizando dois fatores: temperatura e pressão para três níveis, onde foi formada uma tabela de níveis reais codificados (Tabela 4).

Tabela 4: Tabela de fatores e níveis correspondentes ao experimento.

Variáveis	- $\alpha$	-1	0	1	$\alpha$
Temperatura	40	46	60	74	80
Pressão	150	179	250	321	350

Com isso, foi criada uma matriz fatorial para as análises, descrita na Tabela 5. Os experimentos realizados para a extração dos ativos das folhas de *Bidens pilosa* basearam-se em

um planejamento experimental, utilizando um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>, incluindo ainda mais 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando assim 11 ensaios (Tabela 5).

Tabela 5: Matriz de Planejamento Fatorial Composto Rotacional aplicada a extração supercrítica de *Bidens pilosa*.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis Independentes	
	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)
1	-1	-1	46	179
2	1	-1	74	179
3	-1	1	46	321
4	1	1	74	321
5	-1,4142	0	40	250
6	1,4142	0	80	250
7	0	-1,4142	60	150
8	0	1,4142	60	350
9	0	0	60	250
10	0	0	60	250
11	0	0	60	250

Os valores das variáveis, temperatura e pressão, foram escolhidos baseados nos estudos apresentados na Tabela 3, de forma que o planejamento DCCR apresente valores inteiros.

As pressões de 150, 250 e 350 bar foram escolhidas para determinar a faixa em que é possível obter uma extração mais seletiva. De acordo com a revisão bibliográfica, sob baixas pressões, existe a possibilidade da extração de substâncias como poliacetilenos e flavonoides, que apresentam alto grau de atividade farmacológica, já que em pressões mais altas, o perfil das substâncias extraídas é de maior polaridade (PINTO *et al.*, 2006). De acordo com a Tabela 3, pode-se observar que as temperaturas utilizadas em trabalhos encontrados na revisão variam de 40 até 80 °C, usando diferentes plantas. Devido a isso, escolheu-se também trabalhar com as temperaturas de 40, 60 e 80 °C.

### 3.8 Métodos Analíticos

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais 4 e no Serviços de Métodos Analíticos de Farmanguinhos - FIOCRUZ.

#### 3.8.1 Cromatografia em camada fina

Os extratos obtidos da extração por fluido supercrítico somados aos 3 extratos obtidos por maceração, em Soxhlet e infusão foram solubilizados na concentração de 1 mg/mL em metanol (MeOH).

Primeiramente, foram realizadas cromatografias em camada fina (CCF) em fase estacionária de gel de sílica 60 RP-18, eluída por fase móvel composta apenas por MeOH. Foram aplicados 10 µL de cada amostra na placa em uma altura de 1 cm e *front* de corrida em 9 cm (chegada do solvente), sendo a amostra aplicada em *spot* em formato de bandas (ponto de aplicação da amostra), em comprimento de 0,5 cm. Todas as placas foram previamente lavadas com o solvente de eluição e, em seguida, secas e ativadas em estufa a 100 °C. A revelação

química dos compostos presentes nas bandas encontradas nas CCFs ocorreu com soluções de anisaldeído sulfúrico, vanilina sulfúrica e NP-PEG. Todas as cromatoplaças foram fotografadas com câmera de 8 megapixel.

O preparo das soluções para revelação química ocorreu da seguinte maneira:

- I. Anisaldeído sulfúrico: 0,5 mL de anisaldeído (Aldrich, 98%) foi misturado com 10 mL de ácido acético glacial (Vetec, 80%). Após, foram adicionados 85 mL de metanol (Merck, 99,8%) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (Vetec, 97%), nesta ordem. A placa foi borrifada com 10 mL e aquecida a 100 °C por 10 minutos.
- II. Vanilina sulfúrica: 1 g de vanilina (Vetec, 99,5%) foi misturada com 100 mL de ácido sulfúrico 10% (Vetec, 97%). A placa foi borrifada com 10 mL e aquecida a 100 °C por 10 minutos.
- III. NP-PEG: 1 g de 2-aminoetil-difenil-borinato (Aldrich, 99%) foi misturado com 100 mL de metanol (Merck, 99,8%), em seguida, 5 g de polietilenoglicol (PEG) foi solubilizado em 100 mL de etanol (Tedia, 99,5%). A placa foi borrifada inicialmente com a solução de 2-aminoetil-difenil-borinato, e após 2 minutos, foi borrifada com a solução de PEG. Foi observada a fluorescência sob luz ultravioleta a 365 nm.

O cálculo do  $R_f$  foi realizado utilizando uma razão entre a distância que cada amostra percorreu ( $C_a$ ) pelo total de eluição da fase móvel ( $C_{fm}$ ) na placa cromatográfica, ambos em centímetros. O esquema ilustrativo pode ser visualizado na Figura 12.

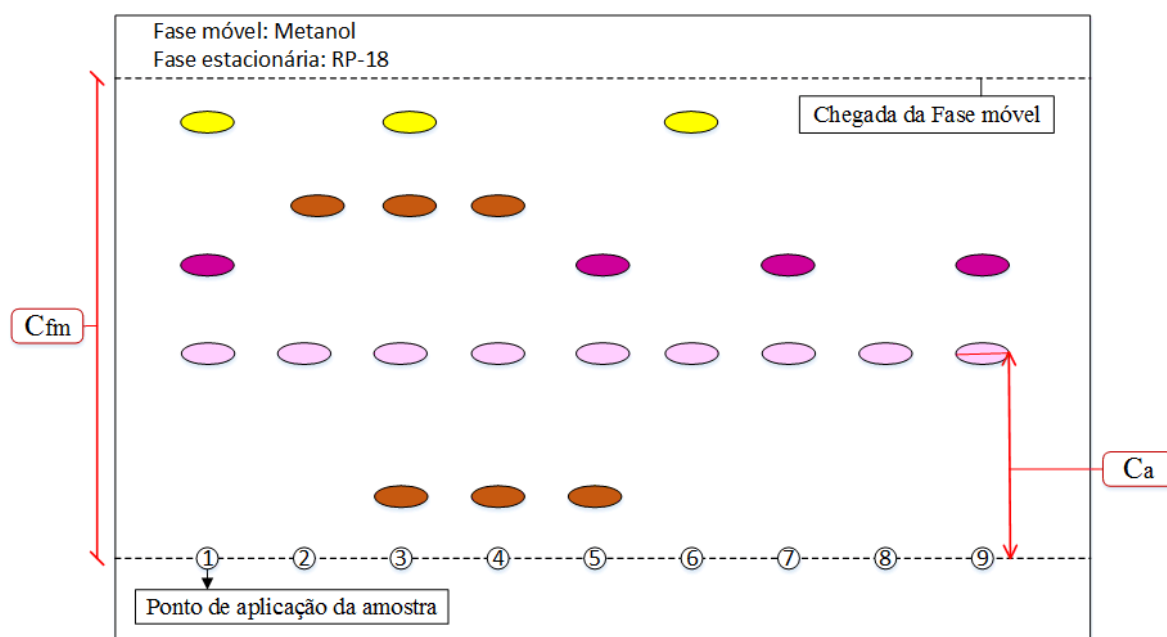


Figura 12: Esquema ilustrativo de uma placa cromatográfica (CCF).

Fonte: Adaptado de Wagner *et al.*, 1984.

### 3.8.2 Análise na região do ultravioleta/visível

Cada extrato foi previamente pesado e solubilizado em solução de 0,2 mg/mL em metanol. Foram utilizadas cubetas de quartzo com volume de 1 mL, e a amostra passou por uma faixa de comprimento de onda de 200 – 700 nm. Esse experimento foi realizado com o objetivo de encontrar os perfis característicos da amostra, sendo observado na Figura 13 um esquema ilustrativo de um espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível.

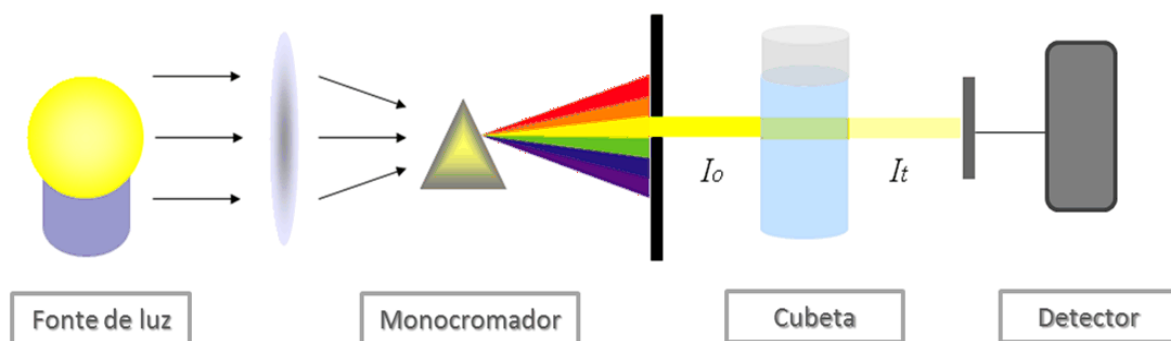


Figura 13: Esquema básico ilustrativo de um espectrofotômetro com detecção na região do ultravioleta/visível.

Fonte: Adaptado de Silverstein, Bassler e Morrill, 1994.

O perfil reproduzido no espectro na região do ultravioleta/visível depende da estrutura eletrônica da molécula, de tal maneira que grupos característicos podem ser identificados mesmo que presentes em moléculas com complexidade variável. Isso ocorre através da passagem dos elétrons de orbitais no estado fundamental para o estado excitado, orbital de maior energia (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1994). O espectro obtido corresponde a um gráfico de comprimento de onda em razão da intensidade de absorção, sendo o seu perfil desenhado devido à presença dos cromóforos ( $C=C$  e  $C=O$ , por exemplo) juntamente com os deslocamentos provocados pelos efeitos de substituição da molécula ou presença de solvente.

O perfil dos poliacetilenos (Figura 14 – B) está relacionado com a presença dos alcenos e alcinos, cujos elétrons  $\pi$  – que sofrem transição  $\pi - \pi^*$  – apresentam bandas de alta intensidade e com estrutura fina. Já para os flavonoides (Figura 14 – A), sua identificação na região do ultravioleta é diferenciada, pois apresenta anéis aromáticos nas estruturas e, com isso, se diferencia da maioria das demais classes de metabólitos presentes na espécie em estudo. As bandas de absorção dos flavonoides estão diretamente ligadas as transições sigma p - p (ocorrem nos anéis aromáticos), exibindo assim duas bandas largas, uma de intensidade mais fraca e outra mais intensa (GRANATO e NUNES, 2016).

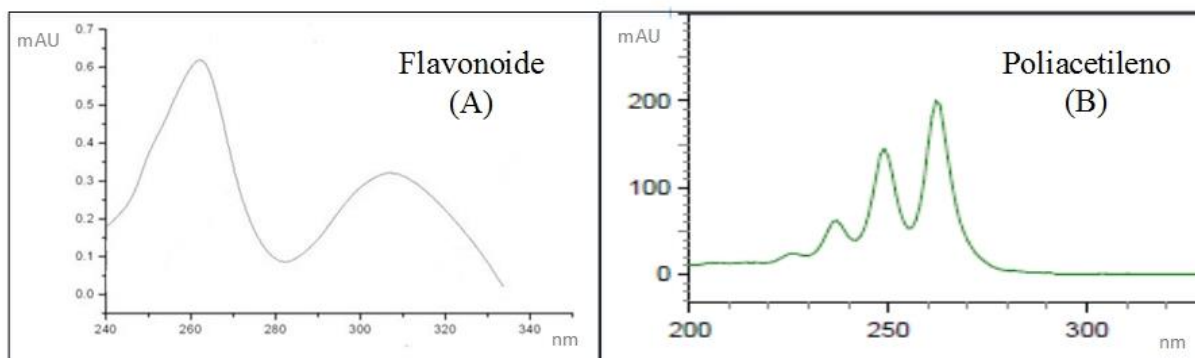


Figura 14: Exemplos genéricos de espectros na região do ultravioleta de flavonoides (A) e poliacetilenos (B).

Fonte: Adaptado de Scott, 1964; Mabry *et al.*, 1970.



### 3.8.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

Inicialmente, todos os extratos foram solubilizados em concentrações de 1 mg/mL em metanol 99,9% (Merck), sofrendo uma leve agitação em agitador vortex e, em seguida, deixados por 2 minutos em banho ultrassônico. Após estarem totalmente solúveis, as amostras foram submetidas à filtração em membrana de celulose regenerada - PVDF de 0,22 mm, das quais o volume de injeção no aparelho foi de 10 µL.

Foi realizado um desenvolvimento de método cromatográfico para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência pelo Serviço de Métodos Analíticos (SMA), tendo como condições cromatográficas iniciais: gradiente crescente de metanol (fase B) em água acidificada com ácido fórmico pH 2,5 (0,01%) (fase A) – que pode ser observado na Tabela 6 – sendo injetados em fluxo de 0,5 mL/min. O aparelho utilizado é composto por um cromatógrafo Shimadzu com duas bombas LC-20ADXR, acopladas ao detector de arranjo de diodo (SPD-M20A). Utilizou-se uma coluna kinetex C18 100A 2,6 µm (100 x 2,1 mm) e acondicionada a 30 °C em forno CTO-20AC.

Tabela 6: Gradiente de eluição da fase móvel desenvolvido para a técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (min)	Módulo	Comando	Valor (%)
0,01	Bomba	Fase B	10
0,01	Bomba	Fluxo total	0,5
4,00	Bomba	Fase B	10
8,00	Bomba	Fase B	40
13,00	Bomba	Fase B	40
19,00	Bomba	Fase B	80
25,00	Bomba	Fase B	80
31,00	Bomba	Fase B	10
35,00	Bomba	Fase B	10

As análises foram monitoradas em comprimento de onda de 210, 220, 235 e 280 nm. Seus respectivos espectros na região do ultravioleta provenientes dos sinais cromatográficos foram comparados com os encontrados em artigos científicos e livros de referência para, assim, determinar as classes presentes nos extratos.

### 3.8.4 Cromatografia em fase gasosa acoplado à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento Hewlett-Packard 6890 acoplado a um detector de massas Agilent 5973 Network, com injetor tipo *split/splitless* (270 °C) com divisão de vazão de 1:5, utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme), empregando-se hélio como gás de arraste com vazão de 1 mL/min e com fluxo constante. A programação do forno iniciou em 50 °C, seguida de aquecimento, a uma taxa de aquecimento de 20 °C/min até 250 °C, com isoterma final de 15 minutos (NAKAMURA, 2016; SIANI *et al.*, 2016). O volume de injeção foi 1,0 µL.

Para a identificação dos constituintes, estabeleceu-se os seguintes parâmetros de integração: área inicial rejeitada = zero; largura inicial do pico = 0,20; detecção de ombro = desligado; limite de detecção = 17 a 19. Os índices de retenção (I) foram calculados com

referência a uma sequência linear de n-alcenos C8-C36 (ADAMS, 2007). Os componentes individuais dos óleos fixos foram caracterizados por comparação dos espectros de massa na biblioteca do aparelho (Wiley Library Software 7N) e também por comparação com espectros de massas disponíveis na literatura (GROMBONE-GUARATINI *et al.*, 2005; DEBA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011; BARTOLOME *et al.*, 2013). A quantificação foi realizada pela concentração relativa obtida por integração eletrônica pelo método de normalização da Farmacopeia Brasileira (2011).

### 3.9 Ensaios de viabilidade celular

O efeito dos extratos de *Bidens pilosa* (com e sem etanol) sobre a proliferação das células de linhagens de melanoma SK-MEL-28 e de leucemia mielóide crônica K562 foram conduzidos conforme Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL003 versão 01; Farmanguinhos – FIOCRUZ). Primeiramente, os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO; SIGMA) e armazenados na temperatura de - 20 °C. As células foram cultivadas em DMEM (SK-MEL-28) ou RPMI 1640 (K562), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µ/L de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,05mg/mL de gentamicina, e mantidas em fase exponencial (log) de crescimento. Vinte e quatro horas antes do tratamento com as amostras, 100 µL da suspensão celular ( $5 \times 10^4$  células/mL) foram adicionadas às placas de 96 poços e mantidas em estufa com atmosfera 5% CO<sub>2</sub> à 37 °C.

O tratamento com os extratos foi realizado nas concentrações de 0,015; 0,15; 1,5; 15; 150 µg/ml, em triplicata. Staurosporina (SIGMA, 5 µM) foi utilizada como controle de inibição da proliferação. Após 48 h, foi adicionado o azul de tiazolil ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]-MTT (2,5 mg/mL) e as placas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> por mais 4h. O MTT é convertido em formazan (produto de cor roxa) pelos transportadores mitocondriais de elétrons da cadeia respiratória, e sua presença no meio reacional é um indicador de viabilidade celular (MOODLEY *et al.*, 2014). Finalizado o tempo de incubação, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan solubilizados com DMSO. Após solubilização, a densidade óptica foi determinada em leitor de microplacas a 540 nm (Victor X5; Perkin Elmer, USA). Foi utilizada a equação 3 para o cálculo da viabilidade celular, utilizando OD<sub>amostra</sub> para a densidade ótica da amostra e OD<sub>controle</sub> para a densidade ótica do controle utilizado. O IC50 foi calculado utilizando o software Graph Pad Prism (Versão 5.01). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular, com supervisão do Dr. André Sampaio.

$$CVC \% = \frac{OD \text{ amostra}}{OD \text{ controle}} \times 100 \quad (3)$$

## 4- MODELAGEM MATEMÁTICA

As curvas cinéticas de extração, que relacionam massa extraída ou rendimento em função do tempo, são características do processo de extração, mas variam de acordo com a matéria-prima estudada. Por isso, é importante que se encontre modelos matemáticos que representem o comportamento da extração de qualquer planta ou material sólido. Diante disso, as curvas experimentais foram representadas pelos modelos matemáticos mais estudados na literatura, além dos modelos de solubilidade que ajudam a otimizar as condições de temperatura e pressão.

### 4.1 Cinética de extração

Diversos modelos estão presentes na literatura e são baseados nas formas das curvas experimentais de extração. As mesmas, geralmente são expressas pela massa do extrato obtidos em função do tempo de extração ou a massa de solvente utilizado (MARTÍNEZ, 2005; SARTORI *et al.*, 2017). Essas curvas experimentais podem ser utilizadas para determinar diversos parâmetros, como: tempo total de extração, caracterização das diferentes etapas da extração (Figura 15), rendimento global de extração, determinação da solubilidade experimental e modelagem da transferência de massa do sistema (SILVA, 2004; CAMPOS, 2005).

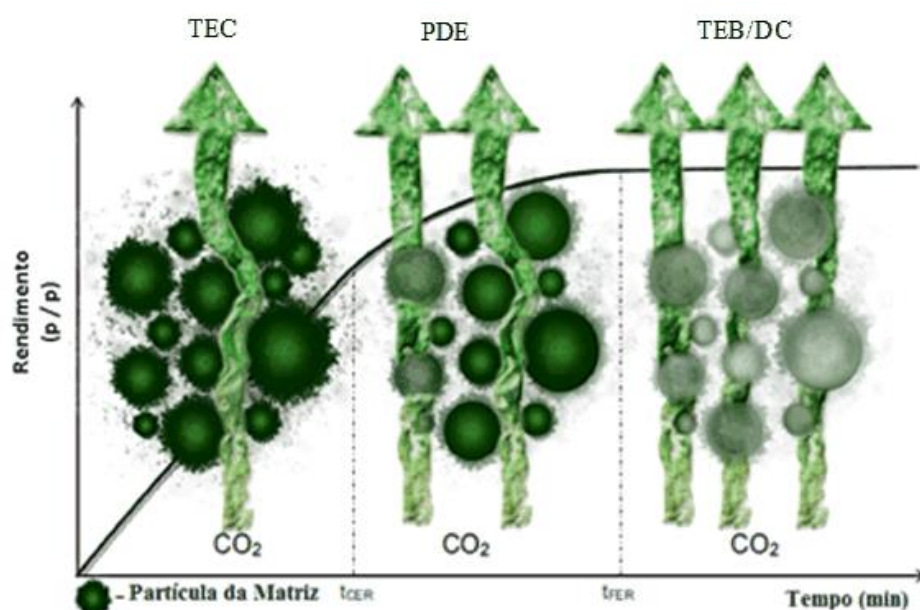


Figura 15: Três períodos distintos da cinética de extração com fluido supercrítico.

Fonte: Adaptado de Silva *et al.*, 2016.

As etapas de extração são divididas em três períodos, sendo eles: etapa de taxa constante de extração (TEC), sendo a primeira etapa, onde a superfície externa das partículas está completamente coberta de óleo e a transferência de massa é controlada pela convecção, estando sua resistência na fase solvente; a segunda etapa ocorre o período decrescente de extração (PDE), onde aparecem falhas na camada superficial de soluto nas partículas. Nesta etapa, ambos os mecanismos de transferência de massa por convecção e difusão competem, sendo caracterizada por determinar a velocidade da extração; o último período é chamado de etapa difusional (TEB/DC – Taxa de extração baixa/Difusão controlada), controlado pela resistência à transferência de massa na fase sólida. Nesta etapa, a transferência de massa ocorre somente

pela difusão do soluto e dentro da partícula sólida devido ao esgotamento de óleo da superfície. Nesse momento, o processo de extração termina.

Foram selecionados alguns modelos na literatura que tentam representar essas três fases do processo de extração. O modelo empírico de Esquivel *et al.* (1999), os modelos de Reverchon e Osseo (1994) e de Zeković (2003), que fazem analogia à transferência de calor, e o modelo de Sovová (1994), que se fundamenta nos fenômenos da transferência de massa. Além disso, também foram selecionados para esse trabalho os modelos de Brunner (1984) e Kandiah e Spiro (1990). Essas escolhas ocorreram devido aos resultados positivos alcançados por trabalhos do grupo de pesquisa e, devido a isso, foram aplicados na dissertação presente por apresentar similaridade com as anteriores (PEREIRA, 2009; SOUZA, 2015; SARTORI *et al.*, 2017).

## 4.2 Modelos Matemáticos

### 4.2.1 Modelo de Esquivel *et al.* (1999)

Esse modelo empírico é baseado na equação da cinética de crescimento microbiano de Monod e foi utilizada por Esquivel *et al.* (1999) para descrever curvas globais de extração do óleo de casca de oliveira. Este modelo não considera as interações entre soluto e a matriz sólida e, com isso, apresenta aplicação restrita em termo de aumento de escala (BARROS *et al.*, 2014).

$$e = e_{\text{lim}} \left( \frac{t}{b+t} \right) \quad (4)$$

Este modelo apresenta a forma geral expressa pela Equação 4, que representa o rendimento da extração “e” (calculado pela razão entre a massa de óleo recuperada em função do tempo e a massa inicial (M) de carga livre de soluto) em função do tempo (t) em minutos. Possui apenas dois parâmetros de ajuste:  $e_{\text{lim}}$  (rendimento após um tempo infinito de extração) e b (parâmetro ajustável dependente da vazão mássica, temperatura e pressão) e não possui significado físico.

### 4.2.2 Modelo de Reverchon e Osseo (1994) e Modelo de Zeković *et al.* (2003)

Os estudos de extração por fluido supercrítico podem ser divididos em três partes, segundo Reverchon e Osseo (1994): a caracterização química dos extratos, a avaliação da influência dos parâmetros de processo e a modelagem matemática. A melhor compreensão da extração, interpolação ou extrapolação das condições experimentais pode ser entendida pela modelagem matemática que realiza uma análise detalhada do processo e uma previsão do comportamento da extração, ambos dentro das condições experimentais trabalhadas.

Em 1996, Reverchon desenvolveu um modelo para a extração de óleos essenciais proveniente das folhas da Sálvia. Seu modelo matemático foi fundamentado em duas equações diferenciais de balanço de massa ao longo do leito e uma equação linear. Os parâmetros importantes na modelagem são: a geometria e a proporção entre a superfície da partícula e seu volume, e a difusividade do soluto no sólido é o único parâmetro ajustável para extração de óleo utilizando CO<sub>2</sub>-SC (SARTOR, 2009).

O autor garante que a fração de óleo livre disponível na superfície não é significativa, sugerindo que a resistência à transferência de massa gerada pela fase sólida é maior que a da fase fluida, sendo então o fenômeno controlado pela transferência na fase sólida (FILIPPIS, 2001).

As curvas de rendimento em função do tempo são representadas, pelo modelo apresentado pela equação 5.

$$Y = 100 \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t}{t_i}\right) \right] \quad (5)$$

sendo Y o rendimento normalizado da extração (%), obtido pela relação entre o rendimento de extração pelo rendimento máximo de extração, multiplicado por 100;  $t_i$ : o tempo de difusão interna (s), sendo o parâmetro de estimação do modelo; e  $t$  o tempo de extração (s).

Já Zeković *et al.* (2003), como pode ser visto na equação 6, propôs uma forma modificada do modelo de Reverchon e Osseo. O mesmo considera o tempo de difusão interna ( $t_i$ ) como uma constante, para certos sistemas de extração, evitando a avaliação dessa variável no modelo.

$$Y = 100 [1 - \exp(at + b)] \quad (6)$$

#### 4.2.3 Modelo de Sovová (1994)

Sovová (1994) desenvolveu um modelo baseando-se na extração por fluido supercrítico do óleo de sementes moídas, onde o mesmo é baseado em balanços de massa que consideram o escoamento do solvente através de um leito fixo de seção transversal cilíndrica (ROSSO, 2009).

O leito é considerado homogêneo no que diz respeito ao tamanho das partículas e à distribuição inicial de soluto. O soluto é encontrado nas células do sólido e protegido pela parede das células. Portanto, partes das paredes são quebradas pelo processo de moagem, deixando uma parcela de massa do soluto livre e exposto ao solvente extrator. Deste modo, o soluto é caracterizado por duas frações, no qual a primeira está referida às células quebradas, classificadas como o soluto facilmente acessível ( $x_p$ ), que está localizado na superfície da partícula e é a primeira fração extraída. Já a segunda refere-se às células intactas – designadas como soluto ( $x_k$ ) e está localizado dentro da partícula sólida (FERREIRA e MEIRELES, 2002; ROSSO, 2009; SARTORI, 2017).

Um modelo relativamente simples é utilizado atualmente por diversos autores devido à capacidade de empregar o coeficiente de transferência de massa da fase fluída para descrever o período de taxa de extração constante, e o coeficiente de transferência da fase sólida para a etapa na qual prevalece a difusão. A curva de extração é dividida em três regiões distintas, sendo: a primeira etapa considera que o soluto de fácil acesso ( $x_p$ ) está disponível na superfície das partículas sólidas e vai se esgotando ao longo do leito; na segunda etapa, o soluto de fácil acesso vai se esgotando e começa a ocorrer a extração de soluto de difícil acesso (TEB), onde  $t_{TEB}$  é o final da etapa de taxa de extração decrescente (s); já na terceira etapa, são extraídos os solutos de difícil acesso ( $x_k$ ) presentes no interior das partículas sólidas, sendo está denominada de etapa difusional.

A curva de extração obtida pelo modelo de Sovová (1994) é representada pelas equações 7, 8, 9 e 10, relacionada a massa total de extrato, na saída do extrator, em função do tempo:

$$e = \begin{cases} qy_r[1 - \exp(-z)], & \text{se } q < q_m \\ y_r[q - q_m \exp(z_m - z)], & \text{se } q_m \leq q < q_n \\ x_0 - \frac{y_r}{w} \ln\{1 + [\exp(w \frac{x_0}{y_0}) - 1] \exp[w(q_m - q)] x_k/x_0\}, & \text{se } q \geq q_n \end{cases} \quad (7)$$

$$q_m = (x_0 - x_k)/y_r z \quad (8)$$

$$q_n = q_m + w^{-1} \ln \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(wx_0/y_r)}{x_0} \quad (9)$$

$$\frac{z_w}{z} = \frac{y_r}{wx_0} \ln \frac{x_0 \exp[w(q-q_m)] - x_k}{x_0 - x_k} \quad (10)$$

sendo  $x_0$  a quantidade máxima possível de sólido extraído;  $q$  a quantidade específica de solvente;  $y_r$  a solubilidade;  $Z$  o parâmetro do período de extração rápida e  $W$  o parâmetro do período de extração lenta.

#### 4.2.4 Modelo de Brunner (1984)

O modelo proposto por Brunner (1984) foi desenvolvido baseando-se na taxa de extração com fluido supercrítico dos óleos de grãos de café e de sementes de colza. Para a extração da cafeína do café, foi abordada uma solução aproximada para as equações diferenciais e uma de estado estacionário aplicáveis a longo prazo do processo de extração. Já no caso das sementes trituradas prevalece a transferência de massa no estado estacionário. O processo de extração em sólidos é dividido em duas grandes etapas, sendo elas: o transporte das substâncias dentro do material sólido para a interface sólido-gás e a transição das substâncias para o gás e o transporte com a maior parte do gás de extração.

Para a extração, foi considerado um leito fixo, onde a transferência de massa é instável e vai diminuindo desde o início da extração até terminar. A equação 11 foi desenvolvida com base em um conjunto acoplado de equações diferenciais que levam em consideração a concentração dependente do tempo, uma força motriz dependente do tempo, um coeficiente de transporte médio e a influência do fluxo do gás.

$$Y_E = x_0 [1 - e^{-kt}] \quad (11)$$

sendo  $Y_E$  o rendimento de extração,  $k$  a taxa constante, e  $t$  o tempo em que a extração do soluto presente no interior do sólido inicia.

#### 4.2.5 Modelo de Kandiah e Spiro (1990)

Em 1990, Kandiah e Spiro avaliaram as taxas de extração do [6]-gingerol provenientes do rizoma de gengibre jamaicano, secos ao sol, em dióxido de carbono supercrítico. Foi observado que, aproximadamente, 80% do composto de interesse foi extraído na primeira seção linear (etapa de extração rápida), enquanto que os outros 20% foram extraídos nas etapas subsequentes.

Spiro e Kandiah (1989) mostraram que a variação de concentração com o tempo pode ser representada por equações de primeira ordem, sendo que Spiro e Selwood (1984) predisseram uma taxa de extração através de um coeficiente de difusão utilizando uma equação no estado estacionário. A cinética de extração com dióxido de carbono supercrítico é muito complexa, e ao ser representada em função do tempo, gera duas retas que se cruzam, tendo a primeira uma inclinação relativamente íngreme e a segunda uma relativamente baixa.

Diante disso, os autores propuseram um modelo que caracteriza um estágio de difusão rápida e um posterior estágio de difusão mais lenta, sendo  $k_1$  e  $k_2$  as constantes para estes dois estágios de difusão (equação 12).

$$Y_E = x_0 \{1 - [f_1 \exp(-k_1 t) + f_2 \exp(-k_2 t)]\} \quad (12)$$

sendo  $f_1$  e  $f_2$  as frações do soluto extraído com as taxas de extração  $k_1$  e  $k_2$ , respectivamente.

### 4.3 Modelos de Solubilidade

Com o propósito de relacionar a quantidade em que um composto possa ser extraído, com uma determinada condição experimental (pressão e temperatura), os modelos de solubilidade surgem como uma grande e importante ferramenta de correlação.

O modelo de Chrastil (1982) foi desenvolvido com o objetivo de corrigir a limitação em que os métodos utilizados para a determinação do equilíbrio de fases possuem em descrever a solubilidade dos compostos extraídos com fluidos supercríticos (DANIELSKI, 2002). Diante disso, em 1982, Chrastil propôs uma equação empírica que correlaciona a densidade e a temperatura com a solubilidade das substâncias que são extraídas. Para tal feito, o autor utilizou modelos que representem um equilíbrio entre as moléculas da partícula sólida e as do solvente (PEREIRA, 2009; SILVA, 2013).

Uma equação simples, que apresenta a necessidade do ajuste de três parâmetros aos dados de solubilidade e os valores de temperatura e densidade experimental, foi validada a partir da extração de compostos como colesterol, ácido oleico, ácido esteárico, tributirina, trioleína, entre outras, em dióxido de carbono supercrítico, tendo uma ótima correlação entre os parâmetros da equação e os dados experimentais, em todos os casos.

Este modelo vem sendo utilizado em diversos trabalhos para prever a solubilidade de diversos metabólitos em CO<sub>2</sub>-SC, uma vez que não apresenta grande complexidade. Sua equação proposta relaciona a solubilidade  $S$  (g soluto/L de solução) com a densidade  $\rho$  (g/L) do fluido e a temperatura  $T$  (K) do sistema, de acordo com a Equação 13.

$$S = \rho^k \exp\left(\frac{a_2}{T} + a_3\right) \quad (13)$$

sendo  $k$ ,  $a_2$  e  $a_3$  os parâmetros da equação.

Diferentes equações para correlação matemática e predição de dados de solubilidade em CO<sub>2</sub>-SC, como equações semi-empíricas baseadas em densidade foram desenvolvidos uma vez que a determinação da solubilidade pelo procedimento experimental é demorada e dispendiosa.

Em 1983, Adachi e Lu propuseram outra equação empírica que pode ser simplificada na seguinte forma, onde  $k$  é expresso como uma função linear da densidade:

$$S = \rho^{(a_1+a_2\rho+a_3\rho^2)} \exp\left(a_4 + \frac{a_5}{T}\right) \quad (14)$$

sendo  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$  e  $a_5$  os parâmetros da equação.

Em 1988, Del Valle e Aquilera modificaram a equação na seguinte forma:

$$S = \rho^k \exp\left(a_2 + \frac{a_3}{T} + \frac{a_4}{T^2}\right) \quad (15)$$

sendo  $k$ ,  $a_2$ ,  $a_3$  e  $a_4$  parâmetros da equação.

Outro modelo empírico de solubilidade bastante utilizado é o de Gordillo *et al.* (1999). Inicialmente desenvolvido para correlacionar o comportamento de solubilidade do óleo de soja e cinco ácidos graxos, seu modelo pode ser definido como:

$$\ln S = c_0 + c_1P + c_2P^2 + c_3PT + c_4T + c_5T^2 \quad (16)$$

sendo  $c_0$ ,  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$  e  $c_5$  parâmetros da equação.

A variação dos dados experimentais e preditos pelos modelos foi feita através do desvio relativo médio (DRM %), calculado através da Equação abaixo, sendo  $N_{exp}$  o número de pontos experimentais utilizados.

$$DRM \% = \frac{100}{N_{exp}} \sum \left| \left( \frac{e_{experimental} - e_{calculado}}{e_{experimental}} \right) \right| \quad (17)$$



## 5- RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos nas extrações convencionais e na extração supercrítica das folhas de *Bidens pilosa*, em relação aos rendimentos de óleo obtidos, assim como os rendimentos por análise gravimétrica baseados na carga livre de soluto referente ao extrato. São apresentadas as análises cromatográficas para cada condição operacional e os testes de atividade antitumoral realizados para as condições de maior rendimento e sua repetição utilizando cossolvente. O comportamento dos modelos cinéticos e de solubilidade são discutidos e avaliados para a extração do óleo de *Bidens pilosa*.

### 5.1 Tratamento do material vegetal

Primeiramente, realizou-se a caracterização do material vegetal, observados nos itens 3.4 e 3.6, medindo-se sua umidade, densidade aparente e porosidade do leito formado pelo mesmo.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados obtidos das análises de porosidade do leito, assim como a densidade aparente. Todas foram realizadas em triplicata e os resultados são a média, junto ao desvio padrão (DP).

Tabela 7: Densidade aparente do leito e porosidade do leito.

Porosidade do leito	Densidade aparente do leito (g/mL)
0,0476 ( $\pm 0,0$ )	0,2580 ( $\pm 0,0$ )

O teor de umidade encontrado foi de 8,57%. Esse valor é importante, visto que a presença de umidade no material vegetal, em altas proporções, diminui o rendimento, pois pode ocorrer uma competição da água com o soluto em detrimento do solvente (SOUZA, 2015). De acordo com a ANVISA (2013), o valor aceito de umidade para uma droga vegetal é abaixo de 12%.

### 5.2 Extração Convencional

Todas as extrações foram realizadas em triplicata e o rendimento (R%) referente ao extrato foi calculado como a razão da massa extraída em função da massa total alimentada (equação 18). Na Tabela 8 são apresentados os valores dos rendimentos obtidos nas extrações convencionais.

$$R\% = \frac{\text{Massa extraída}}{\text{Massa total alimentada}} \times 100 \quad (18)$$

sendo *massa extraída* a massa de óleo extraída com os métodos convencionais e *massa total alimentada* a massa de folha de *Bidens pilosa* adicionada ao extrator.

Foi observado que nas três técnicas de extração utilizadas, a técnica de infusão apresentou maior rendimento (20%) do que a maceração (4,21%) e por Soxhlet (15,13%). As amostras submetidas à infusão e extraídas em Soxhlet apresentaram um rendimento maior do que por maceração, devido ao aquecimento do processo. Em geral, o uso de altas temperaturas na extração auxilia na diminuição da viscosidade do fluido, aumentando sua permeabilidade.

A viscosidade do solvente influencia na extração, de modo que os fluidos com menor viscosidade têm a capacidade de penetrar mais facilmente nos poros existentes nos sólidos,

aumentando sua taxa de difusão, desta forma com o aumento da temperatura, é obtido um aumento da solubilização das substâncias (ZACHI, 2007).

Tabela 8: Rendimentos obtidos nas extrações em aparelho de Soxhlet, maceração e infusão das folhas de *Bidens pilosa*.

Experimento	Soxhlet		Maceração		Infusão	
	Massa (g)	R%	Massa (g)	R%	Massa (g)	R%
1	1,1385	11,38	0,4214	4,20	1,9640	19,58
2	1,5931	15,93	0,4218	4,21	2,1601	21,58
3	1,8086	18,08	0,4340	4,23	2,0339	20,30
<b>Média</b>	<b>1,5134</b>	<b>15,13</b>	<b>0,4257</b>	<b>4,21</b>	<b>2,0526</b>	<b>20,49</b>
<b>Desvio padrão</b>	(± 0,32)	(± 3,42)	(± 0,00)	(± 0,01)	(± 0,00)	(± 1,01)

R% - rendimento padrão ( $M_{\text{extraída}} * 100 / M_{\text{total}}$ )

No sentido oposto, a utilização de altas temperaturas durante a extração pode ocasionar a degradação de algumas classes de substâncias podendo causar, por exemplo, oxidações em carotenoides ou degradação parcial (quebra de ligações) das cadeias de poliacetilenos (OLIVEIRA, 2015; PARAGINSKI *et al.*, 2015). Assim, as análises cromatográficas devem ser realizadas com intuito de verificar a qualidade do extrato obtido.

A quantidade máxima de óleo presente na planta foi considerada tendo como base o valor de rendimento encontrado no Soxhlet (15,13%), mesmo apresentando um rendimento inferior à técnica de infusão. Essa escolha está de acordo com os diversos trabalhos encontrados na literatura que fazem comparação entre a técnica de extração por fluido supercrítico com uma técnica convencional. A extração em Soxhlet apresenta uma maior diversidade de classes químicas extraída devido à realização de ciclos extrativos e o uso do etanol como solvente extrator (CARDOSO, 2013).

### 5.3 Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico

A extração com CO<sub>2</sub>-SC foi realizada em diferentes condições de pressão e temperatura, sendo o rendimento em carga livre de soluto calculado de acordo com a equação 19.

$$e\% = \frac{\text{Massa extraída}}{\text{Massa de carga livre de soluto}} \times 100 \quad (19)$$

sendo a *massa extraída* a massa de óleo extraída com fluido supercrítico e *massa de carga livre de soluto* a massa de folha de *Bidens pilosa* sem a presença desse extrato, que foi previamente calculado pelo método convencional de Soxhlet.

Na Tabela 9 são apresentados os valores de massa nas diferentes condições de temperatura e pressão utilizadas, assim como os seus respectivos rendimentos de extração (R% e e%), os valores da densidade do CO<sub>2</sub> de cada ensaio (ANGUS *et al.*, 1976), seguindo o planejamento experimental.

De acordo com a média dos rendimentos obtidos na extração com CO<sub>2</sub>, e como mostrado na Tabela 9, é possível constatar que os melhores resultados da extração aconteceram nas pressões mais altas. O melhor rendimento, 0,082%, foi obtido na condição de temperatura de 74 °C e pressão de 321 bar.

Tabela 9: Experimentos, massas e rendimentos obtidos da extração de *B. pilosa* com CO<sub>2</sub>-SC.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	Massa (mg)	Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	R (%)	e (%)
1	179	46	2,5	774,7653	0,029	0,035
2	179	74	2,7	553,3886	0,033	0,040
3	321	46	4,0	898,1649	0,049	0,059
4	321	74	6,6	787,5997	0,082	0,097
5	250	40	4,6	879,4600	0,057	0,068
6	250	80	2,7	686,1241	0,033	0,040
7	150	60	1,7	601,6347	0,021	0,025
8	350	60	3,6	863,2806	0,044	0,053
9	250	60	3,3	786,3368	0,041	0,048
10	250	60	3,5	786,3368	0,043	0,051
11	250	60	3,5	786,3368	0,044	0,051

sendo: R (%) – rendimento padrão ( $M_{\text{extraída}} * 100 / M_{\text{total}}$ );

e (%) – rendimento por carga livre de soluto ( $M_{\text{extraída}} * 100 / M_{\text{Carga livre}}$ );

$M_{\text{Carga livre}} (M_{\text{total}} - (M_{\text{total}} * R_{\text{sohxlet}}) / 100$ .

Em ambos os experimentos obtidos com CO<sub>2</sub>-SC, os melhores rendimentos foram obtidos com o aumento da pressão; todavia, o comportamento da extração variou de acordo com as condições experimentais utilizadas, conforme visto na Figura 16.

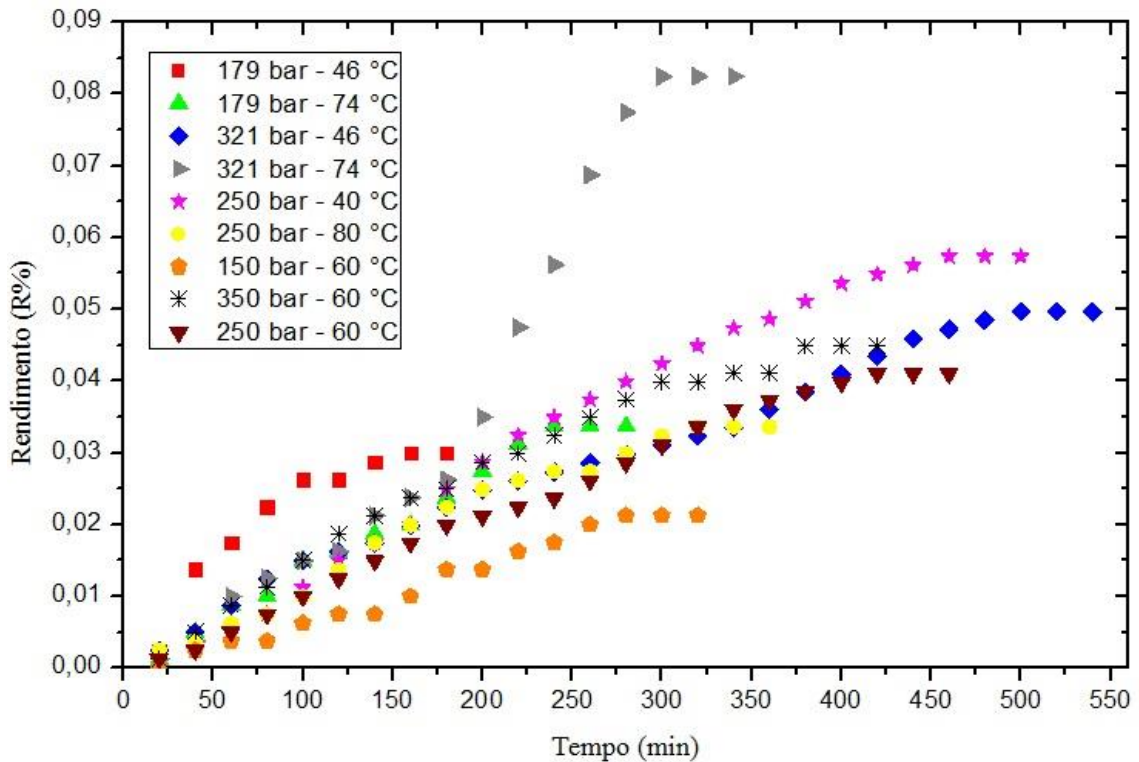


Figura 16: Curvas de extração para todas as condições experimentais presentes no planejamento realizado.

As Figuras 17, 18 e 19 apresentam as curvas cinéticas de extração para as diferentes pressões e temperaturas investigadas, sendo mostradas as comparações entre pressões semelhantes, para melhor visualização dos fenômenos ocorridos. As curvas relacionam rendimento (R%) em função do tempo (minutos) da extração e o tempo final de extração variou conforme as diferentes condições utilizadas no ensaio.

Com relação à variação de temperatura (40, 60 e 80 °C) na pressão de 250 bar, observou-se que, com o aumento da temperatura de 40 a 60 °C, a massa extraída diminuiu 24%, e o mesmo comportamento ocorreu de 60 a 80 °C, com uma diminuição de 23%. Este resultado foi esperado devido à diminuição da densidade do CO<sub>2</sub> quando a temperatura aumentou.

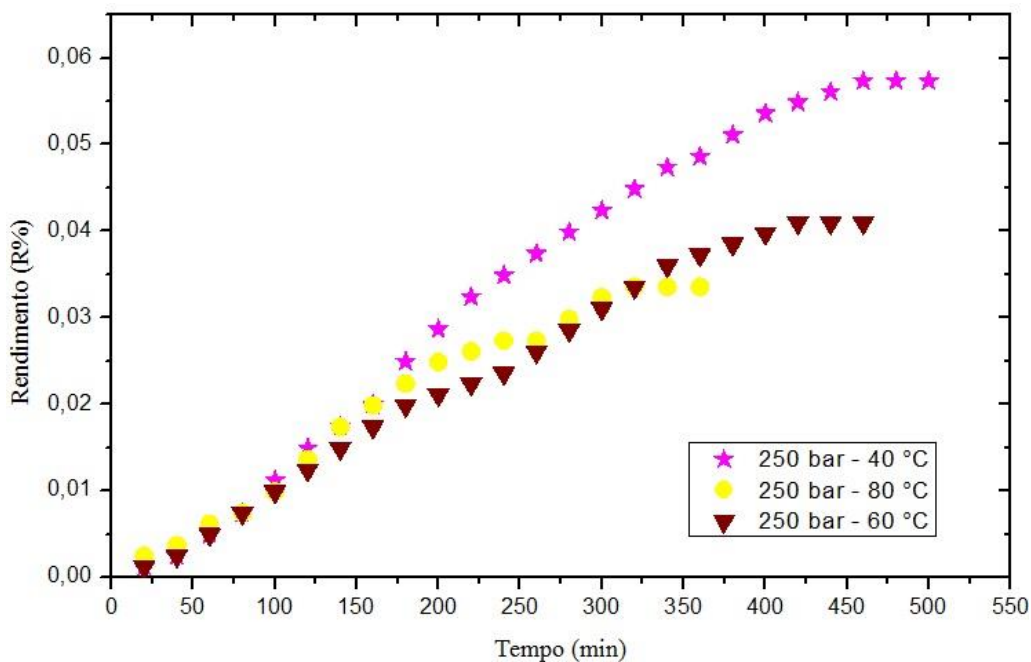


Figura 17: Curvas das extrações para as condições de 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C.

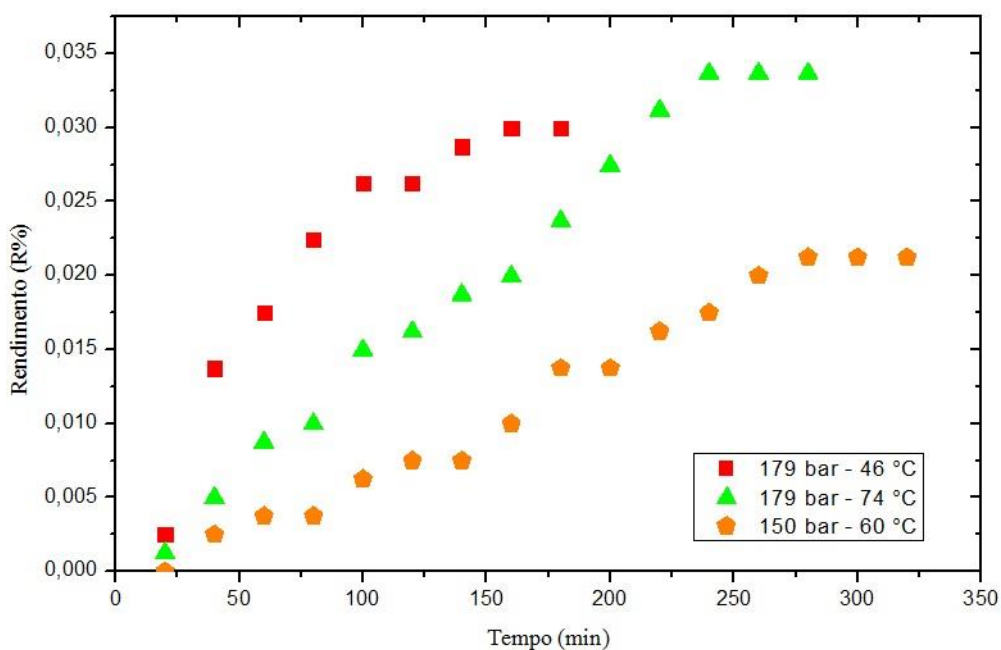


Figura 18: Curvas das extrações para as condições de 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74 °C.

A 250 bar observa-se um *crossover* entre as curvas de 60 °C e 80 °C mostrando os efeitos de competição entre a densidade e a pressão de vapor do soluto, na eficiência de extração. Pode ser observado que até 250 min, na condição de 80 °C, é possível obter um rendimento superior à de 60 °C, sendo o rendimento invertido após esse período de tempo.

Comparando os experimentos realizados a 179 bar com 46 °C e 74 °C, o aumento da temperatura não influenciou tanto no aumento do rendimento, o que significa que a pressão de vapor dos componentes não se alterou significativamente, apresentando apenas um aumento no rendimento de 7,4%. Já para os experimentos realizados em 179 e 321 bar (ambos em 46 e 74 °C), observou-se um aumento do rendimento (66% a 46 °C e 144% a 74 °C) com o aumento da pressão. Isso é causado pelo aumento da densidade de CO<sub>2</sub>, que aumenta quando a pressão também aumenta, mesmo com o aumento da temperatura. Isso ocorreu devido à influência da pressão ser maior do que a temperatura.

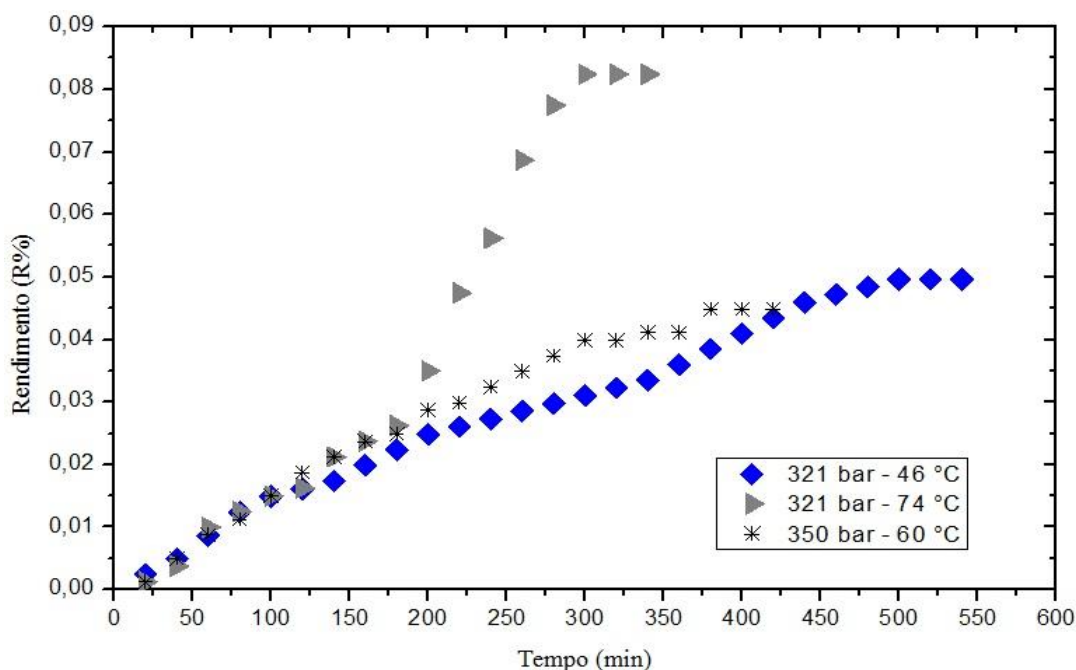


Figura 19: Curvas das extrações para as condições de 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C.

Para os resultados obtidos à temperatura constante de 60 °C, observa-se um aumento no rendimento quando a pressão aumentou de 150 bar para 250 bar (de 0,021% para 0,041%) e de 250 bar para 350 bar (de 0,041% para 0,044%), evidenciando que o aumento da densidade do dióxido de carbono supercrítico promove uma maior solubilização dos compostos, aumentando assim o rendimento da extração. Os resultados obtidos a pressões maiores, 321 e 350 bar, mostraram que o aumento da pressão provoca um aumento no rendimento da extração.

Diante dos resultados obtidos na extração por fluido supercrítico, as variáveis temperatura e pressão (independentes) foram investigadas estatisticamente utilizando 95% de nível de confiança ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ). Para tal, foram calculados os coeficientes de regressão das variáveis estudadas e as suas interações, erro padrão e o  $p$ -valor, sendo todos listados na Tabela 10.

Os valores obtidos de coeficiente de regressão e  $p$ -valor, apresentados na Tabela 10, sugerem que o fator linear da pressão, a interação entre a pressão e a temperatura e a temperatura quadrática foram os parâmetros considerados estatisticamente significativos. Foi possível observar que o  $p$ -valor estava de acordo com o nível de confiança estabelecido ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 10: Coeficientes de regressão, erro padrão e p-valor, obtidos para o rendimento da extração com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	p-valor
(1) Pressão (L)	0,135479	0,019331	0,019758
(1) Pressão (Q)	0,000009	0,000079	0,917002
(2) Temperatura (L)	0,000001	0,000000	0,053035
(2) Temperatura (Q)	-0,003902	0,000434	0,012148
(1) por (2)	0,000007	0,000001	0,010917

Tal comportamento pode ser corroborado com a análise realizada pelo gráfico de Pareto, mostrado na Figura 20. As alturas das barras estão situadas de maneira decrescente e os resultados representam os efeitos das variáveis (t-valor). É observado novamente que o fator linear da pressão é o parâmetro mais significativo, seguido pela interação pressão / temperatura (L) e a temperatura quadrática (Q).

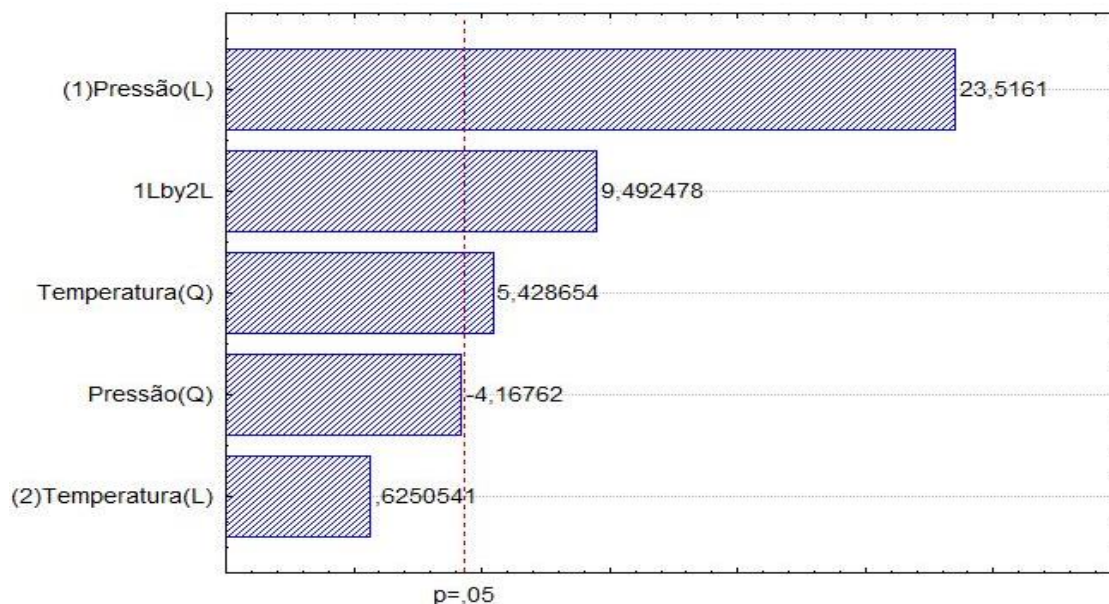


Figura 20: Gráfico de Pareto para a análise do rendimento obtido com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Este resultado corrobora os resultados apresentados anteriormente na Tabela 9, em que as melhores condições de extração do óleo de *Bidens pilosa* foram em condições de pressões e temperaturas mais elevadas. Tendo em vista a avaliação da qualidade do ajuste do modelo, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada com intervalo de confiança de 95%. A Tabela 11 apresenta os valores de F-calculado e F-tabelado, a soma quadrática, média quadrática, graus de liberdade e o p-valor.

Tabela 11: Análise de Variância para o rendimento dos extratos obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F-cal	F-tab	P-valor
Regressão	0,00260	4	6,4918E <sup>-04</sup>	93,9955	4,5336	1,53E <sup>-05</sup>
Resíduo	0,00004	6	6,9065E <sup>-06</sup>			
Total	0,00264	10				

Através do teste F, encontra-se a razão entre o modelo e seu erro, sendo capaz de confirmar a hipótese de que as amostras têm a mesma média (são iguais) e rejeita a que não existe interação entre os 2 fatores (temperatura e pressão). Foi observado que a análise de regressão é significativa, sendo o valor do F-calculado maior que o de F-tabelado ( $93,9955 > 4,5336$ ). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,6276, indicando assim que o modelo é viável para explicar 62,76% da variação total dos parâmetros experimentais observados. Assim, o modelo é válido e apropriado para representar as relações entre os parâmetros selecionados, sendo semelhante aos modelos realizados em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (SOUZA, 2015; SARTORI *et al.*, 2017).

Levando em consideração as variáveis significativas apontadas pelo ANOVA, foi possível gerar um modelo (Equação 20) que descreve as superfícies de resposta para o rendimento de extração, em função da temperatura e pressão. O modelo é válido, visto que  $F_{cal}$  foi maior que  $F_{tab}$  e o p-valor  $< 0,05$  é altamente significativo.

$$y = 0,1354 + 9,3567E^{-6} P + 1,7523E^{-5} T^2 + 7,2937E^{-6} PT \quad (20)$$

sendo  $y$  o rendimento da extração,  $T$  temperatura experimental e  $P$  pressão experimental.

Pode ser observado na Figura 21, a superfície de resposta obtida do rendimento da extração com  $CO_2$ -SC, em função da temperatura e da pressão.

Os resultados propostos pela análise do gráfico de superfície gerado não podem ser comparados com outros trabalhos, visto que não foram encontradas referências utilizando um planejamento experimental na extração de *Bidens pilosa*, utilizando dióxido de carbono supercrítico.

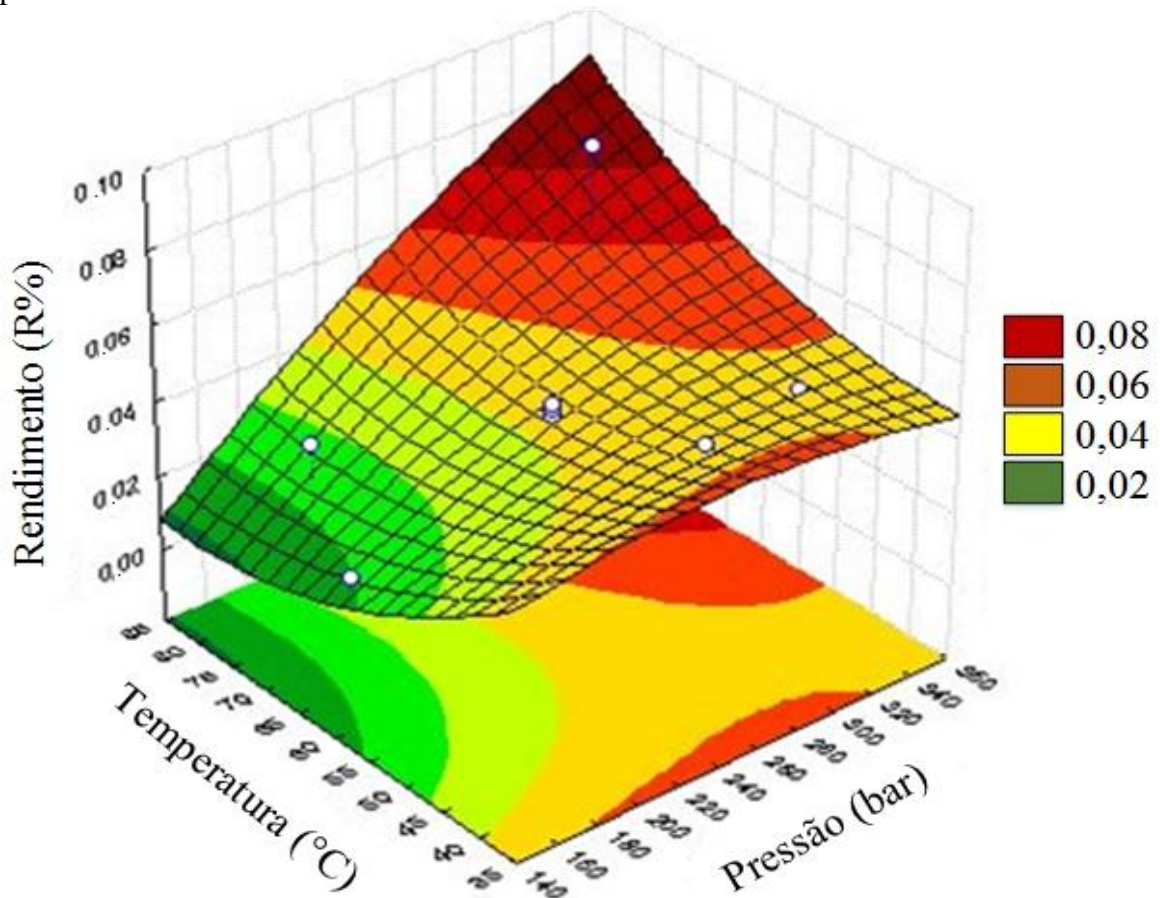


Figura 21: Superfície de resposta relacionando o rendimento da extração em função da temperatura e da pressão.

As respostas apresentadas no gráfico de superfície definem as melhores condições para obtenção de um elevado rendimento. Após análise, foi observado que a região otimizada é localizada em temperaturas e pressões mais elevadas. O gráfico indica que, com a elevação da pressão, o rendimento do extrato aumenta. Já a temperatura é dependente da pressão, sendo possível com o aumento da temperatura obter altos rendimentos em pressões elevadas e sob pressões baixas, rendimentos menores. A interação da pressão com a temperatura em condições elevadas favorece a extração.

#### 5.4 Extração utilizando CO<sub>2</sub> Supercrítico com Cossolvente

O quarto experimento, cujo resultado está presente na Tabela 9, apresentou a maior massa extraída e, por isso, foi escolhido para ser repetido, com uso de etanol PA 99% como cossolvente. Na Tabela 12, podem ser observadas as massas e os rendimentos obtidos.

Tabela 12: Comparação entre as massas e rendimentos das extrações com e sem cossolvente.

Ensaio	T (°C)	P (bar)	Etanol (mL)	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	74	321	0	9,20	0,1148
2	74	321	4	61,20	0,7649

As duas extrações foram realizadas, sem estudo cinético, mantendo o método estático por 330 min e a depressurização ocorreu após esse tempo. Foi observado um rendimento, aproximadamente, 6,6 vezes maior na extração utilizando etanol como cossolvente. Tal resultado era esperado, visto que a utilização do etanol junto ao CO<sub>2</sub> – SC modifica a polaridade do meio, auxiliando na solubilização de compostos com características mais polares, que não são possíveis de serem extraídos nos ensaios com CO<sub>2</sub> – SC puro (BENELLI *et al.*, 2010; TOSS, 2010).

#### 5.5 Análises Cromatográficas

Todos os extratos das folhas de *Bidens pilosa*, por CO<sub>2</sub> supercrítico, maceração, em aparelho de Soxhlet e infusão foram analisados pelas cromatografias em camada fina, líquida de alta eficiência e gasosa. Os resultados são detalhados a seguir.

##### 5.5.1 Cromatografia em Camada Fina (CCF)

A avaliação da composição química por CCF foi realizada com os extratos obtidos nos experimentos realizados com fluido supercrítico. As cromatoplasmas reveladas quimicamente por vanilina/ácido sulfúrico e NP-PEG (a 365nm) podem ser vistas nas Figuras 22 e 23. Os números apresentados nas placas representam 1 (179 bar - 46 °C), 2 (179 bar - 74 °C), 3 (321 bar - 46 °C), 4 (321 bar - 74 °C), 5 (150 bar - 60 °C), 6 (350 bar - 60 °C), 7 (250 bar - 40 °C), 8 (250 bar - 80 °C) e 9 (250 bar - 60 °C).

Pode ser visto, na Figura 22, bandas características de terpenos em todos os ensaios. A coloração violeta está presente nas bandas com R<sub>f</sub> aproximadamente 0,4 em todos os experimentos, apresentando uma coloração mais intensa nos ensaios 3, 4 e 6. O mesmo pode ser observado em R<sub>f</sub> 0,53, com concentração elevada nos ensaios 1, 3, 5, 7 e 9. Essa coloração é característica da classe, após revelação com vanilina/ácido sulfúrico (AIYAKOOL e VAJRODAYA, 2014).



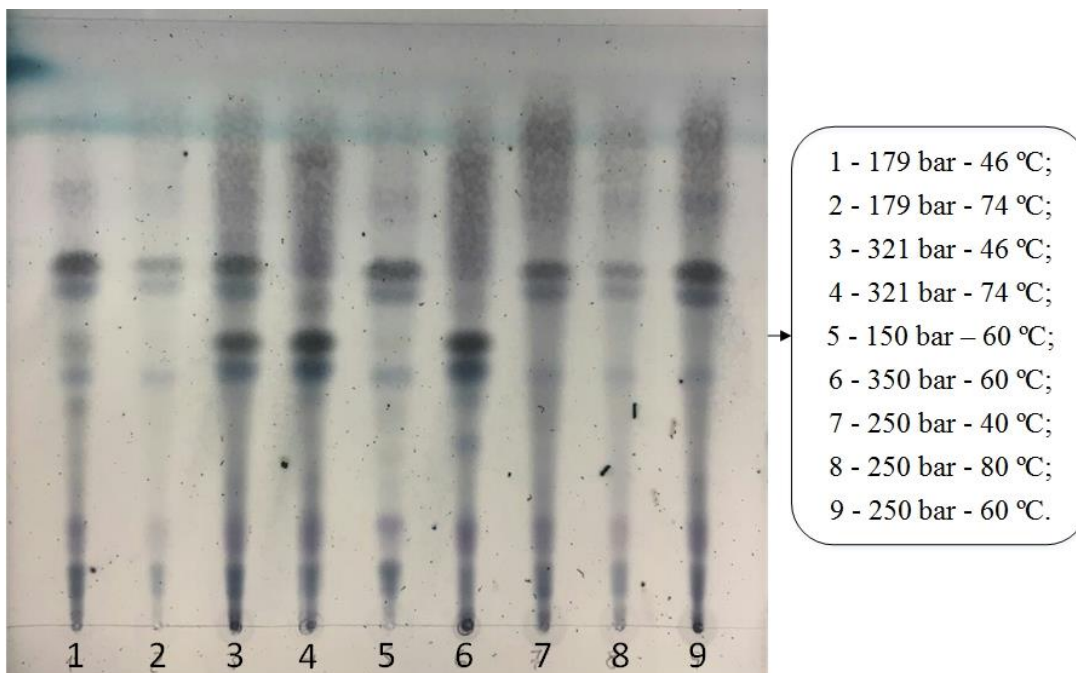


Figura 22: Resultado da cromatografia em camada fina, com revelação por vanilina/ácido sulfúrico, dos extratos obtidos no planejamento experimental da extração por fluido supercrítico.

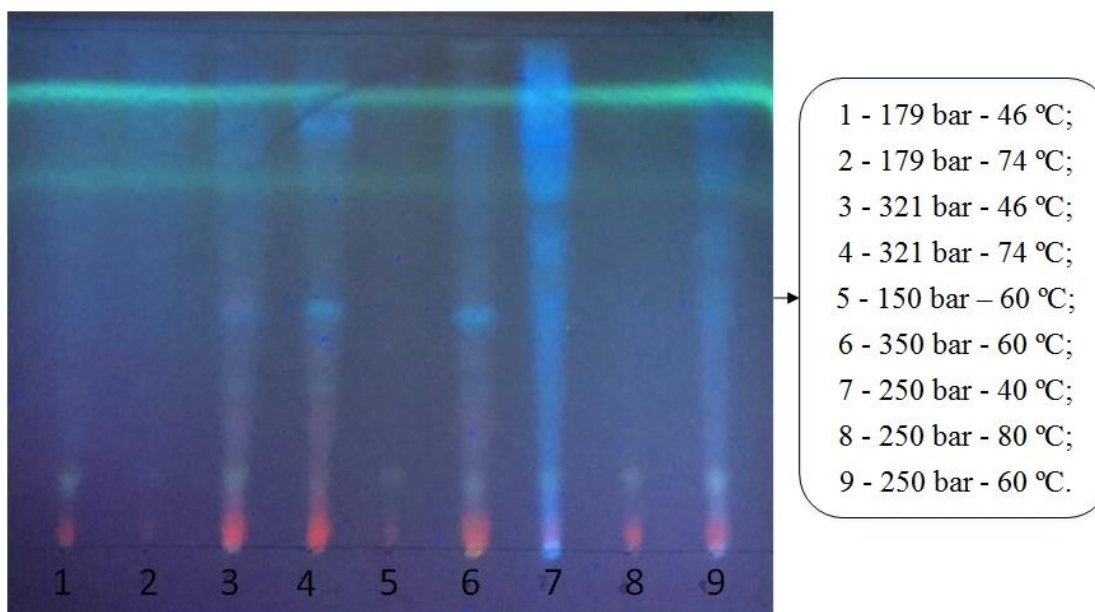


Figura 23: Resultados da cromatografia em camada fina, com revelação por NP-PEG e inspeção sob luz ultravioleta a 365 nm, dos extratos obtidos no planejamento experimental da extração por fluido supercrítico.

Na Figura 23 foi aplicada uma solução de NP-PEG em uma placa de CCF. Tal procedimento é realizado para a identificação da presença de flavonoides, cumarinas e ácidos fenólicos nos extratos obtidos (WAGNER *et al.*, 1984). A princípio, não foram observadas bandas características para classe de flavonoides, geralmente de coloração amarela ou laranja. A ausência dos flavonoides somente poderá ser confirmada após as análises pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, por apresentar maior sensibilidade na identificação das substâncias. Em paralelo, bandas com coloração azul foram observadas em todos os ensaios. O

aparecimento dessa coloração é indicativo da presença de compostos fenólicos (ácidos fenólicos ou derivados cinâmicos) existentes no extrato (CRETU *et al.*, 2013). Da mesma forma foram observadas bandas de coloração vermelha, indicando a presença de clorofila nos extratos. Não é possível afirmar qual substância está presente, pois esse experimento apenas sugere a presença das classes no extrato analisado.

Foi realizada uma comparação entre o ensaio de 321 bar e 74 °C, com e sem solvente, com os extratos obtidos pelos métodos convencionais utilizados. As placas foram reveladas utilizando anisaldeído sulfúrico (Figura 24) e 3 padrões foram aplicados para comparação com os ensaios. Pode ser observado um perfil bastante complexo nos experimentos convencionais (maceração e em Soxhlet), apresentando diversas bandas de colorações variadas, que corroboram com os artigos da revisão, apontando-as como não seletivas. Na infusão, não foram observadas muitas bandas – isso ocorreu devido à interação entre os compostos extraídos e a fase utilizada. Assim, do que foi extraído por essa técnica, as substâncias foram todas carregadas ao *front* de corrida (caráter polar – interação forte com a fase móvel). Quando comparados os perfis das extrações convencionais com a extração por fluido supercrítico, é possível observar uma similaridade na presença de algumas substâncias, porém a EFSC apresentou um perfil mais simples.

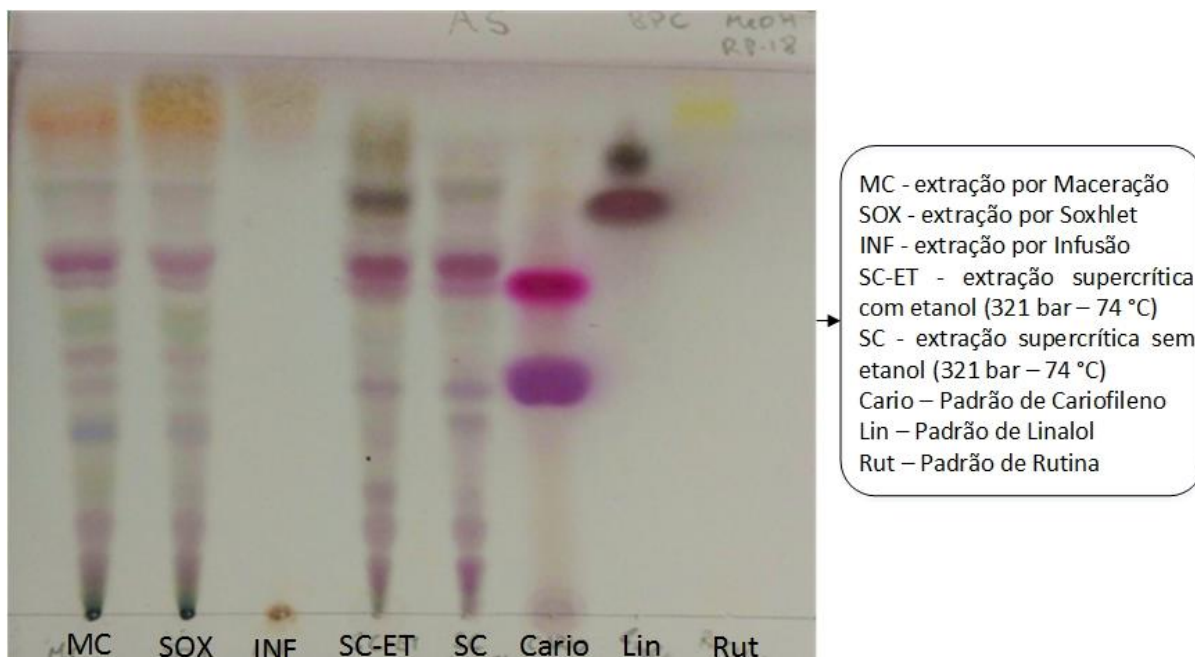


Figura 24: Resultados da cromatografia em camada fina, com revelação por anisaldeído sulfúrico, dos extratos obtidos por maceração, em aparelho de Soxhlet, infusão e com fluido supercrítico nas condições de 321 bar e 74 °C, com e sem etanol.

O padrão de rutina aplicado na cromatografia em camada fina não foi observado nos experimentos por fluido supercrítico, apresentando o oposto do que foi observado nas extrações convencionais. Uma banda com coloração amarelo-laranja e com  $R_f$  de 0,9, aproximadamente, é característico desse flavonoide, utilizando as condições da fase móvel aplicadas, e com isso, é possível sugerir a presença ou ausência do mesmo para cada experimento. Após o resultado obtido, tal fato deve ser confirmado com as análises por cromatografia líquida de alta eficiência realizadas seguindo o protocolo detalhado no item 3.8.2.

Os padrões de terpenos,  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno e linalol, foram observados em todas as extrações. Os cariofilenos apresentaram  $R_f$  de 0,42 (óxido de cariofileno) e 0,57 ( $\beta$ -cariofileno), assim como uma coloração arroxeada, característico da revelação com

anissaldeído sulfúrico (PEREIRA, 2017). Já o padrão de linalol, de  $R_f$  0,75, apresentou coloração marrom, sendo novamente característico do revelador utilizado (WAGNER *et al.*, 1984). A fim de corroborar a presença dos terpenos visualizados na cromatografia em camada fina, todos os experimentos foram encaminhados para análise por cromatografia em fase gasosa, seguindo o protocolo detalhado no item 3.8.3.

### 5.5.2 Análise na região do ultravioleta/visível

Uma análise prévia em espectrofotômetro na região do ultravioleta/visível foi realizada com o intuito de obter informação sobre a absorção de uma amostra mediante a sua exposição a uma faixa de comprimentos de onda. Foi realizada uma análise comparativa dos extratos convencionais de *Bidens pilosa* comparando maceração, em aparelho de Soxhlet e infusão, não tendo sido observada uma grande diferença entre os perfis poliacetilênicos e flavonoídicos. Essa comparação pode ser observada na Figura 25.

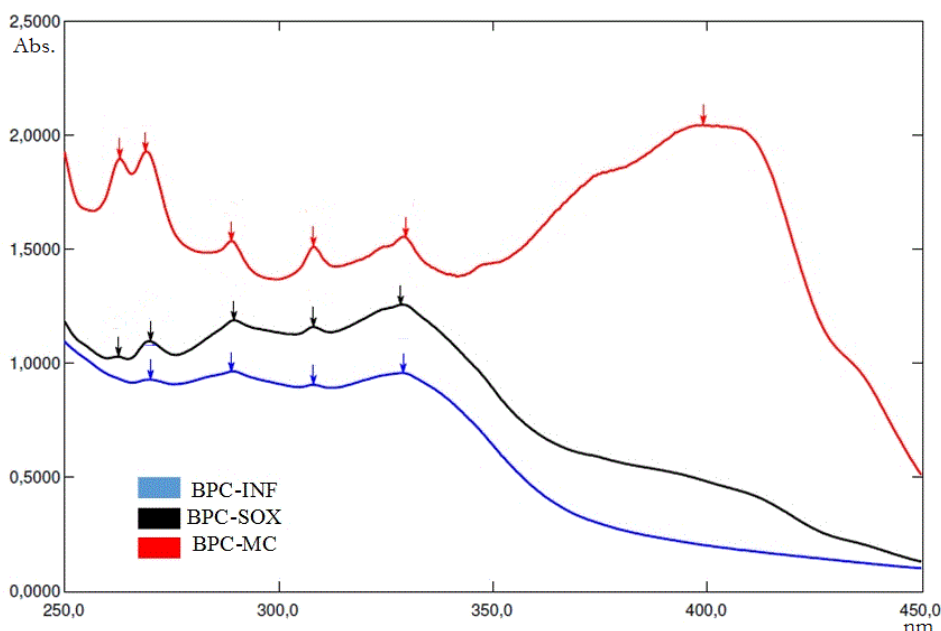


Figura 25: Comparação entre os espectros na região do ultravioleta das extrações convencionais realizadas.

As técnicas de extração convencionais apresentaram curvas espectrofotométricas semelhantes quando comparadas entre si e, em paralelo, demonstraram similaridades às substâncias visualizadas na Figura 14-B. Segundo as referências, a presença de um perfil apresentando picos finos sequenciais é característico de poliacetilenos, sendo então sugerida sua presença nos extratos. Esse fato é visualizado nos espectros acima, com picos nos comprimentos de onda de 263, 269, 289, 308 e 329 nm.

No extrato obtido por maceração, foi observado um perfil de maior absorbância quando comparado aos outros métodos, sugerindo uma concentração mais elevada desses metabólitos e, além disso, sugeriu também um perfil característico de flavonoides, visto que apresentou uma banda de alta intensidade na faixa de comprimento de onda entre 370 e 430 nm (400 nm). Esta classe é sugerida quando o extrato apresenta um perfil típico de morros, apresentando duas bandas, sendo uma com elevação mais intensa e outra de menor intensidade.

Foi realizada uma comparação entre as curvas espectrofotométricas dos extratos obtidos no planejamento de experimentos com  $\text{CO}_2$  supercrítico. É possível observar essa comparação na Figura 26.

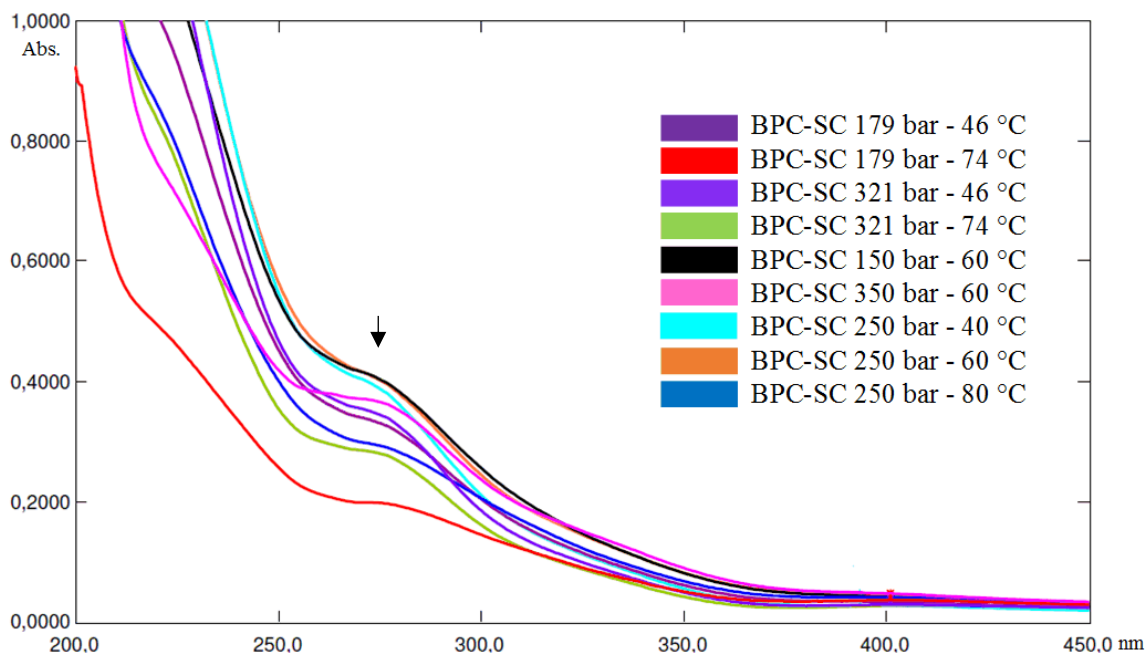


Figura 26: Comparação entre os espectros na região do ultravioleta/visível das extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Foi realizada uma análise referente aos teores das substâncias que apresentaram absorvância em comprimento de onda de 270 nm. A comparação entre as curvas espectrofotométricas no UV/vis dos extratos obtidos por fluido supercrítico apresentou perfis de absorção semelhantes entre eles, porém com maiores intensidades para os experimentos de 150 bar - 60 °C e 250 bar - 60 °C. O extrato que apresentou o menor teor quantitativo das substâncias presentes foi o experimento de 179 bar e 74 °C. Na pressão de 250 bar e com o aumento da temperatura de 40 para 60 °C e de 60 para 80 °C, observa-se uma redução do teor das substâncias extraídas. Tal fato também pode ser observado nas pressões de 179 e 321 bar, onde com o aumento da temperatura (46 para 74 °C) e a consequente redução da densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico, tem-se a diminuição do teor das substâncias que absorvem nesse comprimento específico. Kwiecinski *et al.* (2011) identificaram a presença de poliacetilenos no extrato obtido por fluido supercrítico. Na condição de 250 bar de pressão e 40 °C de temperatura, os autores alcançaram um extrato, após sucessivas extrações, que apresentou um perfil característico de poliacetilenos, quando analisados em espectrofotômetro na região do ultravioleta/visível. Tal fato não foi observado neste trabalho, conforme mostrado na Figura 26, na qual não apresentou perfis característicos de flavonoides e poliacetilenos nos espectros obtidos da extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, de maneira oposta do que foi observado nos perfis das extrações convencionais.

### 5.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

Analisando os extratos convencionais (Soxhlet, maceração e infusão) por CLAE-DAD, foi possível observar sinais que apresentaram perfis característicos de flavonoides e poliacetilenos em seus espectros na região do ultravioleta. De acordo com o método desenvolvido pelo Serviço de Métodos Analíticos de Farmanguinhos (FIOCRUZ), observou-se uma separação no cromatograma formado por grupos de compostos flavonoídicos e os poliacetilenos. Foi constatado que os flavonoides apresentaram sinais nos tempos de retenção de 8 até 14 min (sinais 1 a 7 para Soxhlet, 1 a 3 para maceração e 1 a 5 para infusão); já os grupos formados com compostos poliacetilênicos apresentaram sinais nos tempos de retenção

entre os minutos 16,9 até 23 (sinais 8 a 19 para Soxhlet, 4 a 19 para maceração e 6 a 14 para infusão). São apresentados, nas Figuras 27, 28 e 29, os cromatogramas das extrações convencionais (Soxhlet, maceração e infusão, respectivamente).

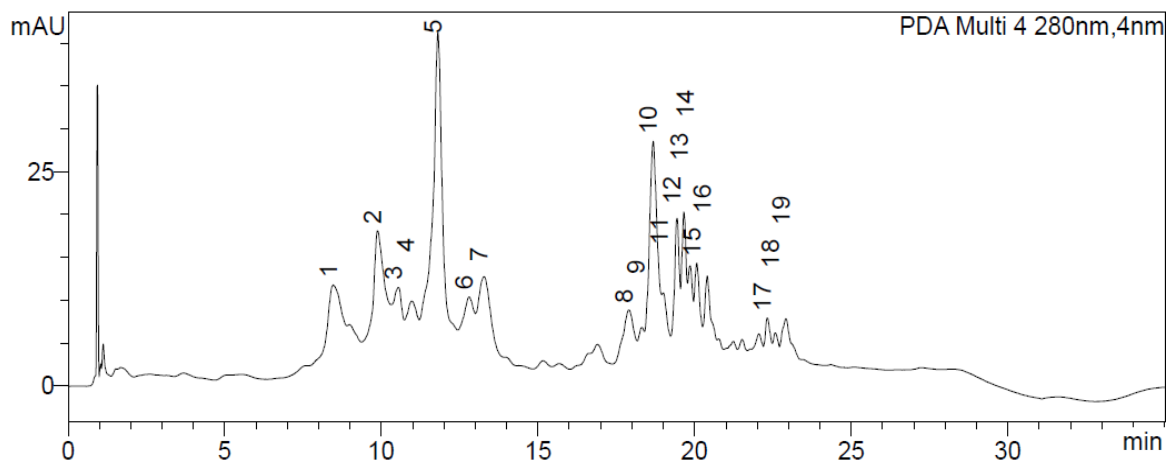


Figura 27: Cromatograma obtido por CLAE-DAD (280 nm) do extrato realizado por Soxhlet.

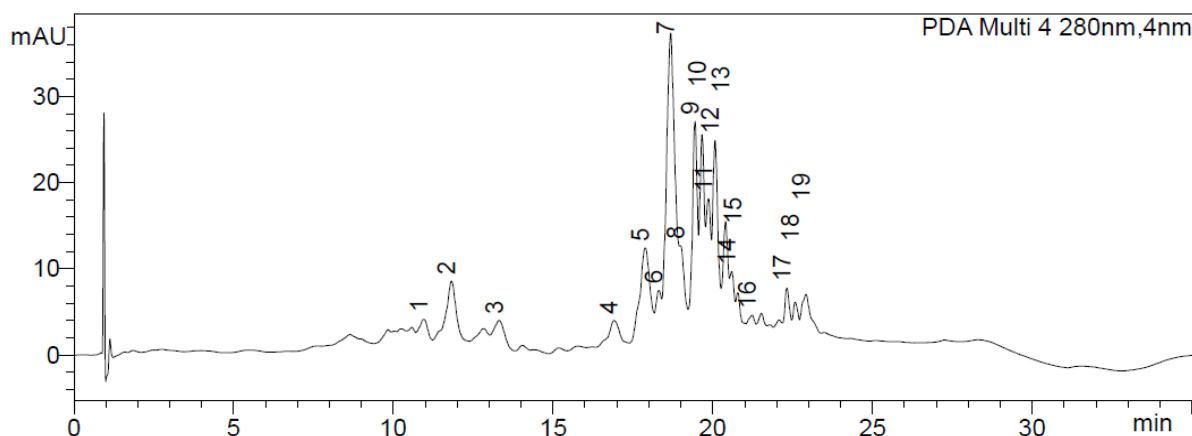


Figura 28: Cromatograma obtido por CLAE-DAD (280 nm) do extrato realizado por maceração.

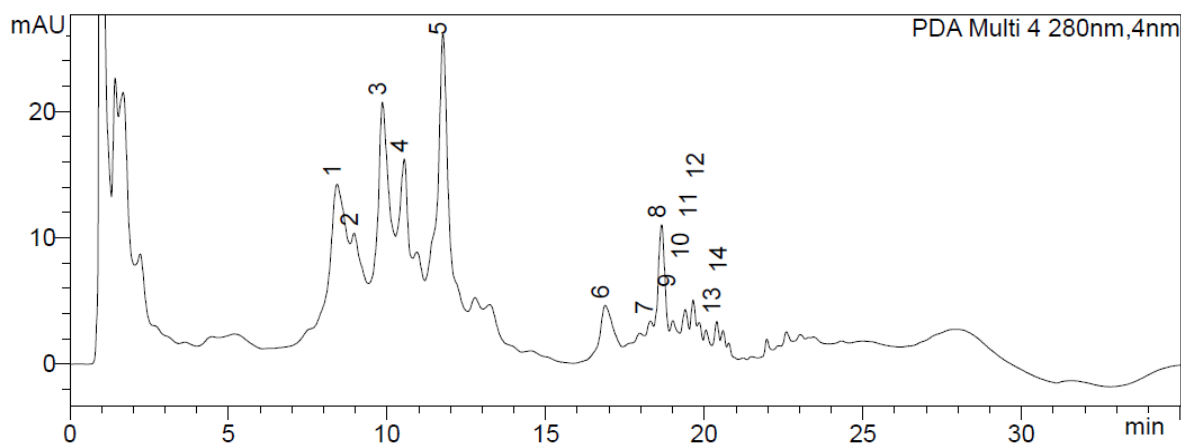


Figura 29: Cromatograma obtido por CLAE-DAD (280 nm) do extrato realizado por infusão.

Deste modo, é possível realizar técnicas específicas de separação, de forma a alcançar extratos ricos de flavonoides e poliacetilenos separadamente. A técnica de extração por Soxhlet

não é utilizada convencionalmente para extração de poliacetilenos, pois a utilização excessiva do calor pode propiciar a degradação dos mesmos (CARDOSO, 2013). Apesar disso, neste trabalho, foi possível identificar a presença de poliacetilenos no extrato realizado por Soxhlet.

Quando realizada uma comparação entre os cromatogramas das extrações convencionais, foram notadas diferenças nos perfis de flavonoides e poliacetilenos. Os maiores teores de flavonoides foram alcançados na extração por infusão, devido à maior polaridade do solvente utilizado e à alta temperatura aplicada nesta técnica. Quando analisado pela presença dos poliacetilenos, a extração por maceração apresentou os maiores teores, uma vez que é uma técnica extrativa que usa solvente de polaridade média, que não utiliza calor durante o processo, diminuindo assim o risco de degradação dessas substâncias.

A extração por Soxhlet apresentou teores de extração médios entre essas classes de substâncias, exibindo maiores teores de poliacetilenos quando comparadas à infusão e maiores teores de flavonoides quando comparados à maceração. Ao mesmo tempo que o calor utilizado e a realização de ciclos com o solvente extrator ajudam na extração dos flavonoides, os mesmos agem de maneira oposta na extração dos poliacetilenos.

A identificação das classes presentes nos extratos foram realizadas utilizando os espectros na região do ultravioleta gerados pelo aparelho, correspondentes a cada sinal cromatográfico apresentado nas Figuras 27, 28 e 29. Na Figura 30 são apresentados exemplos de espectros no ultravioleta dos sinais que apresentaram perfis característicos de flavonoides e poliacetilenos.

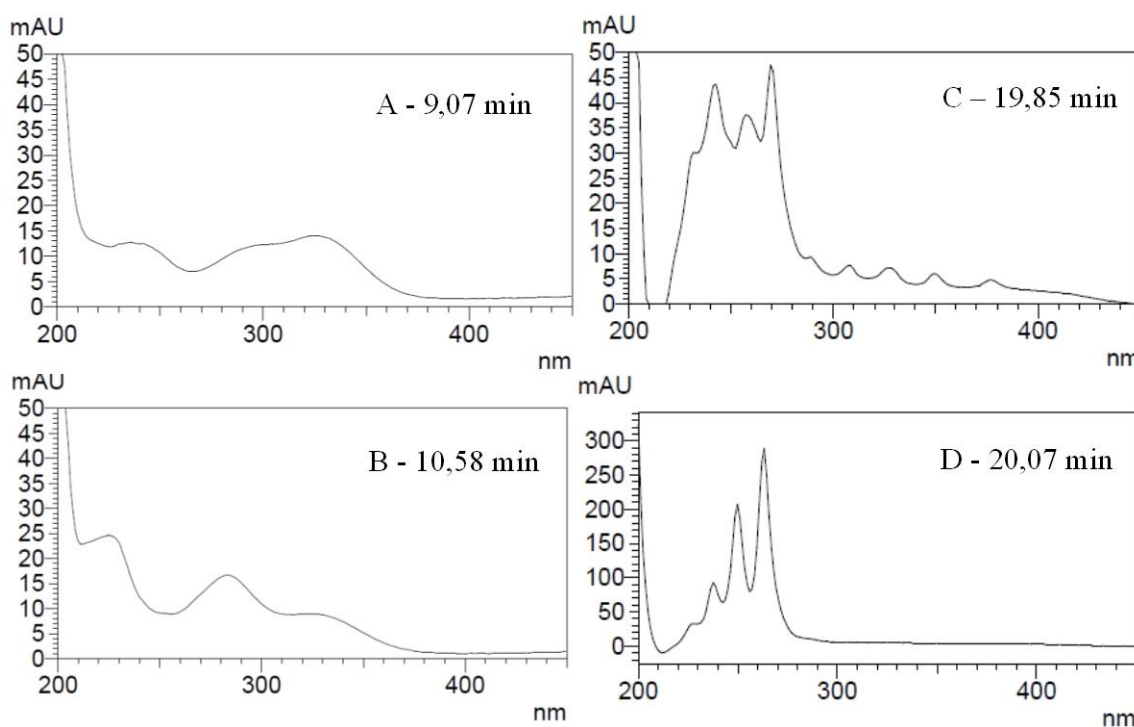


Figura 30: Espectros na região do ultravioleta de sinais obtidos por CLAE-DAD dos extratos convencionais, sendo A e B: representativos de flavonoides e C e D: de poliacetilenos.

Os espectros foram interpretados baseados em referência específica (MABRY *et al.*, 1970), em conjunto com o protocolo descrito no item 3.8.2. Além disso, a comparação dos resultados foi possível de ser concluída visto que, este protocolo de comparação é utilizado em diversos artigos científicos que utilizam a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Desta forma, muitos estudos utilizam esta técnica e descrevem a ocorrência de diversos flavonoides e poliacetilenos em extratos realizados com as folhas de *Bidens pilosa*. Mohamed *et al.* (2014) e Falowo *et al.* (2016)

obtiveram resultados semelhantes para a extração de flavonoides de *Bidens pilosa* utilizando a técnica de maceração, sendo identificados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. O mesmo foi observado por Hsu *et al.* (2009) e Zhang *et al.* (2016) para a técnica de infusão das folhas de *Bidens pilosa*. Os resultados da infusão também foram similares aos encontrados por Gbashi *et al.* (2017): os autores identificaram 28 flavonoides em extratos de *Bidens pilosa*, utilizando folhas secas e extração por água quente pressurizada. Da mesma forma, Chand *et al.* (2018) realizaram um trabalho para identificar as propriedades antioxidantes em treze plantas medicinais usadas em doença de Alzheimer, dentre elas *Bidens pilosa*. Neste estudo, realizou-se extração em aparelho de Soxhlet, de tal forma que possibilitou a identificação de um extrato rico em compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides e poliacetilenos.

As condições de cada método de extração desempenham um papel fundamental na análise de fitoquímicos em materiais vegetais. Com o propósito da identificação das substâncias presentes nos extratos realizados com fluido supercrítico, as análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram feitas de acordo com o procedimento detalhado no item 3.8.3. Portanto, cada extrato foi analisado em relação ao seu perfil cromatográfico e, a partir disso, os espectros no ultravioleta foram gerados para cada sinal. Os resultados podem ser semelhantes às classes encontradas nas extrações convencionais ou os dados podem indicar a presença de novas estruturas. Assim, após 35 minutos de separação pelo método de CLAE-DAD utilizado, foram obtidos os cromatogramas dos extratos realizados com CO<sub>2</sub> supercrítico das folhas de *Bidens pilosa*.

Posteriormente, pode ser comprovado, através das análises realizadas, que o método desenvolvido apresentou um bom desempenho para os diferentes tipos de extrações realizadas. Observou-se também uma separação no cromatograma, obtido em 235 nm, mostrando grupos de sinais de alta e baixa intensidade. Além disso, pode-se notar que os picos de maior intensidade apresentaram sinais nos tempos de retenção de 20 até 24 min; já o grupo formado com picos de baixa intensidade apresentaram sinais nos tempos de retenção entre os minutos 9 até 16.

Os resultados dos cromatogramas obtidos no comprimento de onda a 235 nm ainda que apresentando boa resolução, não puderam ser analisados, visto que não apresentaram perfis característicos de flavonoides ou poliacetilenos. Do mesmo modo, não foi possível identificar quais substâncias estão presentes nos espectros correspondentes aos sinais de maiores concentrações, visto que não apresentaram perfis de boa resolução.

Dessa maneira, os sinais mostrando a abundância relativa dos compostos para cada extração realizada por fluido supercrítico são visualizados nas Figuras 31, 32 e 33, com base no planejamento experimental e estando relacionados ao comprimento de onda de 235 nm.

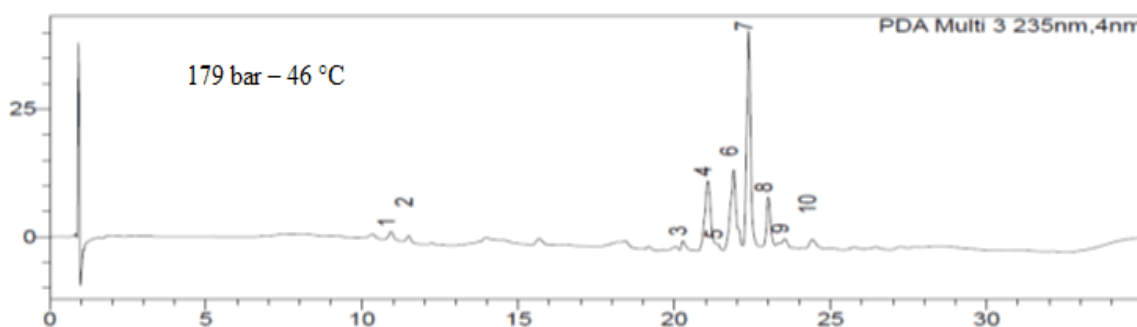


Figura 31: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda de 235 nm do extrato 179 bar e 46 °C obtido por fluido supercrítico.

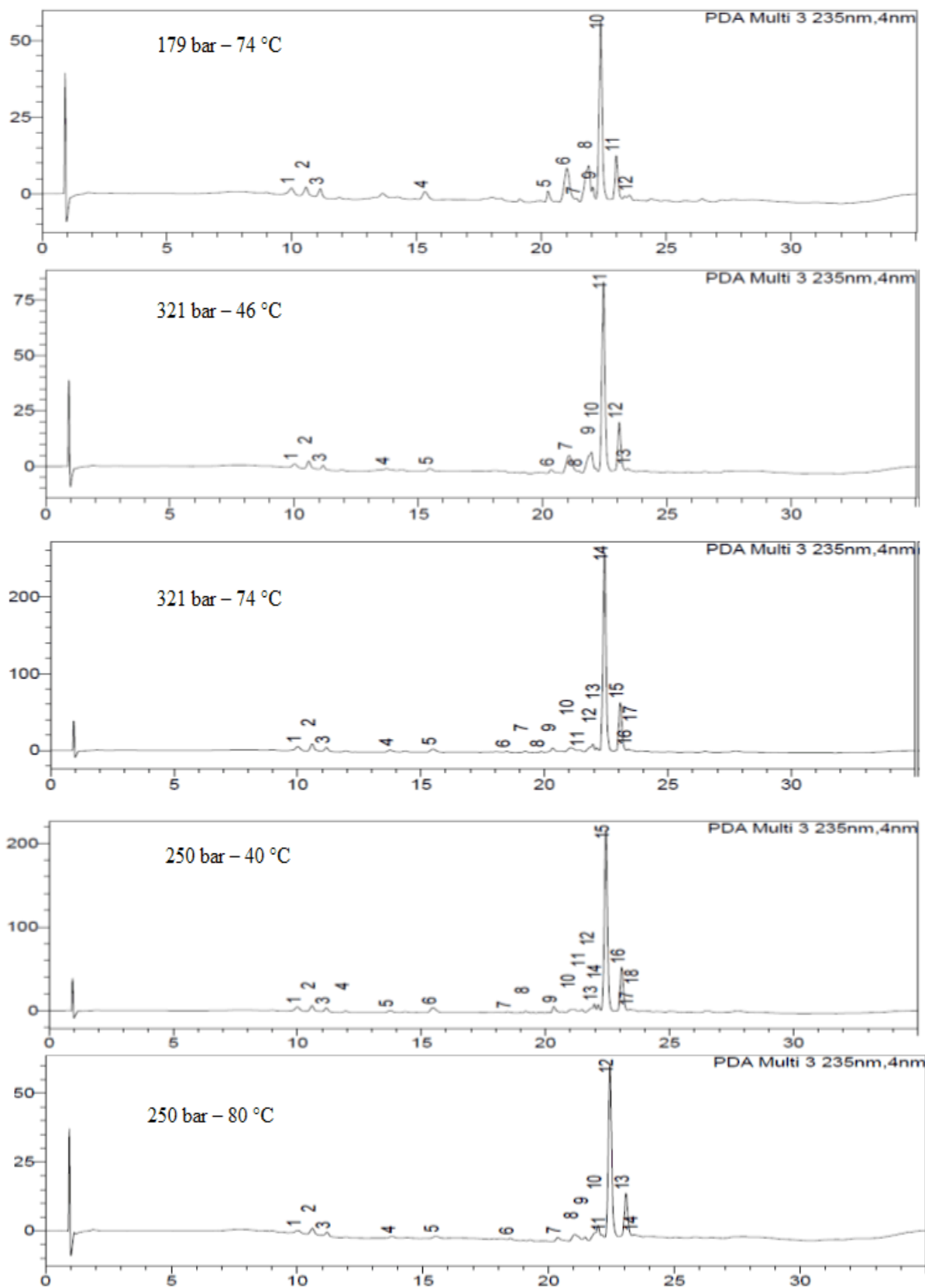


Figura 32: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda de 235 nm dos extratos 179-74, 321-46, 321-74, 250-40 e 250-80 (bar - °C) obtidos por fluido supercrítico.



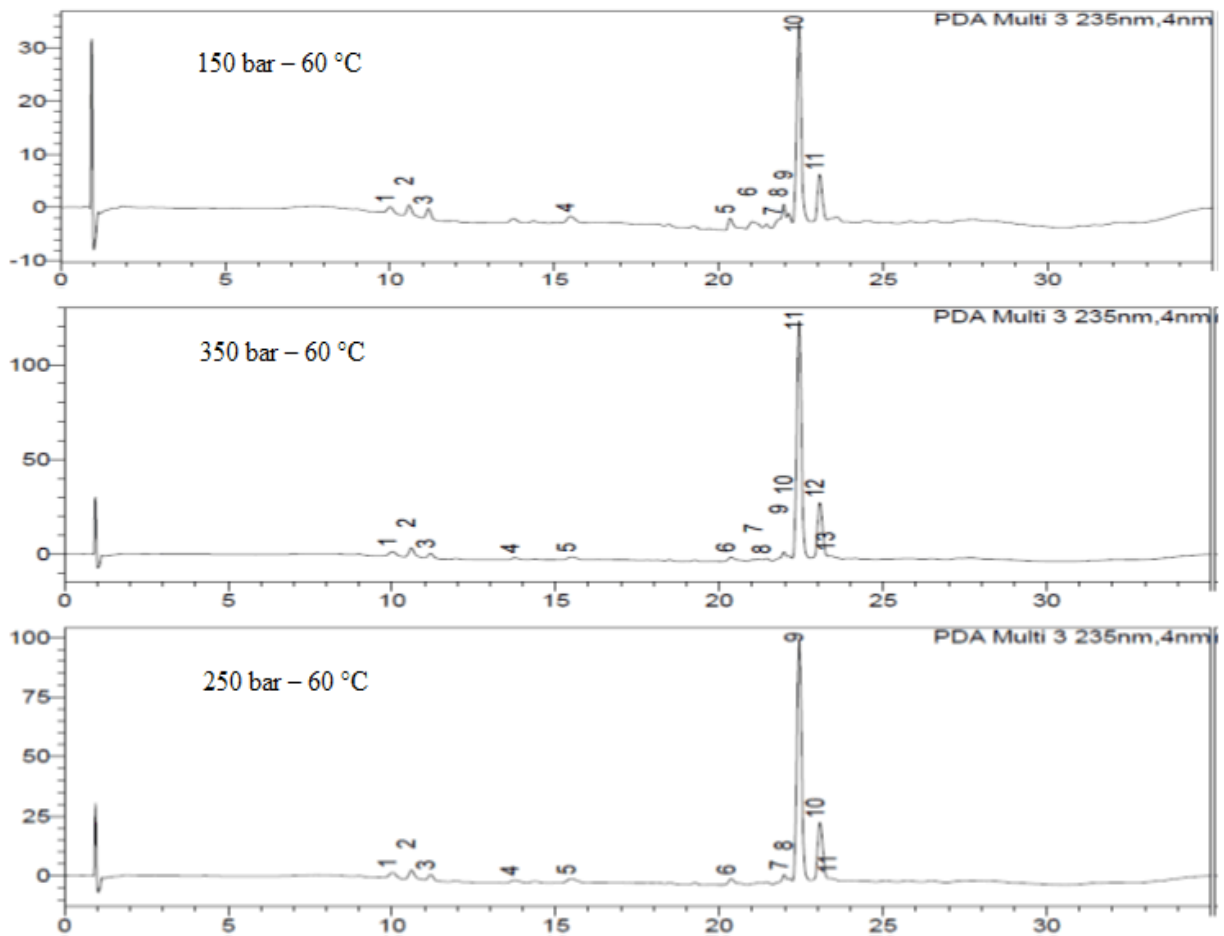


Figura 33: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda de 235 nm dos extratos 150-60, 350-60 e 250-60 (bar - °C) obtidos por fluido supercrítico.

No presente estudo, a extração por fluido supercrítico foi utilizada para extrair um amplo espectro de metabólitos que podem ser encontrados em *Bidens pilosa*, tendo um foco maior em flavonoides e poliacetilenos. Com base nas condições de pressão e temperatura utilizadas, isto é, 40, 46, 60, 74 e 80 °C e 150, 179, 250, 321 e 350 bar, é possível extrair os metabólitos acima mencionados de outras espécies vegetais. Em seguida, seguiu-se a abordagem convencional utilizada em aparelho de CLAE-DAD para a identificação e caracterização das substâncias de interesse nos extratos supercríticos. No entanto, a identificação dos compostos não foi efetiva usando o método para este comprimento de onda analisado. Os espectros dos sinais de maior concentração obtidos nos extratos com CO<sub>2</sub> supercrítico no ultravioleta podem ser observados na Figura 34.

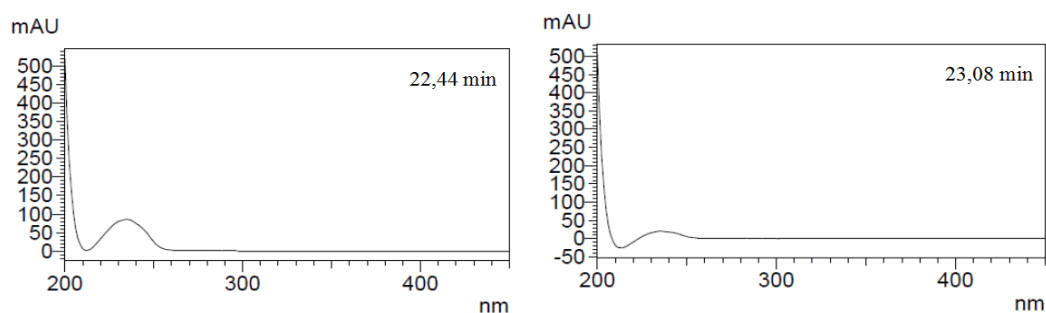


Figura 34: Espectros no ultravioleta dos sinais de maior concentração obtidos nos extratos com CO<sub>2</sub> supercrítico.

A partir dos resultados apresentados, decidiu-se por avaliar outros comprimentos de onda, a fim de identificar as substâncias presentes nos extratos supercríticos. A presença de compostos fenólicos já foi descrita em diversos trabalhos utilizando o material vegetal estudado; assim, com base nos espectros no ultravioleta utilizados como referência, os sinais característicos foram positivamente identificados em dois experimentos. Nas condições de 321 bar – 74 °C e 250 bar - 60 °C foram encontrados sinais cromatográficos característicos de flavonoides. Podem ser observados, nas Figuras 35, 36 e 37, os cromatogramas das condições 321 bar e 74 °C, 250 bar e 60 °C e os espectros no ultravioleta dos sinais com suas respectivas estruturas químicas correspondentes (SILVA, 2006).

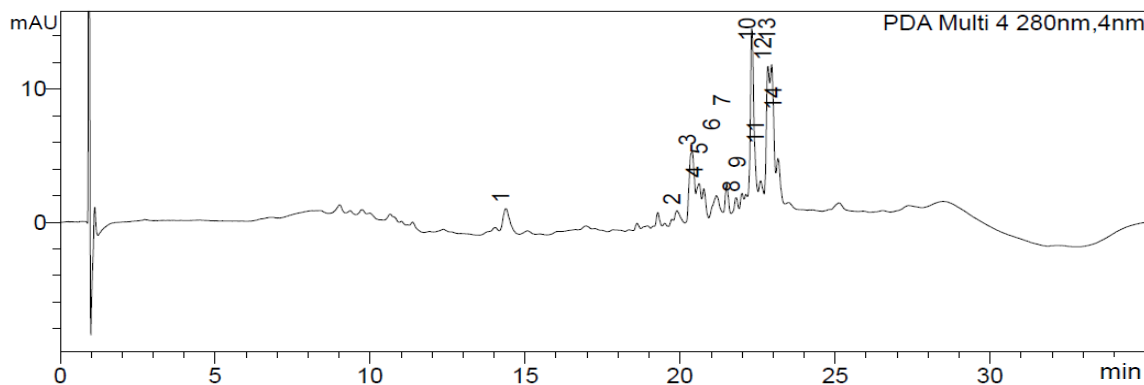


Figura 35: Cromatograma referente ao comprimento de onda de 280 nm do extrato supercrítico na condição de 321 bar e 74 °C.

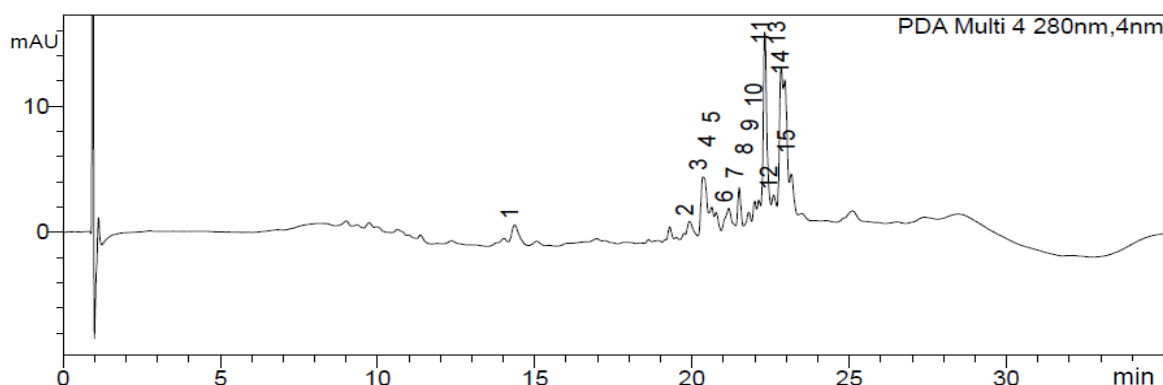


Figura 36: Cromatograma referente ao comprimento de onda de 280 nm do extrato supercrítico na condição de 250 bar e 40 °C.

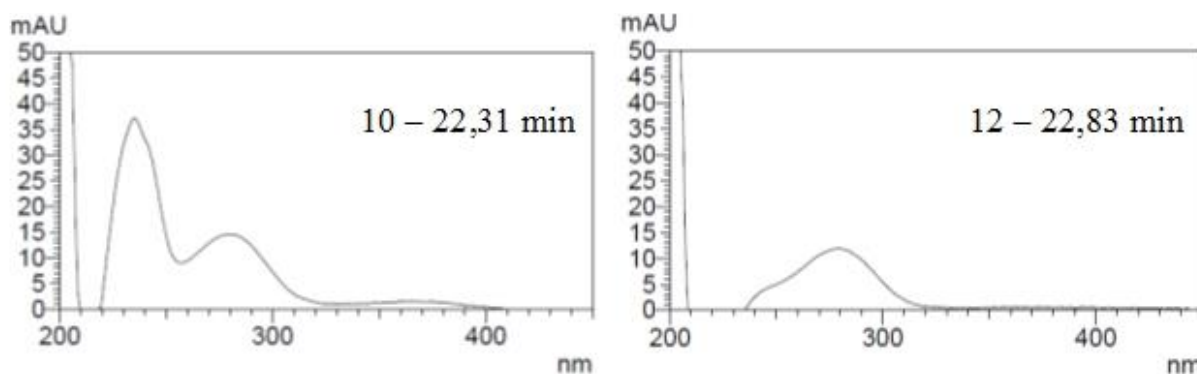


Figura 37: Espectros correspondentes aos sinais característicos das substâncias de interesse.

Com base nesses dados, identificou-se perfis de absorção de compostos característicos de óleos essenciais entre os tempos de retenção de 22 e 23 min. Esses perfis apresentados na figura 37 são representativos de substâncias como terpenos com anéis aromáticos. O mesmo pode ser confirmado com as análises por CG-EM. Esses resultados também mostram que, a princípio, não foi possível realizar um estudo a fim de priorizar a extração de flavonoides, tendo em vista que não são encontrados trabalhos científicos que identificam essa classe de substâncias em extratos supercríticos. Os trabalhos de Yang *et al.* (2009), Kwiecinski *et al.* (2011) e Dieamant *et al.* (2015) não identificaram a presença de flavonoides em extratos de *Bidens pilosa* utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente. Entretanto, em condições específicas, foram encontrados neste trabalho sinais característicos dessas classes. Tal fato só foi alcançado após o ajuste dos limites de detecção do perfil no ultravioleta obtido pela cromatografia líquida de alta eficiência, em razão da mínima concentração dos mesmos, dificultando assim sua identificação.

Da mesma forma, não foram observados perfis de poliacetilenos nos cromatogramas dos extratos obtidos por fluido supercrítico. De modo geral, pode-se afirmar que, utilizando as folhas de *Bidens pilosa* e com os devidos pré-tratamentos, é possível obter outros compostos de alto valor agregado utilizando essa nova tecnologia de extração usando CO<sub>2</sub> supercrítico e sem adição de cossolventes.

#### 5.5.4 Cromatografia em fase gasosa acoplado a espectrometria de massas

Após as análises por CG-EM, foram identificadas 30 substâncias em todos os extratos analisados, incluindo os extratos obtidos por fluido supercrítico e com as técnicas convencionais. A Tabela 13 apresenta as substâncias identificadas, seus KIs tabelados, os IRs calculados, o tempo de retenção e uma comparação da concentração de cada substância identificada em relação a cada experimento realizado.

Tomczykowa *et al.* (2017) mencionaram que a variação na composição dos óleos derivados de plantas de diferentes origens – como *Bidens pilosa*, por exemplo –, é fenômeno comum e pode ser justificada pelas condições climáticas variadas das regiões, bem como ao método de secagem e armazenamento da matéria-prima e do tempo de extração. Os resultados obtidos pela cromatografia em fase gasosa mostraram que foi possível extrair diversas substâncias já encontradas na literatura utilizando o método de extração com fluido supercrítico. Diversos trabalhos utilizando técnicas convencionais citam sua presença em abundância de terpenos nos extratos de *Bidens pilosa*, sendo tal fato alcançado somente utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico. Os outros compostos identificados no óleo estão em acordo com os dados publicados em diversos artigos científicos. Dentre as substâncias analisadas, a presença de  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -pineno, limoneno, isocineol, 1,8-cineol, neofitadieno e fitol foi constante em todos os experimentos realizados. Dieamant *et al.* (2015) citam que os melhores rendimentos foram encontrados na presença dos ácidos palmítico, oleico, linoleico e linolênico, respectivamente, no extrato de *Bidens pilosa* obtido com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Deba *et al.* (2008) identificaram a presença de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno e espatulenol, dentre outros. Tais substâncias também foram encontradas nas extrações realizadas neste trabalho, corroborando para a identificação das substâncias presentes no óleo fixo. Já Silva *et al.* (2011) reuniram em um artigo os metabólitos secundários de *Bidens pilosa* L. identificados até o ano dessa publicação; nela, informam a presença de  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -amirina e squaleno, sendo estes também encontrados nos extratos trabalhados. Além disso, detectou-se nos cromatogramas a presença majoritária das substâncias, tais como L-limoneno, 1,8-cineol,  $\beta$ -cariofileno, ácido palmítico e ácido linolênico, corroborando os resultados publicados na monografia da espécie do Ministério da Saúde (ANVISA, 2015).

Tabela 13: Componentes identificados no óleo, KIs tabelados, IRs calculados, tempos de retenção e teores de cada um em relação a cada experimento.

Componentes	KI	IR	tr <sub>min</sub>	Fluido supercrítico (%)									Convencional (%)		
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mc	Sox	Inf
$\alpha$ -pineno	932	935	4,19	4,11	3,48	1,47	1,59	0,59	3,82	2,48	2,31	-	2,57	0,77	2,05
sabineno	969	975	4,72	2,40	2,34	1,1	1,01	0,43	2,16	1,61	1,52	-	1,7	0,44	-
$\beta$ -pineno	974	982	4,81	2,73	2,3	1,12	1,01	0,44	2,5	1,79	1,53	-	1,7	0,48	-
isocineol	1012	1018	5,32	9,68	6,85	9,23	2,93	2,66	7,64	8,66	6,86	2,06	6,56	1,81	12,65
1,4-diclorobenzeno	1011	1023	5,38	1,52	-	1,16	0,48	0,39	-	1,21	0,97	-	-	-	-
p-cimeno	1020	1028	5,46	3,94	2,91	2,58	1,29	0,86	3,23	3,06	2,59	-	2,6	0,73	3,3
L-limoneno	1024	1032	5,52	20,94	16,55	9,89	7,32	3,7	18,11	14,35	12,26	1,42	13,3	3,86	11,18
1,8-cineol	1026	1037	5,59	15,48	10,94	15,11	4,74	4,31	12,26	13,94	11,22	6,65	11,52	3,15	23,24
$\alpha$ -tujona	1112	1113	6,69	0,84	-	0,88	-	0,23	-	0,81	0,74	-	-	-	13,58
Cânfora	1136	1156	7,31	-	-	0,81	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-
$\alpha$ -copaeno	1374	1383	10,46	-	-	1,11	0,32	0,26	-	0,92	0,85	-	-	-	-
$\beta$ -cariofileno	1417	1430	11,06	11,08	7,11	13,46	3,49	2,64	8,26	11,75	10,9	5,13	7,7	1,87	17,4
$\alpha$ -bergamoteno	1432	1438	11,16	-	-	1,08	-	-	-	0,91	0,8	-	-	-	-
$\alpha$ -humuleno	1452	1466	11,52	-	-	1,05	-	-	-	0,89	0,87	0,59	-	0,27	-
espatulenol	1577	1589	13,03	-	-	-	0,43	0,54	-	-	-	1,02	-	-	-
óxido de cariofileno	1582	1595	13,10	-	2,33	1,14	1,19	1,73	-	1,59	1,1	2,54	-	-	-

Loliolido	1784	15,23	-	-	-	0,85	0,67	-	-	0,69	2,03	-	-	-	
Neofitadieno	1834	15,76	2,87	2,86	2,07	2,35	2,52	1,77	2,47	2,48	4,81	4,31	1,23	-	
acetato de fitila	1876	16,20	1,46	1,51	1,12	1,27	1,29	-	1,26	1,3	2,4	1,89	0,54	-	
ácido palmítico	1955	1959	17,03	3,11	8,87	6,81	15,77	16,45	5,2	5,29	8,95	11,57	7,43	2,29	-
fitol	2109	18,44	-	1,81	1,44	2,17	2,81	-	1,56	1,38	2,3	-	-	-	
ácido linoleico	2132	2133	18,66	-	1,05	1,36	-	-	1,26	1,03	2,42	2,08	1,54	-	-
ácido linolênico	2139	18,72	3,24	12,73	11,2	36,06	38,84	10,55	8,62	16,83	21,58	15,3	4,39	-	
ácido esteárico	2158	2161	18,92	-	-	-	2,76	3,93	-	-	-	3,21	2,07	0,56	-
Linolenato de etila	2166	18,96	2,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,83	1,18	-
β-amirina	2451	21,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23,39	-
α-amirina	2625	22,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47,7	-
acetato de β-amirina	2692	23,88	-	-	-	1,07	1,06	6,96	-	-	6,06	-	-	-	-
esqualeno	3005	24,08	-	6,84	2,15	3,32	4,71	2,88	5,27	2,5	4,83	-	0,46	-	
α-tocoferol	4851	26,94	-	-	-	-	0,25	5,19	-	-	-	-	-	-	-

KI – Índice de Kovats (ADAMS, 2007)

IR – Índice de retenção calculado

$t_{r_{min}}$  – Tempo de retenção em minutos

Em primeiro lugar, pode-se observar que os rendimentos com a extração por fluido supercrítico são inferiores aos obtidos utilizando as técnicas convencionais. Isto era esperado porque as diferentes condições de temperatura e pressão permitem uma extração seletiva.

Os maiores rendimentos obtidos para o L-limoneno e 1,8-cineol foram alcançados nos experimentos de mais baixas temperaturas. Tal comportamento também pode ser comparado com os experimentos 6, 7 e 8, nos quais extraiu-se quase a mesma porcentagem das substâncias, nas condições de temperatura e pressão mais elevadas. Neste caso, o aumento da pressão não traduziu um aumento significativo na massa.

Da mesma forma, o  $\beta$ -cariofileno foi obtido em maior concentração em pressões intermediárias e temperaturas mais baixas. Isso mostra que os componentes que estão sendo extraídos têm uma menor pressão de vapor. Uma temperatura mais alta poderia ocasionar a degradação da substância. As extrações do ácido palmítico e ácido linolênico apresentaram quase o mesmo comportamento em relação à massa extraída. Como observado, a temperatura de 40 °C é, na maioria das vezes, melhor para a qualidade dos óleos fixos. Assim, a 250 bar e na condição de 321 bar e 74 °C (maior rendimento mássico), estas substâncias apresentaram suas maiores concentrações.

Além do mais, observou-se que quando comparadas as substâncias majoritárias presentes no extrato, a extração por fluido supercrítico foi capaz de obter um teor superior a extração por aparelho de Soxhlet.

## 5.6 Atividade Antitumoral

Com o objetivo de avaliar a atividade farmacológica dos extratos de *Bidens pilosa*, foi realizado um ensaio de avaliação *in vitro* da citotoxicidade destes em células de linhagens tumorais. O experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular de Farmanguinhos, FIOCRUZ.

Foram utilizados os extratos EBPC-MC, EBPC-SOX, EPBC-SC (321 bar – 74 °C), EBPC-SC-ET (321 bar – 74 °C com etanol) nas concentrações de 0,015; 0,15, 1,5; 15; 50 a 150  $\mu\text{g/mL}$ ; no entanto, o extrato EBPC-INF não pode ser analisado por razões de solubilidade. O ensaio de inibição do crescimento pode ser observado na Figura 38 para a linhagem celular tumoral de melanoma, SK-MEL-28.

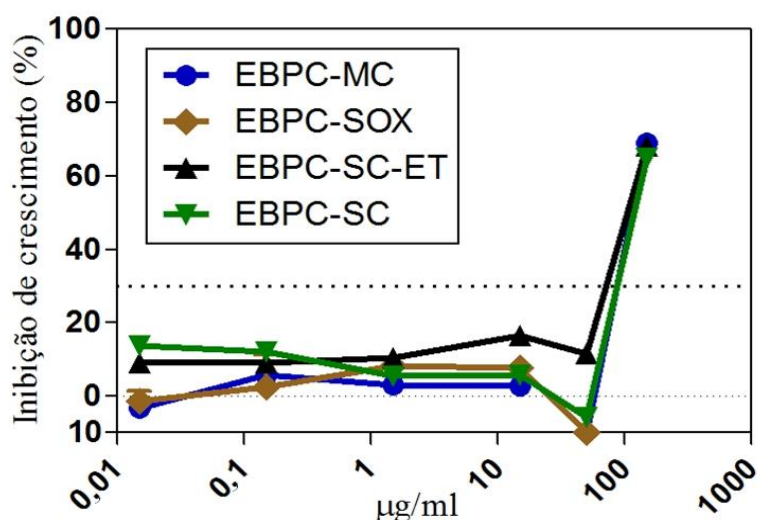


Figura 38: Ensaio de inibição do crescimento da linhagem celular SK-MEL-28.

A Figura 38 mostra a avaliação da atividade antitumoral dos diferentes extratos na linhagem celular SK-MEL-28. É possível observar que os extratos EBPC-SC-ET e EBPC-SC

apresentaram, na menor concentração utilizada, uma pequena atividade. Com o aumento da concentração de EBPC-SC, a atividade decresceu. O mesmo ocorreu para todos os extratos com exceção do extrato de supercrítico com etanol, o qual apresentou um aumento não muito significativo da atividade pelo aumento da concentração. Em 50 µg/mL, todos os extratos apresentaram diminuição na atividade. Já para a concentração de 150 µg/mL (maior concentração analisada), os extratos EBPC-MC, EBPC-SC-ET e EBPC-SC apresentaram atividade antitumoral significativa com porcentagens de inibição do crescimento de aproximadamente 69%, 68% e 65%, respectivamente. Em relação ao extrato EBPC-SOX, o resultado foi negativo, o que significa que o extrato causou o aumento da proliferação celular e não sua inibição. Não é possível afirmar que as substâncias presentes nos extratos foram capazes de inviabilizar essa linhagem celular visto que apenas na maior concentração o resultado foi maior que 30%, a partir do qual seria considerado significativo, e que não houve uma relação de dose-resposta entre o aumento da concentração das amostras e a atividade de inibição. O que pode ter ocorrido é que a maior concentração de cada extrato resultou em toxicidade para as células, resultando em sua morte.

Na literatura, não foram encontrados estudos que relacionassem a atividade antitumoral de *Bidens pilosa* a esta linhagem celular. Mas é de conhecimento que os flavonoides são responsáveis por atuar em diferentes fases do processo de desenvolvimento tumoral. Rodriguez *et al.* (2002) avaliaram efeitos de vários flavonoides sobre o crescimento das linhagens celulares de melanoma B16F10 e SK-MEL. De acordo com os dados dos ensaios, o flavonoide tangeretina inibiu de forma significativa (77%) as culturas de SK-MEL em concentrações de 10 µM. Da mesma forma, Cárdenas *et al.* (2006) avaliaram a atividade antitumoral de alguns flavonoides naturais em linhagem celular SK-MEL-28. Os autores examinaram a atividade de 32 flavonoides, de tal forma que a apigenina, flavanona e os derivados do ácido cafeico apresentaram as atividades antiproliferativas mais potentes e seletivas contra a linhagem de células tumoral estudada.

Da mesma forma, Drag *et al.* (2009) demonstrou uma redução acentuada na atividade contra linhagem celular SK-Mel 28, resultando na inatividade total das células com um valor de IC50 superior a 250 µM. Além disso, segundo Król *et al.* (2015), a classe dos terpenos também apresenta boa atividade frente linhagens celulares tumorais. O terpeno Betulina foi testado com resultados promissores em relação à sua citotoxicidade e atividade inibitória contra a linhagem celular de melanoma (SK-MEL 28). Os valores de IC50 em células SK-MEL-28 foram de grande potencial, sendo no valor de 16,2 µM.

O ensaio de inibição do crescimento para a linhagem celular tumoral de leucemia, K562, pode ser observado na Figura 39.

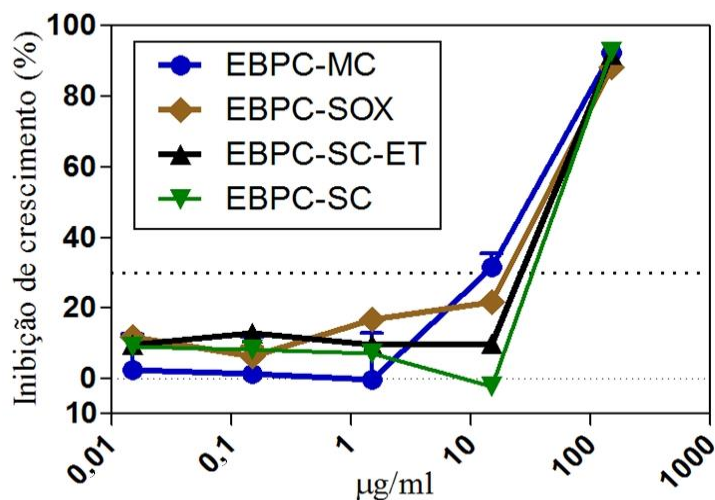


Figura 39: Ensaio de inibição do crescimento da linhagem celular K562.

Em relação à atividade dos extratos contra linhagem celular de leucemia (K562), que pode ser observada na Figura 39, EBPC-SOX, EBPC-SC, EBPC-SC-ET apresentaram uma pequena atividade na menor concentração utilizada. Todos os extratos, com exceção do EBPC-SC, apresentam leves aumentos na atividade de acordo com o aumento da concentração, o que é mais significativo principalmente para o extrato obtido por maceração e através de Soxhlet. EBPC-MC já na concentração de 50 µg/mL apresenta atividade maior que 30%, o que já é considerado um bom resultado e significativo, de acordo com o laboratório responsável pela análise. Esta atividade aumenta até 92% na maior concentração utilizada. As demais amostras também apresentaram ótima atividade na maior concentração utilizada no ensaio, resultando em 88% de inibição EBPC-SOX, 91% EBPC-SC-ET e 92% EBPC-SC.

Em relação a esta linhagem, é possível sugerir que apenas os extratos EBPC-MC e EBPC-SOX podem apresentar componentes responsáveis pela morte celular, já que estes apresentam uma relação de dose-resposta. O extrato obtido por maceração, neste caso, foi o mais promissor, visto que apresentou aumento da atividade de inibição do crescimento com o aumento da sua concentração e também apresentou na concentração de 15 µg/mL atividade de aproximadamente 31%. Para avaliar melhor estes dois extratos quanto à capacidade de inibir o crescimento deste tipo celular, é necessário que o ensaio fosse repetido, adicionando a ele novas concentrações que estivessem no intervalo entre 1,5 e 150 µg/mL, podendo haver uma melhor relação de dose-resposta e sugerindo de forma melhor que a atividade é atribuída à presença das diferentes substâncias.

Chang *et al.*, em 2001, analisaram a atividade do extrato de *Bidens* contra diferentes linhagens celulares de leucemia, entre elas a K562. Foi observado que, na concentração de 100 µg/mL, houve inibição do crescimento em mais de 30%. Utilizando maiores concentrações obtiveram-se melhores resultados, de tal forma que a 500 µg/mL apresentou, aproximadamente, 80% de inibição. Tal fato pode ser atribuído à presença dos flavonoides presentes no extrato. Isso pode ser corroborado por Chen *et al.* (2015), que estudaram o extrato de *Memecylon polyanthum*, que foi fracionado e levou ao isolamento do flavonoide fustina. O produto isolado foi testado contra a linha celular K562 e mostrou valores de IC<sub>50</sub> de 30,5 mg/mL. Dessa mesma forma, Wang *et al.* (2017) realizaram uma análise referente à toxicidade de 18 flavonoides em relação à linhagem celular K562. Dentre eles, a presença de chalconas e flavonas apresentaram forte atividade citotóxica contra as linhas celulares mencionadas anteriormente, com valores de IC<sub>50</sub> de 1,5, ou 5,0 µg/mL. O artigo de revisão de Raffa *et al.* (2017) reuniu descobertas recentes sobre flavonoides anticancerígenos. Os autores citam que flavonoides como quercetina, miricetina, apigenina e chalconas mostraram atividade citotóxica contra linhagem celular K562, com um IC<sub>50</sub> de 1,45 mM.

Da mesma forma, Doll-Boscardin *et al.* (2012) demonstraram que os óleos essenciais de *Eucalyptus benthamii* também apresentam bom potencial citotóxico frente a linhagem tumoral K562 (IC<sub>50</sub>= 56,51 µg/mL). Além disso, os autores relataram que a composição desse óleo essencial consistia em uma mistura de mono e sesquiterpenos, podendo destacar a presença de α-pineno (36,92%), globulol (20,22%), aromadendeno (12,40%) e γ-terpineno (4,38%).

Já em 2017, García *et al.* relataram o efeito antiproliferativo em linhagem celular de leucemia K562, com diferentes métodos de extração de óleos essenciais de *Lippia alba*. Foram realizadas extrações de 76 óleos essenciais com variações na estação de crescimento da planta, parte colhida da planta, condições do material de preservação e destilação. No geral, os extratos apresentaram diferenças significativas em seus componentes primários, rendimento de óleo e atividade citotóxica.

Ao final do estudo, concluiu-se que as diferenças na atividade contra linhagem tumoral K562 foram significativamente correlacionadas com variações na concentração de óxido de cariofileno, com uma atividade nas células tumorais variando de 54 a 95% e IC<sub>50</sub> de 13 a 38,8 g/mL.



## 5.7 Modelagem matemática

Devido aos promissores resultados encontrados nos extratos obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico, resolveu-se estudar os modelos de maneira a prever o comportamento da extração usando o projeto e “scale-up” de unidades de maior volume.

### 5.7.1 Modelos cinéticos

Neste tópico são apresentados os resultados dos modelos matemáticos empregados para a análise do rendimento de extrato obtido com fluido supercrítico. A estimativa dos parâmetros dos modelos de Esquível *et al.* (1999), Reverchon e Osseo (1994), Zeković *et al.* (2003), Sovová (1994), Brunner (1984) e Kandiah e Spiro (1990) foi realizada.

Para análise do modelo de Esquível *et al.* (1999), foi utilizado o cálculo de carga livre de soluto, considerando a quantidade máxima de extrato obtido em Soxhlet (15,13%), e o rendimento (e%) foi calculado de acordo com a equação 4. Os valores dos rendimentos calculados, parâmetros estimados e seus respectivos desvios podem ser vistos na Tabela 14.

Tabela 14: Rendimento calculado, parâmetros e desvio relativo obtido para o modelo de Esquível *et al.* (1999) nas diferentes condições de pressão e temperatura.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	e <sub>exp</sub>	e <sub>lim</sub>	b	DRM (%)
1	179	46	0,035	0,051	81,877	5,12
2	179	74	0,040	0,698	4103,934	5,49
3	321	46	0,059	0,201	1263,613	5,32
4	321	74	0,097	0,406	2070,937	14,90
5	250	40	0,068	0,312	1650,302	6,65
6	250	80	0,040	0,576	4097,781	6,15
7	150	60	0,025	0,729	8189,020	6,30
8	350	60	0,053	0,184	922,326	5,04
9	250	60	0,051	0,637	4104,289	9,69

Para melhor compreensão do cálculo no modelo de Esquível *et al.* (1999), deve-se avaliar os dados obtidos para o parâmetro e<sub>lim</sub>, visto que é definido como o máximo de óleo que pode ser extraído de uma matriz em uma determinada condição de temperatura e pressão para um tempo infinito de extração. Pode-se observar facilmente que este parâmetro apresentou valores coerentes, sendo perto do valor máximo de rendimento obtido experimentalmente. Outro parâmetro importante que deve ser avaliado é o desvio relativo médio, visto que ele representa, em porcentagem, a variação do rendimento experimental em relação ao rendimento calculado.

O modelo de Esquível *et al.* (1999), quando aplicado a esses experimentos, foi capaz de representar as curvas de extração, apresentando desvios que variaram de 5,04% a 14,90%, o que pode ser visualizado nas Figuras 40, 41 e 42.

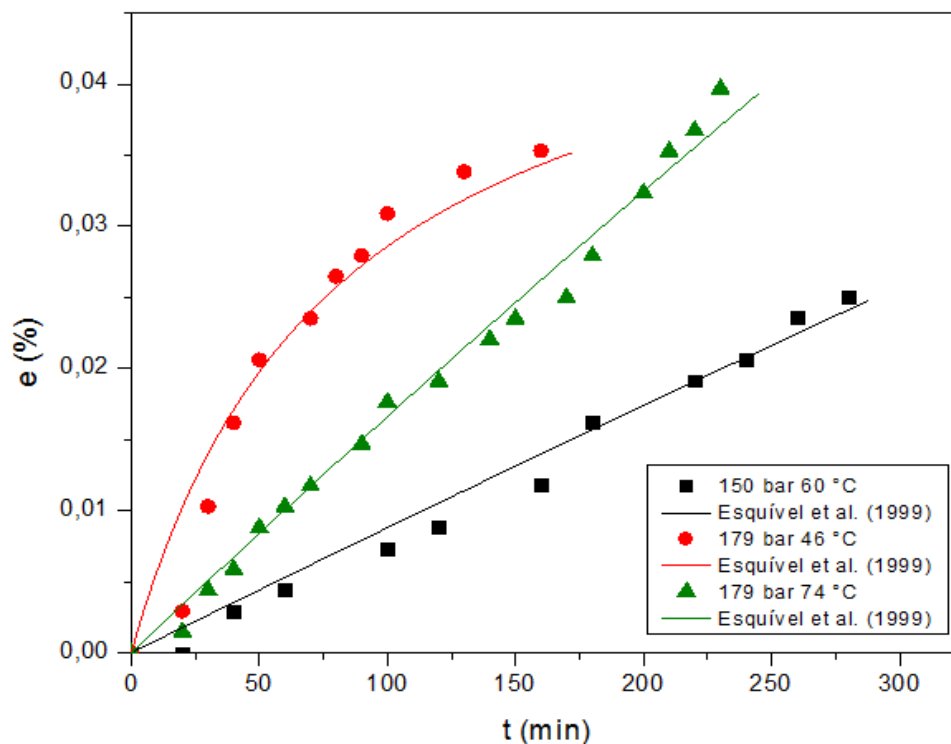


Figura 40: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquivel *et al.* (1999), a 150 – 60 °C, 179 bar – 46 °C e 179 bar – 74 °C.

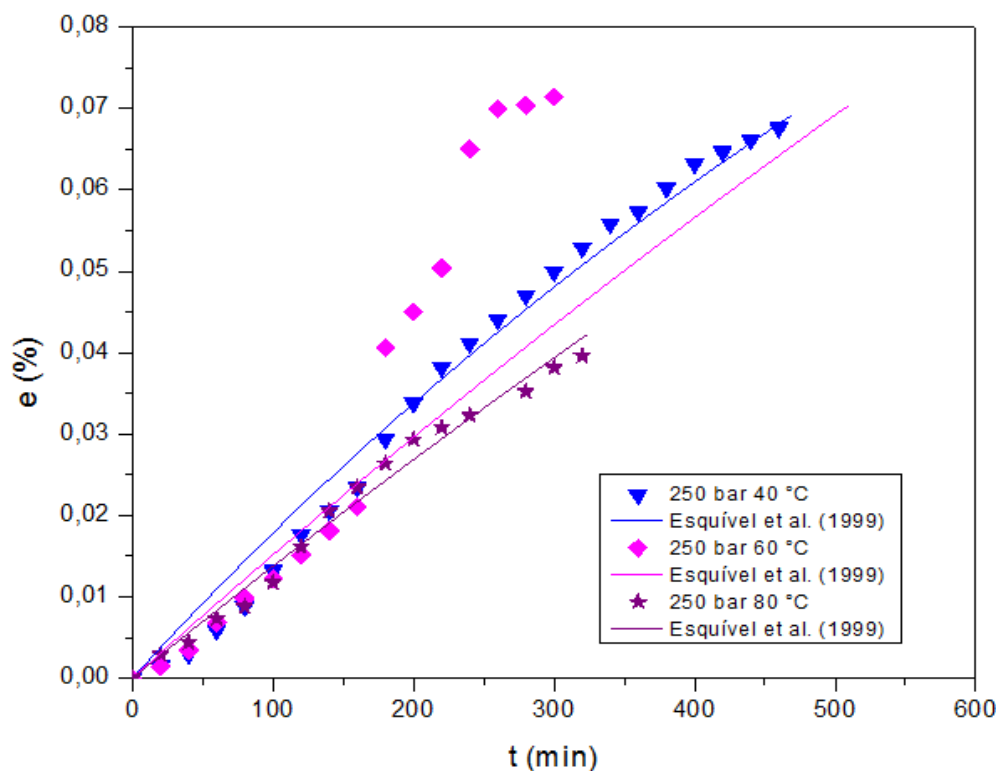


Figura 41: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquivel *et al.* (1999), a 250 – 40 °C, 250 bar – 60 °C e 250 bar – 80 °C.

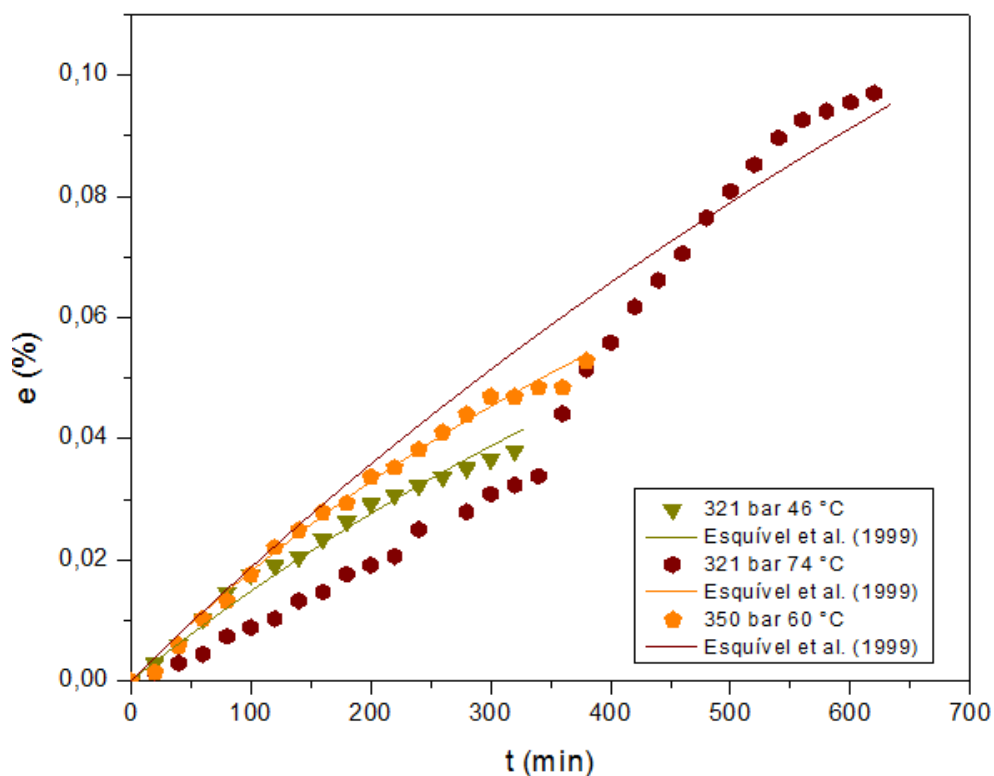


Figura 42: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquivel *et al.* (1999), a 321 – 46 °C, 321 bar – 74 °C e 350 bar – 60 °C.

De acordo com as figuras apresentadas anteriormente, observou-se que o modelo aplicado foi capaz de descrever adequadamente o processo da extração por fluido supercrítico, uma vez que apresentou bom ajuste para todos os dados experimentais. As condições experimentais de 179 bar – 46 °C e 350 bar e 60 °C apresentaram o melhor ajuste e DRM de 5,04 e 5,12, respectivamente. No entanto, ao observar as condições experimentais de 321 bar – 74 °C (Figura 42) e de 250 bar – 60 °C (Figura 41), verifica-se que o modelo somente foi capaz de ajustar bem a terceira etapa do processo extrativo para a condição de 74 °C, apresentando um DRM de 14,90% e, para a temperatura de 60 °C, o modelo conseguiu representar apenas a etapa inicial do processo; apesar disso, teve um DRM igual a 9,69%.

Tais resultados foram similares aos obtidos por Jesus *et al.* (2010), no qual realizaram a recuperação de  $\gamma$ -oryzanol, a partir do subproduto de óleo de farelo de arroz usando fluido supercrítico. Sob 200 bar, e temperaturas de 40 e 50 °C, os autores obtiveram altos teores de extração e a modelagem matemática utilizando Esquivel *et al.* (1999) apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, com erro quadrado médio de 0,0015, aproximadamente. Já Vladić *et al.* (2016) também apresentaram uma modelagem bem sucedida do extrato de segurelha (*Satureja montana* L.) utilizando fluido supercrítico. Os autores concluíram, da mesma forma, que todos os modelos utilizados apresentaram desvios próximos aos dados experimentais, sendo o modelo de Esquivel *et al.* (1999) o que expressou melhor correlação.

Lima *et al.* (2018) avaliaram o modelo de Esquivel *et al.* (1999) para representar os dados obtidos pela extração com fluido supercrítico das cascas de cenoura. Segundo os autores, o modelo empregado foi capaz de descrever o processo com confiança, devido aos elevados valores de  $R^2$  (0,926) e os baixos erros apresentados (1,39%).

A estimação dos parâmetros dos modelos de Reverchon e Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003), foi realizado e os desvios relativos médios (DRM %) e os rendimentos normalizados foram calculados e os valores dos rendimentos e dos respectivos desvios dos modelos podem ser vistos nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Dados calculados e desvio relativo obtido para o modelo de Reverchon e Osseo (1994) nas diferentes condições de pressão e temperatura.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	RN <sub>Calculado</sub> (%)	ti	DRM (%)
1	179	46	93,403	3531,165	8,11
2	179	74	63,665	10667,790	8,77
3	321	46	84,678	15992,140	8,61
4	321	74	30,066	28521,660	5,12
5	250	40	64,156	17543,820	11,28
6	250	80	87,298	9304,884	8,77
7	150	60	44,222	16443,880	7,45
8	350	60	85,029	11374,080	8,34
9	250	60	46,435	24989,020	15,73

Tabela 16: Dados calculados e desvio relativo obtido para o modelo de Zeković *et al.* (2003) nas diferentes condições de pressão e temperatura.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	RN <sub>Calculado</sub> (%)	a	B	DRM (%)
1	179	46	96,433	-1,383	0,355	5,68
2	179	74	72,218	-0,419	0,118	5,75
3	321	46	77,809	-0,221	0,045	4,93
4	321	74	93,838	-0,497	2,358	5,83
5	250	40	90,656	-0,365	0,434	9,82
6	250	80	89,055	-0,470	0,297	8,18
7	150	60	90,055	-0,674	0,839	8,68
8	350	60	90,233	-0,408	0,262	6,22
9	250	60	61,887	-0,250	0,285	10,46

Conforme os resultados exibidos nas Tabelas 15 e 16, foi possível perceber que para os dois modelos empíricos, os DRM foram satisfatórios e variaram, para o modelo de Reverchon e Osseo (1994), de 5,12% (321 bar e 74 °C) a 15,73% (250 bar e 60 °C), e para o modelo de Zeković *et al.* (2003), de 4,93% (456 bar e 46 °C) a 10,46% (250 bar e 60 °C).

Os trabalhos de Souza (2015) e Sartori *et al.* (2017) estudaram a extração do óleo de microalgas *Desmodesmus sp.* e a extração de agrotóxicos presentes na banana vitória (*Musa spp*), ambos usando CO<sub>2</sub> supercrítico, respectivamente. Os resultados obtidos experimentalmente foram comparados com os modelos de Reverchon e Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003), e os autores relataram que os altos valores dos coeficientes de correlação mostraram que ambos os modelos são capazes de se ajustar com o resultado experimental. Foi constatado que o experimento realizado a 250 bar e 60 °C apresentou o maior desvio para ambos os modelos estudados. Nas Figuras 43, 44 e 45 pode-se visualizar o ajuste do modelo de Reverchon e Osseo (1994) e nas Figuras 46, 47 e 48, o ajuste do modelo de Zeković *et al.* (2003) em relação aos resultados experimentais obtidos na extração por fluido supercrítico.

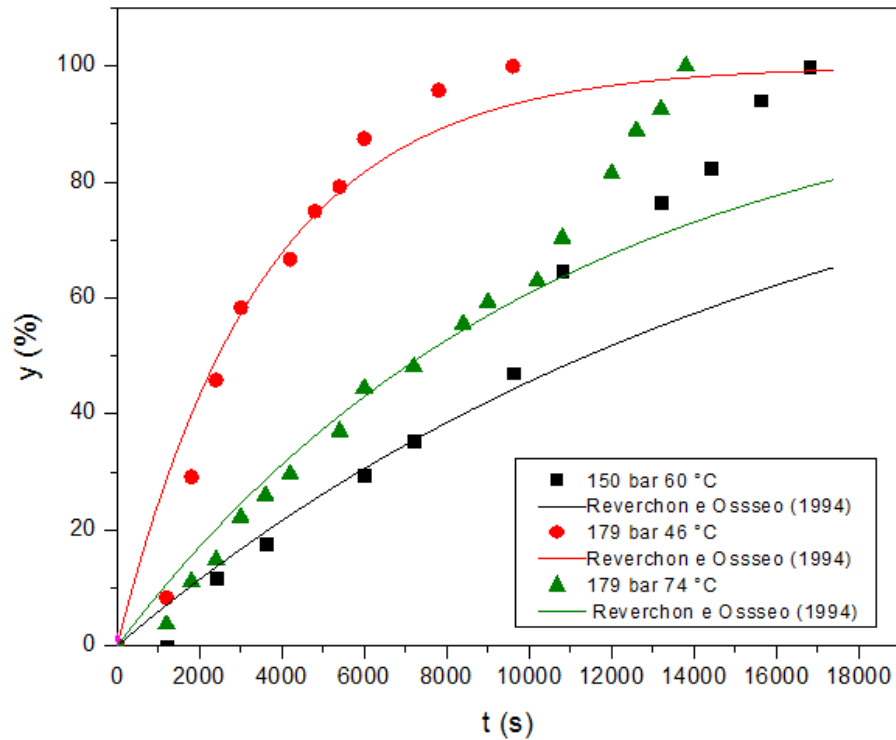


Figura 43: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon e Osseo (1994), a 179 bar – 46 °C, 179 bar – 74 °C e 150 bar – 60 °C.

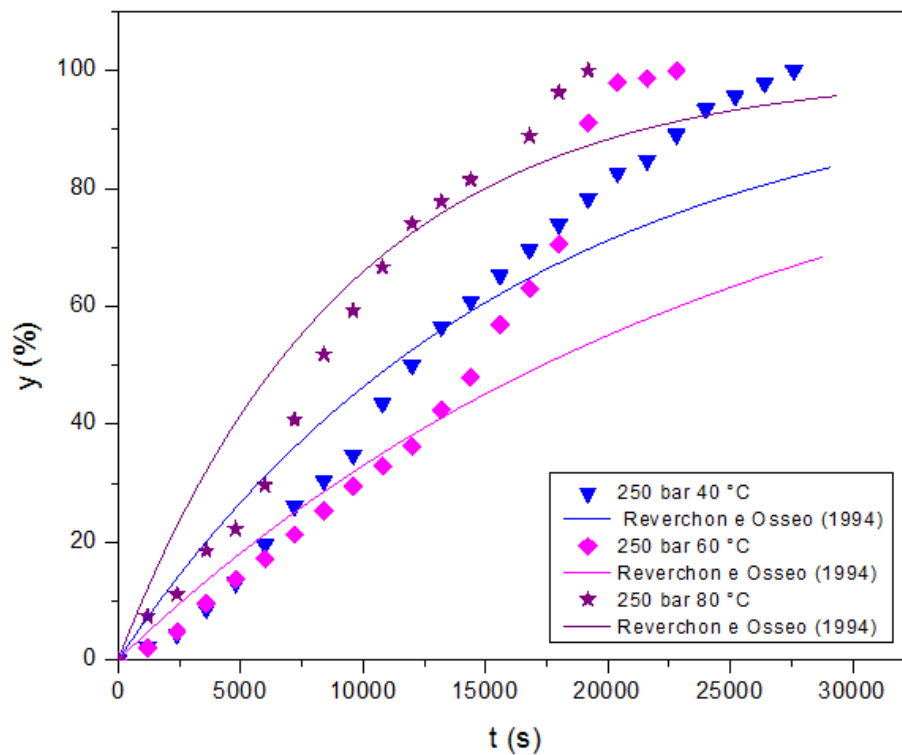


Figura 44: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon e Osseo (1994), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C.

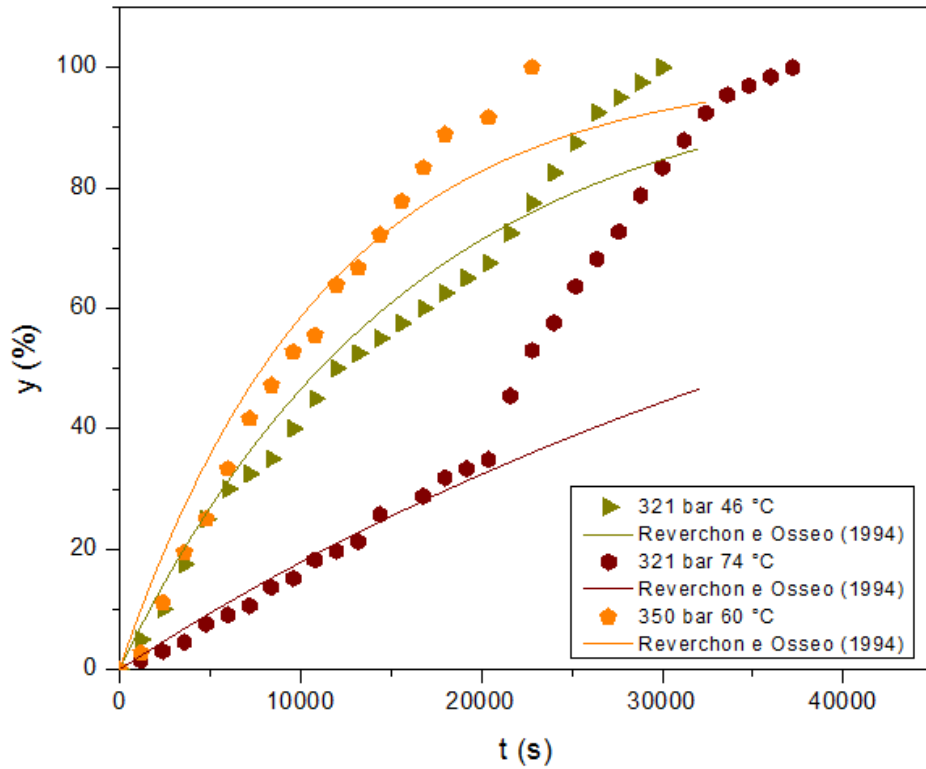


Figura 45: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon e Osseo (1994), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C.

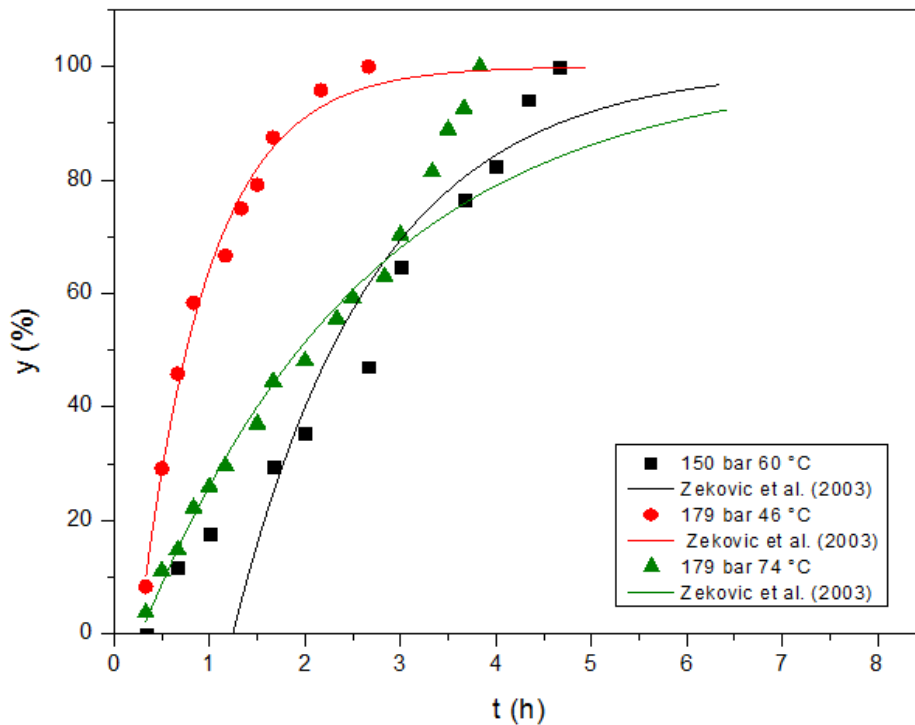


Figura 46: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković *et al.* (2003), a 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74 °C.

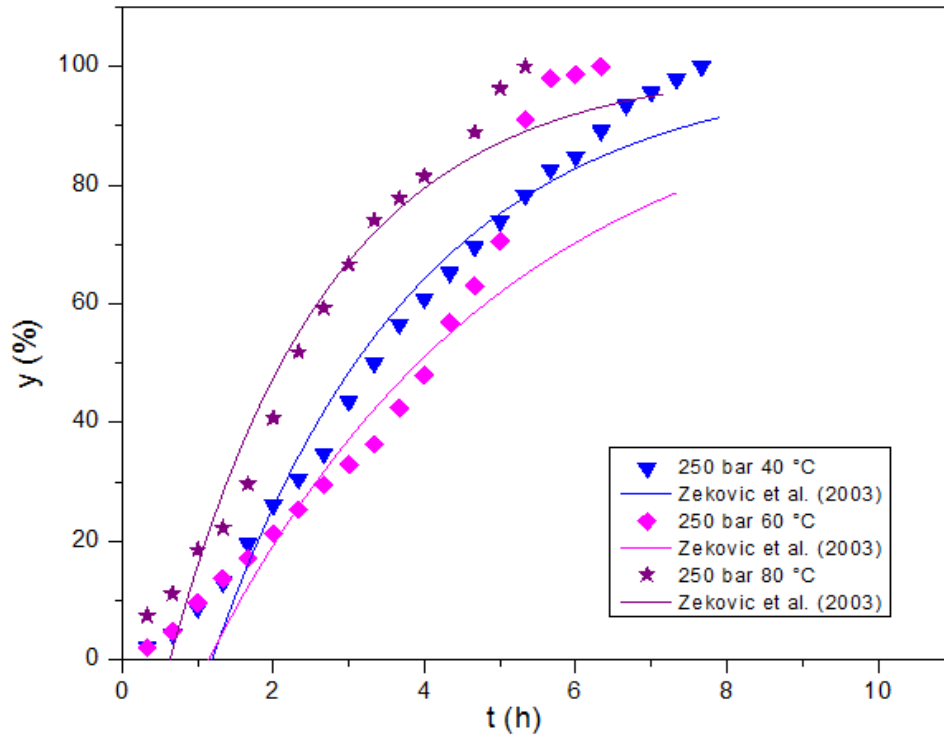


Figura 47: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković *et al.* (2003), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C.

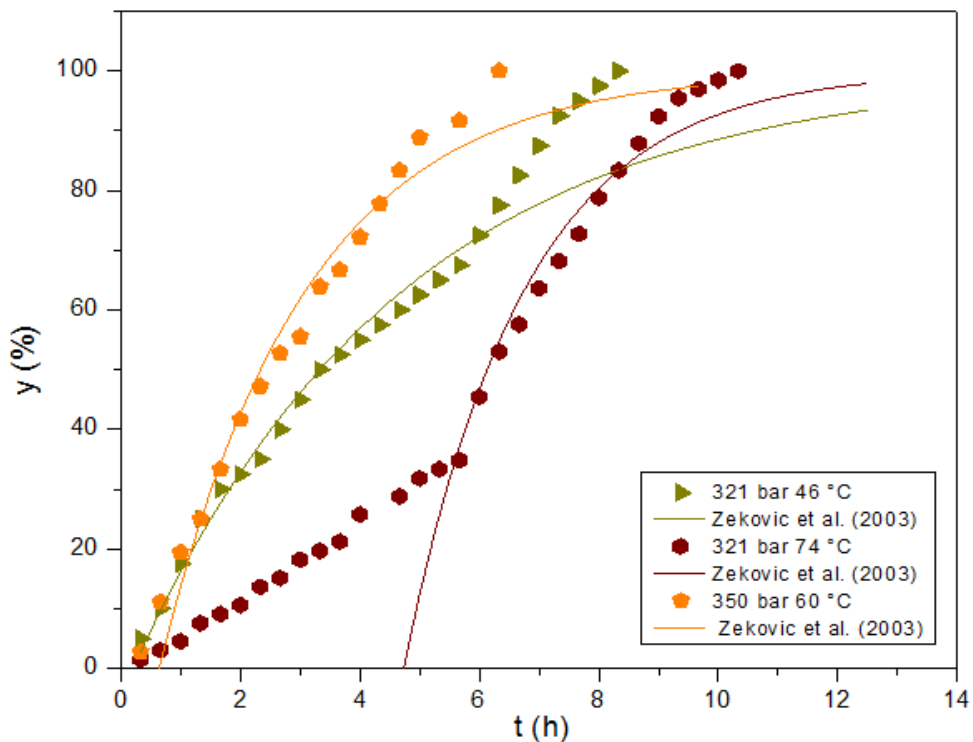


Figura 48: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković *et al.* (2003), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C.

Tendo em conta os altos valores dos coeficientes de correlação dos modelos Reverchon e Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003) na maioria dos experimentos obtidos, comprova-se que ambos os modelos são capazes de representar pelo menos alguma etapa da cinética de extração. Considerou-se que, para ambos os modelos, os mesmos alcançaram um bom ajuste em

praticamente toda a curva nas condições de 179 bar a 46 °C e 350 bar a 60 °C. Entretanto, para os dados experimentais obtidos nas condições de 150 bar a 60 °C, 179 bar a 74 °C, 321 bar a 46 °C e 321 bar a 74 °C, os modelos somente representaram a etapa rápida da extração (primeira etapa). Além disso, na pressão de 250 bar e temperaturas de 40, 60 e 80 °C, o modelo não se ajustou bem.

Alguns parâmetros inerentes ao estudo da extração supercrítica são necessários para a realização dos cálculos da modelagem das curvas de extração pelo modelo de Sovová (1994). Os parâmetros indispensáveis são a densidade do fluido, vazão volumétrica, vazão mássica, quantidade máxima possível de soluto extraído, carga livre de soluto, solubilidade do óleo ( $x_0$ ), densidade do soluto e porosidade. Os resultados da porosidade e densidade foram mostrados na Tabela 7. Na tabela 17 são apresentados os parâmetros estimados para cada extração realizada com fluido supercrítico, juntamente com cada desvio relativo obtido.

Tabela 17: Parâmetros do modelo e desvios relativos para cada condição de operação para o modelo de Sovová (1994).

Ensaio	P (bar)	T (°C)	Parâmetros do Modelo			DRM (%)
			$K_{fa0}$	$K_{sa0}$ ( $10^{-4}$ )	$X_k$	
1	179	46	75,317	2,986	0,6905	3,14
2	179	74	1,137	1,417	0,9466	8,75
3	321	46	3,069	1,1049	0,9450	6,14
4	321	74	0,104	126,000	0,9000	18,72
5	250	40	0,354	2,5185	0,9564	1,31
6	250	80	0,626	1,7189	0,9775	6,50
7	150	60	3,552	1,2381	0,9358	9,75
8	350	60	0,465	1,0988	0,9586	4,03
9	250	60	0,104	1,855	0,9976	3,38

Diante dos resultados mostrados na Tabela 17, observou-se que o modelo apresentou o melhor ajuste para os dados experimentais na condição de 250 bar e 40 °C, com desvio relativo de 1,31%. Foi possível relacionar que o valor da constante de transferência de massa da fase sólida ( $K_{sa0}$ ) foi inferior aos valores obtidos da constante da fase fluida ( $K_{fa0}$ ). Tal fato é possível, visto que o soluto localizado na superfície da partícula sólida (fase fluida) leva menos tempo para ser extraído, em comparação com o soluto localizado no interior da partícula, da etapa difusional (LÓPEZ-PADILLA *et al.*, 2017; SARTORI *et al.*, 2017).

Assim, os valores de  $K_{sa0}$  e  $K_{fa0}$  representados pelo modelo Sovová para a curva de extração, representam as transferências de massa interna e externa, indicando que o parâmetro difusional é menos representativo quando comparado com a etapa de convecção na extração por fluido supercrítico do óleo de *Bidens pilosa* (KITZBERGER *et al.*, 2009; PIVA *et al.*, 2018). A predição das curvas de extração por fluido supercrítico pelo modelo Sovová (1994) são apresentadas nas Figuras 49, 50 e 51.

Diante das curvas de extração apresentadas, pode-se constatar que os dados experimentais obtidos na condição de 250 bar e 60 °C, com desvios relativos de 3,38%, apresentaram o melhor ajuste para o modelo de Sovová (1994), mesmo que este não tenha tido o menor desvio. Nesta condição experimental, o modelo foi capaz de representar as três fases



da cinética de extração, explicadas no item 4.1. Já na condição de 250 bar e 80 °C, apresentando desvio relativo de 6,50%, o comportamento do modelo Sovová (1994) apresentou melhor ajuste apenas no período de extração constante (etapa rápida).

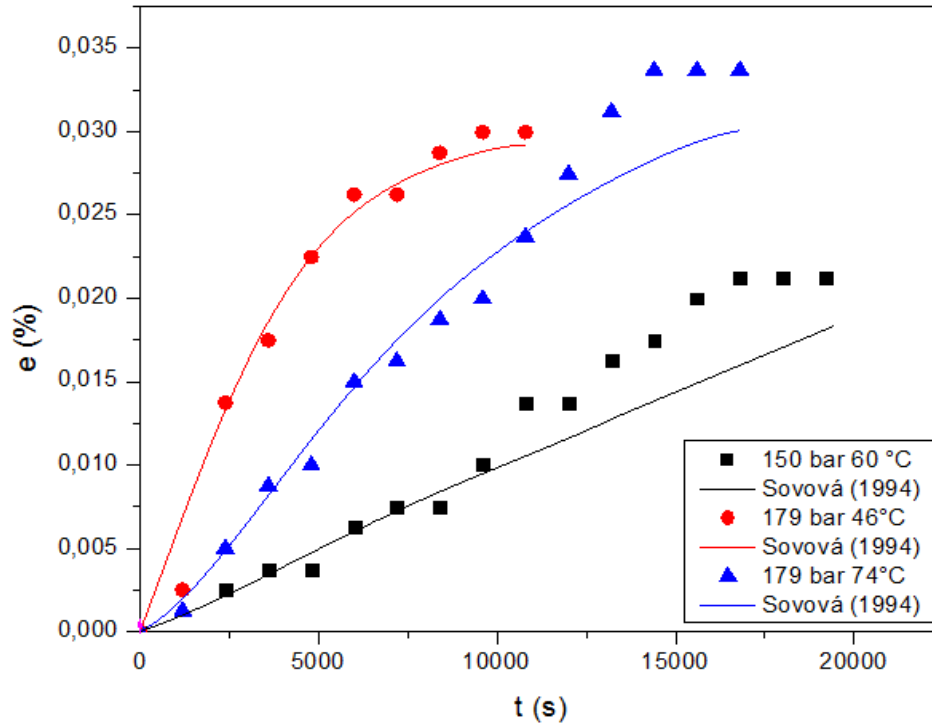


Figura 49: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Sovová (1994), a 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74 °C.

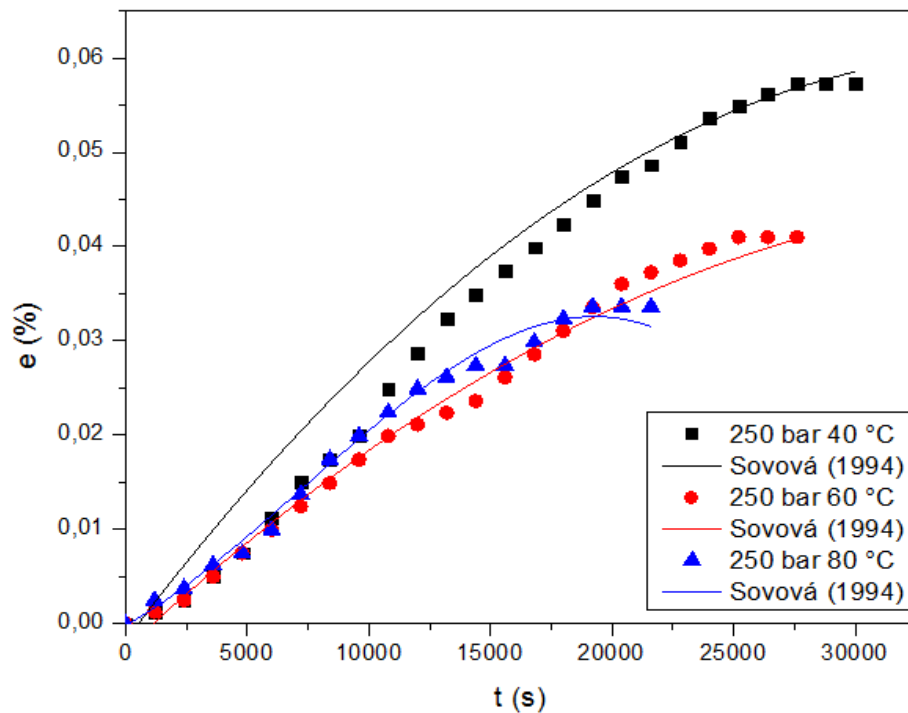


Figura 50: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Sovová (1994), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C.

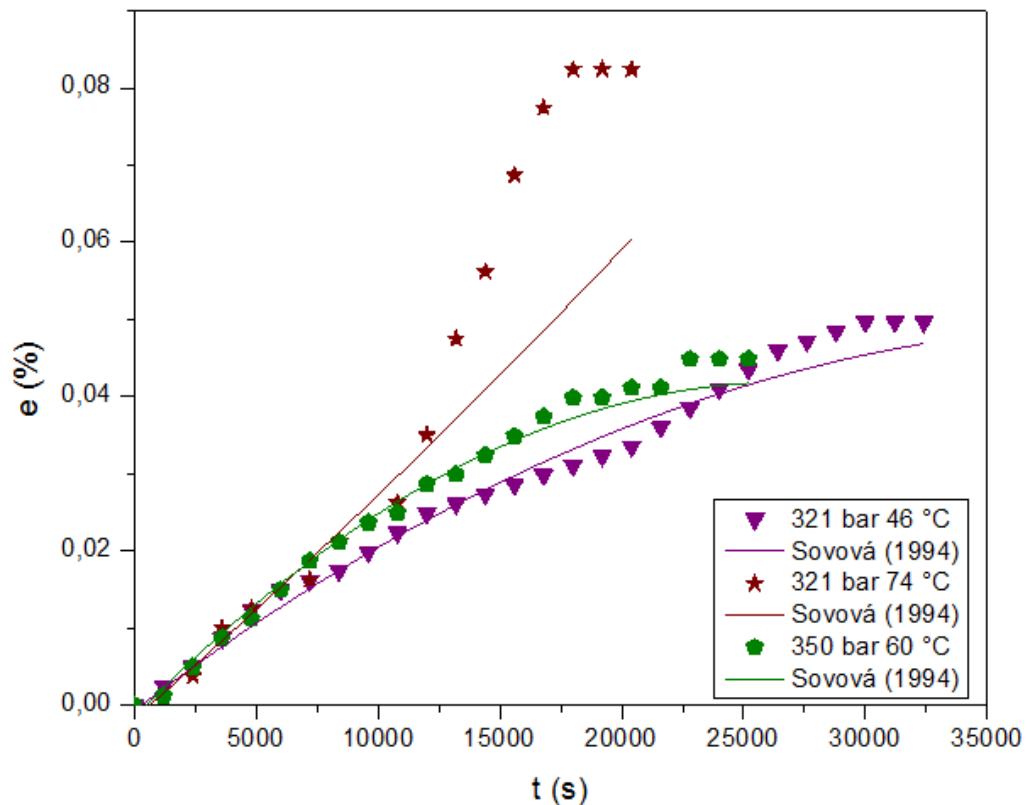


Figura 51: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Sovová (1994), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C.

Para as condições experimentais de 179 bar em 46 e 74 °C, o modelo de Sovová (1994) também apresentou boa concordância com os dados experimentais, apresentando desvio relativo de 3,14 e 8,76%, respectivamente. Assim, esses resultados expressaram um satisfatório ajuste nos períodos de extração constante e decrescente.

Da mesma forma ocorreu para as condições de 321 e 46 °C, 321 e 74 °C e 350 e 60 °C, nas quais o modelo de Sovová (1994) somente apresentou bom ajuste com os dados experimentais no período de extração constante, apesar do DRM ser 6,14, 18,72 e 4,03%, respectivamente.

Em geral, o modelo de Sovová representou satisfatoriamente os dados experimentais. Favareto *et al.* (2017) estudaram a extração de óleo de sucupira utilizando fluido supercrítico. Os autores observaram que este modelo apresentou excelente ajuste na curva de extração, representando praticamente todos os dados experimentais, gerando resultados mais representativos em comparação com os demais modelos analisados.

Outro modelo estudado, o de Brunner (1984), foi avaliado, e os valores para os parâmetros do modelo ajustável (taxa constante de extração) e seus desvios relativos médios são apresentados em Tabela 18.

Diante dos resultados apresentados na Tabela 18, foi observado que os desvios relativos médios foram satisfatórios e variaram de 2,73% (179 bar e 74 °C) a 29,70% (321 bar e 74 °C). Diante disso, as Figuras 52, 53 e 54 apresentam as curvas cinéticas experimentais e as preditas pelo modelo de Brunner (1984) para as condições operacionais estudadas.

Diante das curvas de extração, observou-se que a condição de 179 bar e 74 °C retratou um desvio relativo de 2,73%, de tal forma que o modelo de Brunner (1984) apresentou o melhor ajuste para os dados experimentais.

Tabela 18: Parâmetros do modelo e desvios relativos para cada condição de operação para o modelo de Brunner (1984).

Ensaio	P (bar)	T (°C)	K (h <sup>-1</sup> ) (10 <sup>-3</sup> )	DRM (%)
1	179	46	1,320	13,48
2	179	74	0,829	2,73
3	321	46	0,665	6,78
4	321	74	0,837	29,70
5	250	40	0,882	7,61
6	250	80	0,687	4,98
7	150	60	0,422	8,65
8	350	60	0,793	6,23
9	250	60	0,701	5,50

Após análise da condição experimental de 179 bar – 46 °C, pode-se verificar que o modelo de Brunner (1984) não apresentou bom ajuste com os dados experimentais, mesmo que este tenha conseguido obter um desvio relativo médio de 13,48%. Já a 150 bar e 60 °C, observa-se que o modelo mostrou um bom ajuste, representando principalmente os dados finais, gerando um desvio relativo médio de 8,65%.

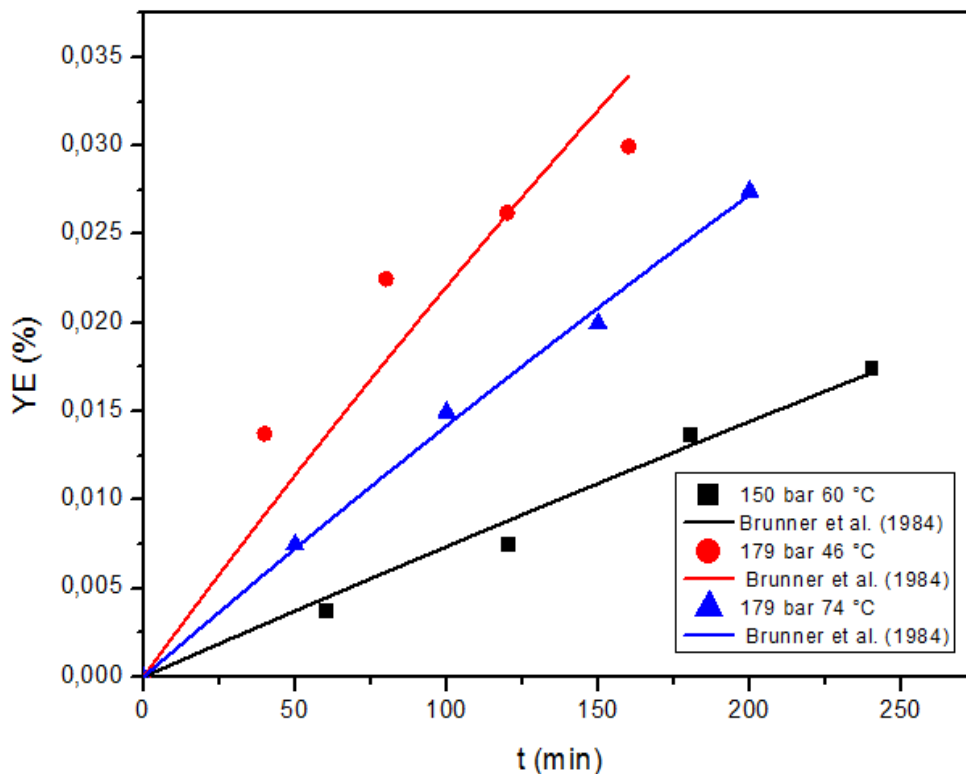


Figura 52: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Brunner (1984), a 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74 °C.

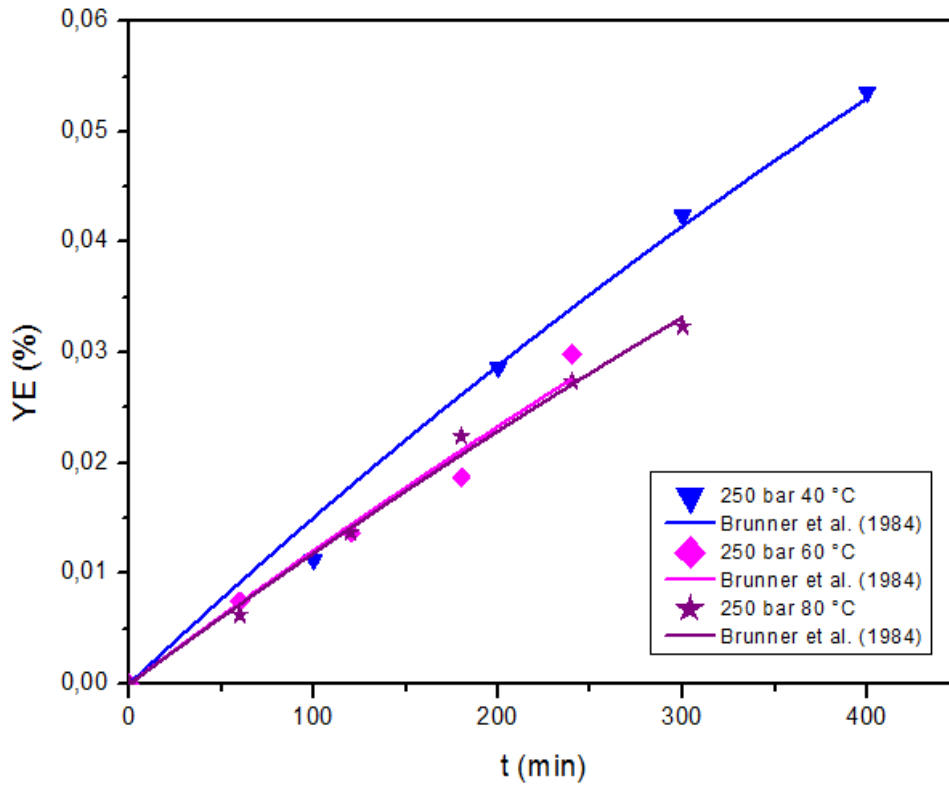


Figura 53: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Brunner (1984), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C.

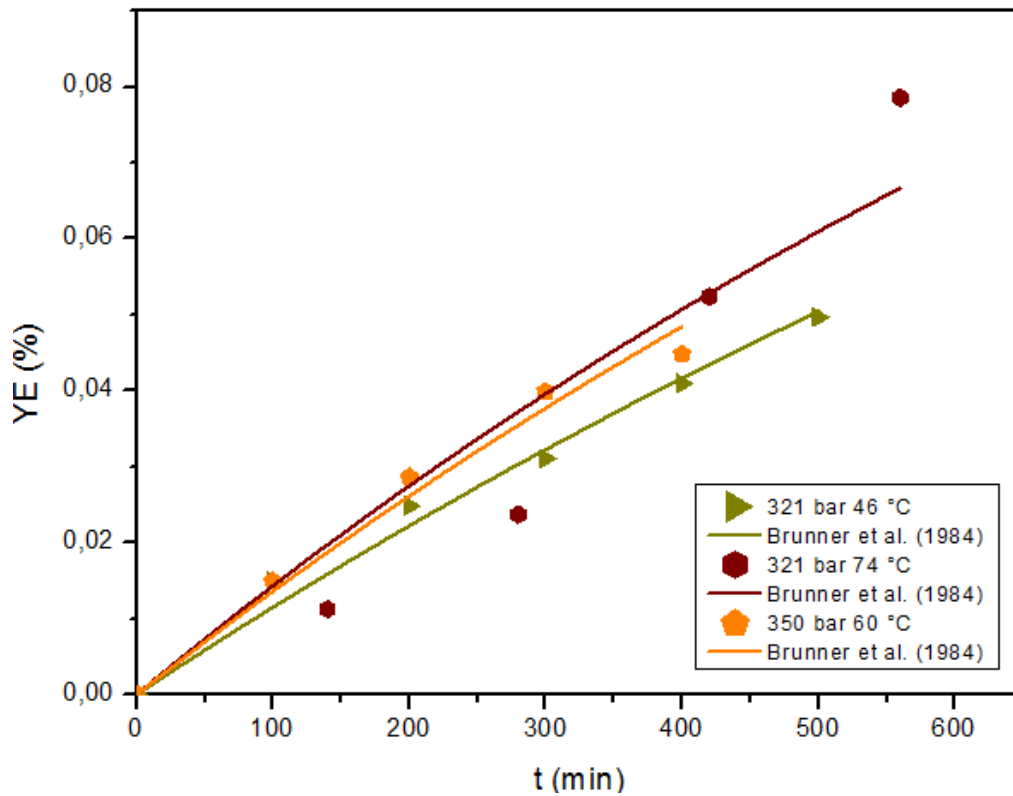


Figura 54: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Brunner (1984), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C.

Da mesma forma ocorreu para condição de 250 bar e 40 °C, na qual observou-se que o modelo conseguiu um bom ajuste aos dados finais da curva de extração, com 7,61% de desvio relativo médio. Nas condições de 250 bar a 60 e 80 °C os modelos somente representaram a etapa inicial da extração, apesar do DRM não ser muito significativo dentre as condições investigadas (5,50 e 4,98%).

Para as condições apresentadas na Figura 54, o modelo de Brunner (1984) foi capaz de alcançar um bom ajuste à etapa inicial da extração para 350 bar e 60 °C, apresentando DRM de 6,23%. Já a 321 bar a 46 °C o modelo refletiu em um ajuste no período final de extração, com DRM de 6,78%. Mais uma vez, a modelagem para condição de 321 bar e 74 °C não apresentou bom ajuste com a curva de extração, apresentando um desvio médio de 29,70%.

Zekovic *et al.* (2014) perceberam um comportamento semelhante para sua modelagem, em que o modelo de Brunner não apresentou os melhores ajustes para extração do majericão.

O modelo de Kandiah e Spiro (1990) para os intervalos de temperatura e pressão, determinados no item 3.7.4.2, foi investigado. Na Tabela 19 são apresentados os valores para os parâmetros do modelo  $f_1$  e  $f_2$  (frações do soluto extraído),  $k_1$  e  $k_2$  (taxas de extração) e seus desvios relativos médios.

Tabela 19: Parâmetros do modelo e desvios relativos para cada condição de operação para o modelo de Kandiah e Spiro (1990).

Ensaio	P (bar)	T (°C)	$f_1$	$K_1$ (h <sup>-1</sup> ) (10 <sup>-3</sup> )	$f_2$	$K_2$ (h <sup>-1</sup> ) (10 <sup>-3</sup> )	DRM (%)
1	179	46	0,490	1,150	0,490	1,150	8,87
2	179	74	0,499	0,821	0,499	0,821	2,34
3	321	46	0,496	0,085	0,497	1,372	4,30
4	321	74	0,521	0,942	0,521	0,941	20,37
5	250	40	0,504	0,916	0,504	0,916	5,64
6	250	80	0,500	0,693	0,500	0,693	4,53
7	150	60	0,501	0,441	0,501	0,441	0,05
8	350	60	0,495	0,761	0,495	0,761	4,50
9	250	60	0,501	0,717	0,501	0,717	6,03

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 19, pode-se notar que para esse modelo, os DRM foram satisfatórios e variaram de 0,05% (150 bar e 60 °C) a 20,37% (321 bar e 74 °C). Resultados semelhantes foram obtidos pelos autores Zekovic *et al.* (2014), que estudaram o modelo de Kandiah e Spiro (1990) para representar os dados experimentais da extração supercrítica provenientes do óleo do manjeriço. De acordo com esses autores, o modelo proposto foi capaz de representar o processo de extração, mesmo adquirindo altos desvios, e os parâmetros  $f_1$  e  $f_2$  apresentaram valores estatisticamente iguais, assim como os parâmetros  $k_1$  e  $k_2$ .

Diante da similaridade entre os desvios dos modelos, acredita-se que o comportamento dos ajustes dos modelos também foi semelhante. Nas Figuras 55, 56 e 57 pode-se observar o ajuste para o modelo de Kandiah e Spiro (1990) diante dos resultados obtidos experimentalmente.

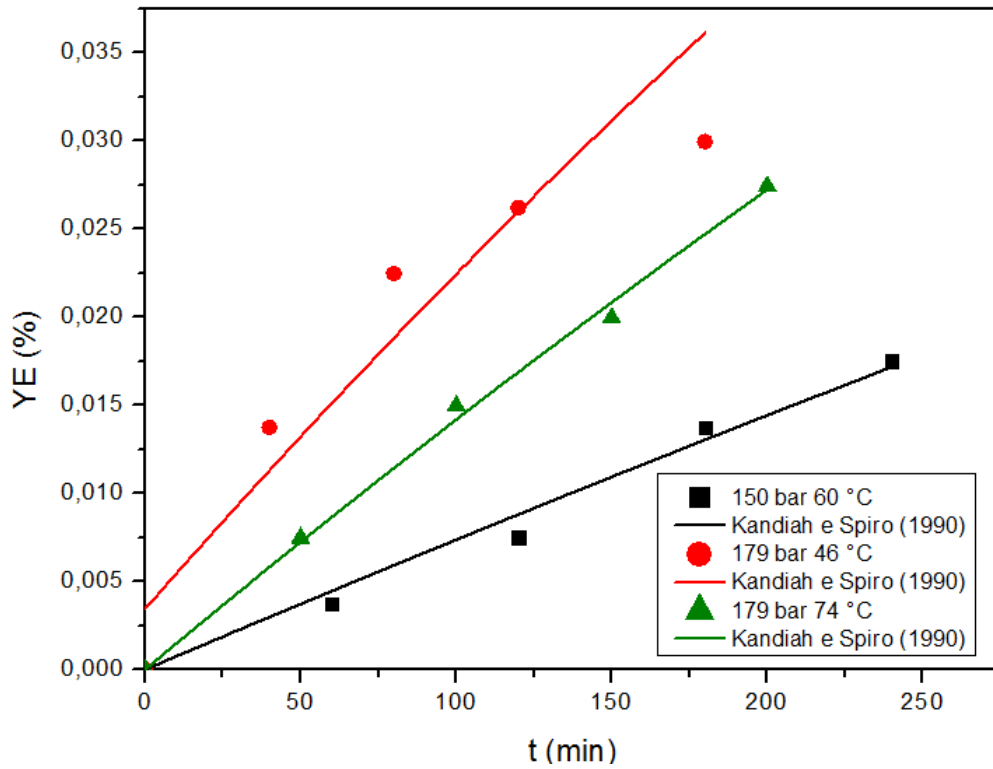


Figura 55: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Kandiah e Spiro (1990), a 150 bar - 60 °C, 179 bar - 46 °C e 179 bar - 74 °C.

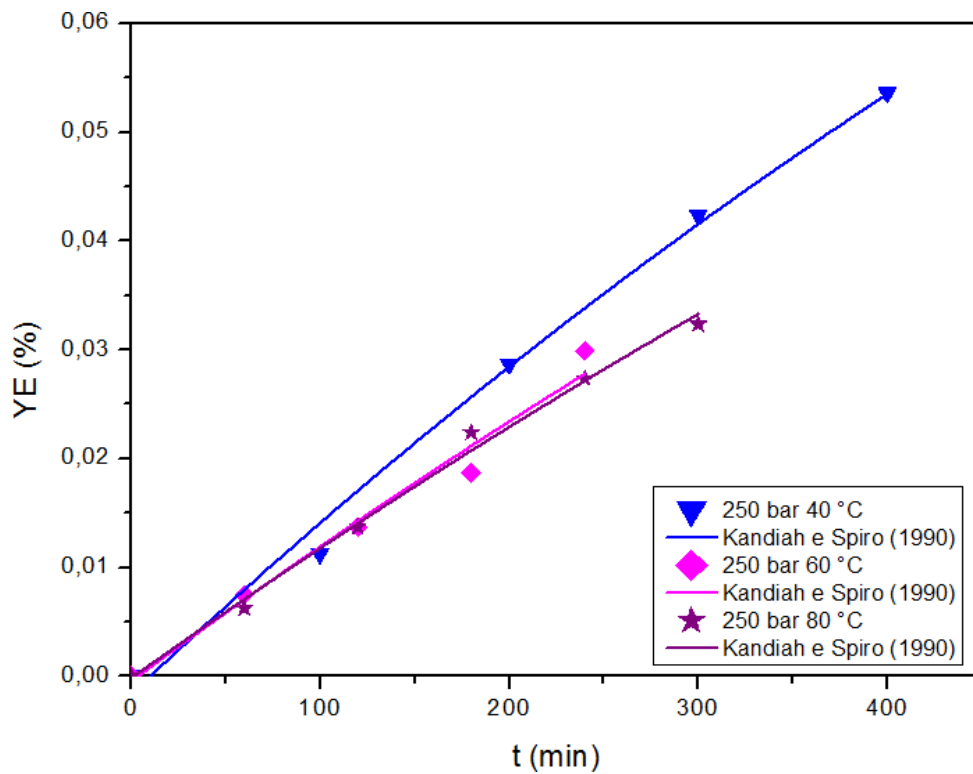


Figura 56: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Kandiah e Spiro (1990), a 250 bar - 40 °C, 250 bar - 60 °C e 250 bar - 80 °C.

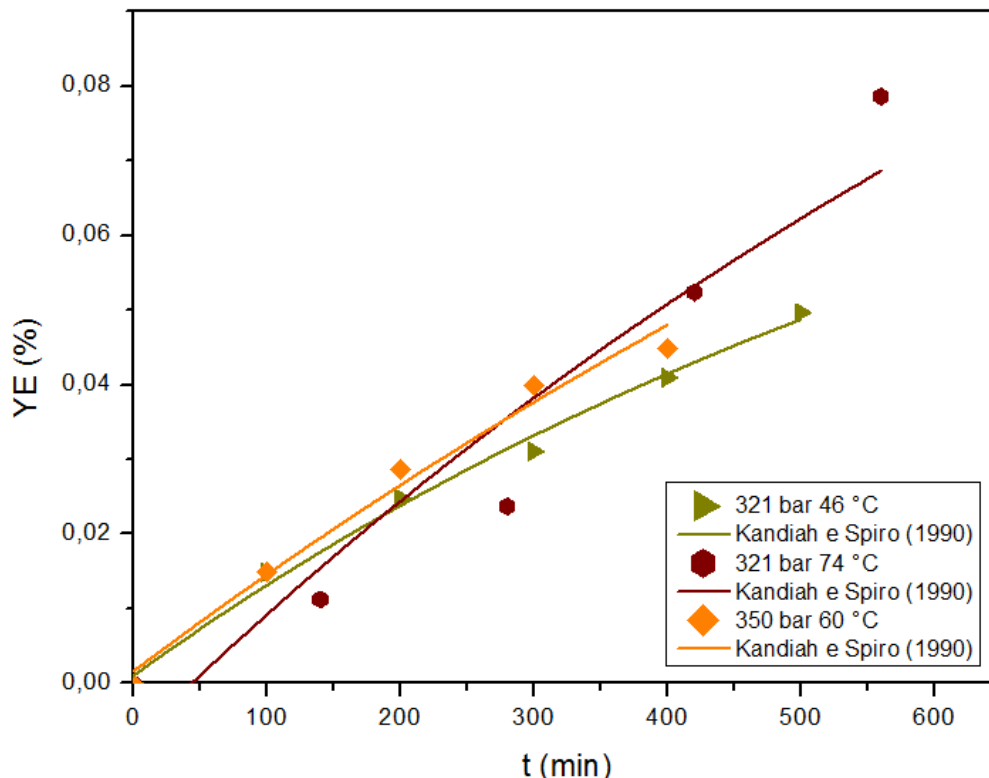


Figura 57: Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Kandiah e Spiro (1990), a 321 bar - 46 °C, 321 bar - 74 °C e 350 bar - 60 °C.

A condição de 150 bar e 60 °C apresentou o melhor ajuste para os dados experimentais, com desvios relativos de 0,05%. Apesar do estudo desse modelo apresentar somente 4 pontos, o modelo foi capaz de representá-lo. Para a condição operacional de 179 bar – 46 °C, o modelo de Kandiah e Spiro (1990) não apresentou bom ajuste com os dados experimentais, apesar de apresentar um desvio relativo médio de 8,87%. Já para a mesma pressão a 74 °C, observa-se que o modelo mostrou um bom ajuste, representando todos os dados experimentais, gerando um desvio relativo médio de 2,34%. O modelo conseguiu um bom ajuste em praticamente todas as curvas das condições de 250 bar a 40 °C, 60 °C e 80 °C. Entretanto, para os dados experimentais obtidos nas temperaturas de 60 e 80 °C, os modelos somente representaram a etapa inicial da extração e a 40 °C, os modelos somente representaram a etapa final da extração.

Para a condição de 350 bar e 60 °C, o modelo teve um bom ajuste na etapa inicial da extração, apresentando DRM de 4,50%. Já a 321 bar em 46 e 74 °C, o modelo representou melhor o período final de extração, com DRM de 4,30 e 20,37%, respectivamente. Além disso, um comportamento semelhante foi discutido por Rubio-Rodríguez *et al.* (2008), ao investigarem os ajustes dos parâmetros do modelo para a extração supercrítica do óleo dos subprodutos de *Merluccius capensis*. Foi observado que o processo poderia ser controlado pela solubilidade do óleo em SC-CO<sub>2</sub> nos primeiros estágios da extração. Assim, seria possível estimar os dados de solubilidade do óleo das curvas de extração em tempo zero.

Dessa forma, diante de tudo o que foi abordado e analisado até aqui, a Tabela 20 exibe todas as informações referentes aos desvios relativos médio dos modelos de Esquível *et al.* (1999), Reverchon e Osseo (1994), Zeković *et al.* (2003), Sovová (1994), Brunner (1984) e Kandiah e Spiro (1990) para todas as condições experimentais.

Pode ser visto que em geral, a condição que apresentou o maior desvio foi a 321 bar e 74 °C, devido à primeira etapa de extração ter sido muito evidente e a que apresentou o menor desvio foi na condição de 150 bar e 60 °C.

Tabela 20: Desvios relativos para os modelos matemáticos aplicados às curvas de extração.

<b>P</b> <b>(bar)</b>	<b>T</b> <b>(°C)</b>	<b>DR</b> <sub>Esquível</sub> <b>(%)</b>	<b>DR</b> <sub>Zekovic</sub> <b>(%)</b>	<b>DR</b> <sub>ReverchoneOsseo</sub> <b>(%)</b>	<b>DR</b> <sub>Sovová</sub> <b>(%)</b>	<b>DR</b> <sub>Brunner</sub> <b>(%)</b>	<b>DR</b> <b>KandiaheSpiro</b> <b>(%)</b>
179	46	5,12	5,68	8,11	3,14	13,48	8,87
179	74	5,49	5,75	8,77	8,75	2,73	2,34
321	46	5,32	4,93	8,61	6,14	6,78	4,30
321	74	14,90	5,83	5,12	18,72	29,70	20,37
250	40	6,65	9,82	11,28	1,31	7,61	5,64
250	80	6,15	8,18	8,77	6,50	4,98	4,53
150	60	6,30	8,68	7,45	9,75	8,65	0,05
350	60	5,04	6,22	8,34	4,03	6,23	4,50
250	60	9,69	10,46	15,73	3,38	5,50	6,03

Por fim, observou-se que o menor desvio relativo médio obtido pelo modelo de Esquível *et al.* (1999) foi na condição de 350 bar e 60 °C (5,04%), para o modelo de Zeković *et al.* (2003) foi na condição de 179 bar e 46 °C (5,68%), para o modelo de Reverchon e Osseo (1994) foi na condição de 321 bar e 74 °C (5,12%), para o modelo de Sovová (1994) foi na condição de 250 bar e 40 °C (1,31%), para o modelo de Brunner (1984) foi na condição de 179 bar e 74 °C (2,73%) e para o modelo de Kandiah e Spiro (1990) foi na condição de 150 bar e 60 °C (0,05%).

### 5.7.2 Modelos de solubilidade

A predição da solubilidade das substâncias presentes em *Bidens pilosa*, aplicados na extração por fluido supercrítico é de grande importância, visto que é necessária para o melhor entendimento do comportamento da interação soluto – solvente nas condições experimentais realizadas. Para tal, foi necessário determinar algumas variáveis, dentre elas: a densidade do fluido  $\rho$  (mg/L), o tempo de extração (min) para cada condição, o volume de solvente utilizado (L), a vazão do CO<sub>2</sub> (L/min) e a solubilidade do sólido (mg do soluto/L de solução). Assim, os dados de solubilidade dos experimentos foram correlacionados pelos modelos de Chrastil (1982), Adachi e Lu (1983), Del Valle e Aquilera (1988) e Gordillo (1999). Na Tabela 21, podem ser observados os resultados experimentais da solubilidade das substâncias extraídas com CO<sub>2</sub>-SC, seus respectivos desvios e as solubilidades calculadas para cada modelo utilizado.

Os resultados mostraram que a solubilidade experimental variou de 0,0007 g/L a 0,0033 g/L (g óleo/L CO<sub>2</sub>), dependendo das condições utilizadas. É possível perceber também uma relação entre a solubilidade e a quantidade de óleo obtida, a partir das condições de temperatura e pressão. A quantidade máxima extraída (0,0023 g) ocorreu na condição de 321 bar e 74 °C, assim como a maior solubilidade experimental (0,0033 g/L). Já a menor solubilidade ocorreu a 179 bar e 74 °C (0,0007 g/L) e a menor quantidade de óleo extraído (0,0008 g), a 150 bar e 60 °C. Portanto, conclui-se que o aumento da pressão e da temperatura implica também em um aumento da solubilidade. Observou-se também que, com a estimação dos parâmetros para cada modelo, o menor desvio médio relativo foi para o modelo de Gordillo (1999), apresentando 5,04%. Já os modelos de Chrastil (1982), Adachi e Lu (1983) e Del Valle e Aquilera (1988) apresentaram DRM de 10,07, 8,42 e 9,83%, respectivamente. Tal fato corrobora com o trabalho de Zekovic *et al.* (2014), de tal forma que os resultados obtidos para



a solubilidade do cadineno e linalool nos experimentos realizados por CO<sub>2</sub>-SC, o modelo de Gordillo (1999) forneceu o melhor ajuste com os dados experimentais.

Tabela 21: Parâmetros dos modelos de solubilidade utilizados e seus desvios médios relativos.

Modelos			Chrastil (1982)	Del Valle (1988)	Adachi e Lu (1983)	Gordillo (1999)
T (°C)	P (bar)	S <sub>exp</sub> (g/L)	S <sub>cal</sub> (g/L)			
46	179	0,0020	0,0012	0,0012	0,0012	0,0018
74	179	0,0017	0,0010	0,0010	0,0010	0,0007
46	321	0,0012	0,0014	0,0014	0,0014	0,0011
74	321	0,0033	0,0015	0,0015	0,0015	0,0023
40	250	0,0015	0,0013	0,0014	0,0013	0,0016
80	250	0,0011	0,0013	0,0013	0,0013	0,0013
60	150	0,0008	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009
60	350	0,0014	0,0015	0,0015	0,0015	0,0016
60	250	0,0014	0,0013	0,0013	0,0013	0,0013
60	250	0,0013	0,0013	0,0013	0,0013	0,0013
60	250	0,0013	0,0013	0,0013	0,0013	0,0013
DRM (%)			10,07	9,83	8,42	5,04

A estimação dos parâmetros usando as equações de Chrastil (1982) e Gordillo (1999), representaram bem todos os dados. Os valores dos parâmetros estimados estão na mesma ordem de grandeza que os observados nos trabalhos de Hojjati *et al.* (2009) e Dwi *et al.* (2016). Os desvios foram baixos, e os parâmetros também correlacionaram as solubilidades da acetofenona e do letrozol, anastrozol e o exemestano de esteroides em dióxido de carbono supercrítico.

Zuknik *et al.* (2016) também correlacionaram as solubilidades do óleo de coco em CO<sub>2</sub>-SC, por meio do modelo de Del Valle e Aguilera (1988). O modelo mostrou um bom ajuste com os dados experimentais, gerando um desvio relativo médio abaixo de 10%. Apesar da proximidade com os resultados apresentados na Tabela 21, seus parâmetros calculados pelo modelo não se encontram similares a este trabalho.

## 6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A extração com fluido supercrítico foi capaz de extrair as substâncias das folhas secas de *Bidens pilosa* L. em condições mais brandas, sem utilizar solvente e conservando a integridade das mesmas. Diante disso, constatou-se que a melhor condição de extração ocorreu a 321 bar e 74 °C.

Os métodos convencionais de extração usando o Soxhlet, maceração e infusão extraíram flavonoides e poliacetilenos de maneira seletiva, apresentando diferentes teores de acordo com o tipo de extração. Já na extração com CO<sub>2</sub>-SC, foram alcançadas duas condições promissoras à extração de substâncias que apresentaram espectros ultravioleta característicos de terpenos encontrados em óleo essencial (321 bar a 74 °C e 250 bar a 40 °C). Além disso, a partir do fluido supercrítico, foram obtidos extratos com altos teores de terpenos, entre eles o L-limoneno, o 1,8-cineol, o β-cariofileno, o ácido palmítico, o ácido linolênico e o fitol, indicando ser uma técnica viável para esse fim.

Os extratos analisados EBPC-SC-ET e EBPC-MC apresentaram promissores teores de inibição de crescimento nas duas linhagens de células tumorais utilizadas, visto que se trata de uma análise de um extrato bruto, apresentando 68 % para melanoma (SK-MEL-28) e 91% para leucemia (K562), respectivamente, sendo ambos em concentração de 150 µg/mL.

Os modelos cinéticos foram aptos a representar a extração do óleo de *Bidens pilosa*, apresentando desvio máximo de 29,70% na condição de 321 bar e 74 °C para o modelo de Brunner (1984) e mínimo de 0,05% na condição de 150 bar e 40 °C, para o modelo de Kandiah e Spiro (1990). O bom comportamento dos modelos de solubilidade pode ajudar na predição de novos dados em diferentes condições de temperatura e pressão.

Como perspectivas para trabalhos futuros, sugere-se:

- variar a vazão de CO<sub>2</sub> e implantar o uso de cossolventes para a melhora do rendimento da extração;
- fazer testes de extração somente com as raízes, caules e inflorescências, de modo a verificar o perfil desses extratos com CO<sub>2</sub>-SC;
- desenvolver uma metodologia específica para cromatografia preparativa visando a separação direta dos flavonoides e poliacetilenos dos extratos convencionais;
- realizar um novo teste de inibição do crescimento adicionando novas concentrações no intervalo entre 1,5 e 150 µg/mL.

## 7 – REFERÊNCIAS

- ABROGOUA, D.; DANO, D.; MANDA, P.; ADEPO, A.; KABLAN, B.; GOZE, N.; EHOULÉ, K. Effect on blood pressure of a dietary supplement containing traditional medicinal plants of Côte d'Ivoire. *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 840–847, 2012.
- ADACHI, Y.; LU, B. C. Supercritical fluid extraction with carbon dioxide and ethylene. *Fluid Phase Equilibria*, 14, 147–156, 1983.
- ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry* (4<sup>a</sup> ed.). Allured Publishing Corporation, 2007.
- ADEDAPO, A.; JIMOH, F.; AFOLAYAN, A. Comparison of the nutritive value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Bidens pilosa* and *Chenopodium album*. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 68 (1), 83-92, 2011.
- AGROLINK. Picão preto (*Bidens pilosa*). Acesso em 15 de dezembro de 2017, disponível em [http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/picao-preto\\_13.html](http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/picao-preto_13.html), 2017.
- AHMED, S. I.; HAYAT, M. Q.; TAHIR, M.; MANSOOR, Q.; ISMAIL, M.; KECK, K.; BATES, R. B. Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16 (460), 1-9, 2016.
- AIYAKOOL, W.; VAJRODAYA, S. Comparative phytochemistry of *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC (Rutaceae) in Thailand by thin layer chromatographic technique. *Agricultural Sciences*, 4, 52-59, 2014.
- ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. International thermodynamic tables of the fluid state-5: methane. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 16 (5), 247 p., 1976.
- ANVISA. Monografia da espécie *Bidens pilosa* (Picão - preto). Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 85 p., 2015.
- ANVISA. *Farmacopeia Brasileira* (5<sup>o</sup> ed.). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 545 p., 2011.
- ANVISA. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 126 p., 2011.
- ASHAFA, A. O.; AFOLAYA, A. J. Screening the root extracts from *Biden pilosa* L. var. *radiata* (Asteraceae) for antimicrobial potentials. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (8), 568-572, 2009.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I.; RAHMAN, M.; SHARIF, K.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N. O.; OMAR, A. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426–436, 2013.
- BARROS, N. A.; ASSIS, A. V.; MENDES, M. F. Extração do óleo de manjeriço usando fluido supercrítico: análise experimental e matemática. *Ciência Rural*, 44 (8), 1499-1505, 2014.
- BARROS, Q. H. Extração supercrítica combinando duas diferentes fontes naturais para obtenção de óleo especial enriquecido com carotenoides. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 123 p., 2015.

- BARTOLOME, A.; VILLASEÑOR, I.; YANG, W. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical properties, traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-51, 2013.
- BASAAR, O.; AL-SAEEDI, A.; FATEMA, S.; MOHSIN, M.; FAROOQUI, M. Review supercritical fluid extraction of herbal drugs and their characterization. *Journal of Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 285-289, 2015.
- BENELLI, P.; RIEHL, C. A.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F.; FERREIRA, S. R. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55, 132-141, 2010.
- BORGES, C. C.; MATOS, T. F.; MOREIRA, J.; ROSSATO, A. E.; ZANETTE, V. C.; AMARAL, P. A. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): traditional use in a community of southern Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14, 34-40, 2013.
- BRANDÃO, M. G. Dossiê Técnico, Produção de chás e extratos de plantas medicinais. *Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais*, 24 p., 2007.
- BRITO, I. P. Sensibilidade de indivíduos e progênies de *Bidens pilosa* e *Conyza sumatrensis* ao amônio glufosinate. *Tese (Tese em Ciências Agrônômicas) Universidade Estadual Paulista*, 73 p., 2016.
- BRUNNER, G. Mass transfer from solid material in gas extraction. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 88, 887-891, 1984.
- BUSKUH, H.; FREITAS, R. A.; MONACHE, F. D.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; CORILO, Y. E.; EBERLIN, M. N.; BIAVATTI, M. W. A. New polyacetylene from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) and its in vitro antitumoral activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20 (7), 1327-1333, 2009.
- CABRAL, F.; PAULA, J.; AGUIAR, A.; SOUSA, I.; MAGALHÃES, P.; FOGGIO, M. Scale-up study of supercritical fluid extraction process for *Baccharis dracunculifolia*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 219 - 225, 2016.
- CAETANO, R. S.; SOUZA, A. C.; FEITOZAO, L. F. O uso de plantas medicinais utilizadas por frequentadores dos ambulatórios Santa Marcelina, Porto Velho – RP. *Revista Saúde e Pesquisa*, 7 (1), 55-63, 2014.
- CAMPOS, L. M. Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*): parâmetros de processo e modelagem matemática. *Dissertação (Dissertação em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina*, 141 p., 2005.
- CÁRDENAS, M.; MARDER, M.; BLANK, V.; ROGUIN, L. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 2966–2971, 2006.
- CARDOSO, I. C. Desenvolvimento, otimização e pré-validação de método analítico para a quantificação de rutina por CLAE-DAD em extratos de *Alpinia zerumbet*. *Dissertação (Dissertação em Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro*, 153 p., 2013.

- CARRILHO, E.; TAVARES, M. C.; LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica. III. Cromatografia com fluido supercrítico: aplicações. *Química nova*, 29 (4), 790-795, 2006.
- CASTRO-VARGAS, H.; RODRÍGUEZ-VARELAB, L.; FERREIRA, S.; PARADA-ALFONSO, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51, 319-324, 2010.
- CHAND, R. N.; GOPALAN, R. D.; CHRISTI, K. Evaluation of antioxidant properties in thirteen Fijian medicinal plants used in Alzheimer's disease and related illness. *Free Radicals and Antioxidant*, 8 (1), 11-17, 2018.
- CHANG, J. S.; CHIANG, L.; CHEN, C.; LIU, L.; WANG, K.; LIN, C. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. *American journal of chinese medicine*, 29 (2), 303-312, 2001.
- CHANG, S. L.; YEH, H. H.; LIN, Y. S.; CHIANG, Y. M.; WU, T. K.; YANG, W. C. The effect of centaurein on interferon- $\gamma$  expression and *Listeria* infection in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 219 (1), 54-61, 2007.
- CHEN, G.; CUI, C.; QI, A.; LI, C.; TAO, Z.; REN, R. Polyanthumin, a novel cyclobutane chalcone trimmer from *Memecylon polyanthum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17, 170-177, 2015.
- CHIANG, Y. M.; CHANG, C. L.; CHANG, S. L.; YANG, W. C.; SHYUR, L. F. Cytopiloyne, a novel polyacetylenic glucoside from *Bidens pilosa*, functions as a T helper cell modulator. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 532-538, 2007.
- CHRISTIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. *The Journal of Physical Chemistry*, 86, 3016-3021, 1982.
- COELHO, P. L. Avaliação da ação antitumoral e imunomodulatória do flavonoide apigenina, extraído de *Croton Betulastes* MULL, em células de glioma. *Programa de pós-graduação em Imunologia. Universidade Federal da Bahia*, 2013.
- CORTES-ROJAS, D. F. Extratos secos padronizados de *Bidens pilosa* L.: Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade biológica. *Dissertação* (Dissertação em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, 2011.
- CORTES-ROJAS, D.; CHAGAS-PAULA, D. A.; COSTA, F. B.; SOUZA, C. R.; OLIVEIRA, W. P. Bioactive compounds in *Bidens pilosa* L. populations: a key step in the standardization of phytopharmaceutical preparations. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23 (1), 28-35, 2013.
- COSTA, M. A.; DIAS, A. G.; GUIMARÃES, P. I. *Guia prático de química orgânica - Volume I: Técnicas e procedimentos: aprendendo a fazer* (Vol. 1). Interciência, 2004.
- COUTINHO, M. A.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista virtual de química*, 1 (2), 241-256, 2009.
- CRETU, G.; MORLOCK, G.; MIRON, A. R.; NECHIFOR, A. C. A high-performance thin-layer chromatographic method for chlorogenic acid and hyperoside determination from berry extracts. *Romanian Biotechnological Letters*, 18 (5), 8657-8665, 2013.

- DANIELSKI, L. Solubilidade das oleoresinas de calêndula (*Calemlula oflicinalis* L.) e cavalinha (*Equisetum arvense*) em CO<sub>2</sub> supercrítico. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, 161 p., 2002.
- DEBA, F.; XUAN, T. D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*, 19, 346–352, 2008.
- DEL VALLE, J. M.; AGUILERA, J. M. An Improved Equation for Predicting the Solubility of Vegetable Oils in Supercritical CO<sub>2</sub>. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 27, 1551-1553, 1988.
- DENG, S. P.; TU, L. Y.; PI, J.; JIN, H. C. Synthesis, characterization and anticâncer activity of kaempferol-zinc(II) complex. *Bioorganic e Medicinal Chemistry letters*, 26, 2730-2734, 2016.
- DIAS, A. L. Extração supercrítica de compostos bioativos da pimenta dedo de moça (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*) assistida por ultrassom. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, 189 p., 2015.
- DIAS, A.; SERGIO, C.; SANTOS, P.; BARBERO, G.; REZENDE, C. A.; MARTINEZ, J. Effect of ultrasound on the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 284-294, 2016.
- DIEAMANT, G.; PEREDA, M. D.; NOGUEIRA, C.; EBERLIN, S.; FACCHINI, G.; CHECON, J. T.; CESAR, C. K.; MUSSI, L.; POLEZEL, M. A.; MARTINS-OLIVEIRA, D.; STASI, L. C. Antiageing mechanisms of a standardized supercritical CO<sub>2</sub> preparation of Black Jack (*Bidens pilosa* L.) in human fibroblasts and skin fragments. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11, 2015.
- DOLL-BOSCARDIN, P. M.; SARTORATTO, A.; MAIA, B. H. L. N. S.; PAULA, J. P.; NAKASHIMA, T.; FARAGO, P. V.; KANUNFRE, C. C. In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. *Hindawi Publishing Corporation*, 1-9, 2012.
- DRAG, M.; SUROWIAK, P.; MALGORZATA, D. Z.; DIETEL, M.; LAGE, H.; OLEKSYSZYN, J. Comparison of the cytotoxic effects of birch bark extract, botulin and betulinic acid towards human gastric carcinoma and pancreatic carcinoma drug-sensitive and drug-resistant cell lines. *Molecules*, 14 (4), 1639-1651, 2009.
- DUVAL, J.; PECHER, V.; POUJOL, M.; LESELLIER, E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Industrial Crops and Products*, 94, 812-833, 2016.
- DWI, M. Y.; JULIAN, J.; PUTRO, J.; NUGRAHA, A.; JU, Y.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Solubility of Acetophenone in Supercritical Carbon Dioxide. *The Open Chemical Engineering Journal*, 10, 18-28, 2016.
- ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G.; KING, M. B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, 16, 43-58, 1999.
- FALOWO, A. B.; MUCHENJE, V.; HUGO, C. J.; CHARIMBA, G. In vitro antimicrobial activities of *Bidens pilosa* and *Moringa oleifera* leaf extracts and their effects on ground beef quality during cold storage. *CyTA - Journal of Food*, 14 (4), 541-546, 2016.

FARMACOPÉIA. *Farmacopeia Brasileira, Ministério da Saúde, Parte I – Métodos Gerais* (4<sup>o</sup> ed.). Brasília, 1996.

FARMACOPÉIA. *Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil*. (2<sup>o</sup> ed.), 1959.

FAVARETO, R.; TEIXEIRA, M.; SOARES, F.; BELISÁRIO, C.; CORAZZA, M.; CARDOZO-FILHO, L. Study of the supercritical extraction of Pterodon fruits (Fabaceae). *The Journal of Supercritical Fluids*, 128, 159-165, 2017.

FELITO, R. A.; KREMER, T. C.; ROCHA, A. M.; YAMASHITA, O. M.; GERVAZIO, W. Atividade Alelopática de *Stachytarpheta cayennensis* em Sementes de *Lactuca sativa*. *Cadernos de Agroecologia*, 11 (2), 1-10, 2016.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. Alelopatia: Uma área emergente da Ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12, 175-204, 2000.

FERREIRA, S.; MEIRELES, M. Modeling the Supercritical Fluid Extraction of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oil. *Journal Food Engineering*, 54, 263-269, 2002.

FILIPPIS, F. M. Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de óleos essenciais de Hon-sho - Experimentos e modelagem. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 114 p., 2001.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250, 34-48, 2012.

FOTSO, A. F.; LONGO, F.; DJOMENI, P. D.; KOUAM, S. F.; SPITELLER, M.; DONGMO, A. B.; SAVINEAU, J. P. Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae). *Inflammopharmacology*, 22, 105-114, 2014.

FREITAS, R.; BERGER, P.; FERREIRA, L.; CARDOSO, A.; FREITAS, T.; PEREIRA, C. Interferência de plantas daninhas na cultura de algodão em sistema de plantio direto. *Planta Daninha*, 20, 197-205, 2002.

GARCEZ, J. J. Obtenção do extrato volátil de sementes de *Anethum graveolens* L. por diferentes técnicas extrativas. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia e Tecnologia de Materiais) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 104 p., 2016.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca (Biologia), Serie Fisiologia Vegetal*, 2 (3), 119-145, 2009.

GARCÍA, L. T.; LEAL, A. F. L.; MORENO, E. M.; STASHENKO, E. E.; ARTEAGA, H. A. Differential anti-proliferative effect on K562 leukemia cells of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils produced under diverse growing, collection and extraction conditions. *Industrial Crops and Products*, 96, 140-148, 2017.

GARMUS, T.; PAVIANI, L.; QUEIROGA, C.; MAGALHÃES, P.; CABRAL, F. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 86, 4-14, 2014.

GBASHI, S.; NJOBEH, P.; STEENKAMP, P.; MADALA, N. Pressurized hot water extraction and chemometric fingerprinting of flavonoids from *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry. *CyTA - Journal of Food*, 15 (2), 171-180, 2017.

- GILBERT, B.; ALVES, L. F.; FAVORETO, R. *Bidens pilosa* L. Asteraceae (Compositae; subfamília Heliantheae). *Revista Fitos*, 8, 1-72, 2013.
- GORDILLO, M. D.; BLANCO, M. A.; MOLERO, A.; MARTINEZ DE LA OSSA, E. Solubility of the antibiotic penicillin G in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 15 (3), 183-189, 1999.
- GRANATO, D.; NUNES, D. S. *Análises químicas, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos e bebidas: Uma abordagem teórico e prática* (1ª ed.). Elsevier, 2016.
- GROMBONE-GUARATINI, M. T.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; SOLFERINI, V. N.; SEMIR, J.; TRIGO, J. R. Sesquiterpene and polyacetylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae: Heliantheae) from Southeast of Brasil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 479-486, 2005.
- HAN, J.; WOO, H.; SHIN, B.; CHO, I.; KOO, H.; KIM, M. Anti-obesity Effect of Carbon Dioxide Supercritical Fluid Extracts of *Panax Ginseng* C. A. Meyer. *The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54, 738-743, 2011.
- HASSAN, K. A.; DEOGRATIUS, O.; NYAFUONO, J. F.; FRANCIS, O.; ENGEU, O. P. Wound healing potential of the ethanolic extracts of *Bidens pilosa* and *Ocimum suave*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 (2), 132-136, 2011.
- HE, J.; SHAO, P.; LIU, J.; RU, Q. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Flavonoids from Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) Peel and Their Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 13065-13078, 2012.
- HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98 (1), 136-148, 2006.
- HOJJATI, M.; VATANARA, A.; YAMINI, Y.; MORADI, M.; NAJAFABADI, A. R. Supercritical CO<sub>2</sub> and highly selective aromatase inhibitors: Experimental solubility and empirical data correlation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 50 (3), 203-209, 2009.
- HSU, Y. J.; LEE, T. H.; CHANG, C. L.; HUANG, Y. T.; YANG, W. C. Anti-hyperglycemic effects and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 379-383, 2009.
- JESUS, S. P.; GRIMALDI, R.; HENSE, H. Recovery of  $\gamma$ -oryzanol from rice bran oil byproduct using supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55, 149-155, 2010.
- JÚNIOR, C. V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26 (3), 390-400, 2003.
- KANDIAH, M.; SPIRO, M. Extraction of *Ginger rhizome*: kinetic studies with acetone. *International Journal of Food Science and Technology*, 24, 589-600, 1989.
- KANDIAH, M.; SPIRO, M. Extraction of *Ginger rhizome*: kinetic studies with supercritical carbon dioxide. *International Journal of Food Science and Technology*, 25, 328-338, 1990.
- KHAN, T. H.; SULTANA, S. Apigenin induces apoptosis in Hep G2 cells: possible role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Toxicology*, 16, 206-212, 2006.
- KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 2 (18), 2328-2375, 2013.



- KITZBERGER, C.; LOMONACO, R.; MICHIELIN, E.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: curve modeling and extract composition. *Journal of Food Engineering*, 90, 35-43, 2009.
- KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G.; FERRARI, W. M. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (8), 1033-1042, 2001.
- KRÓL, S. K.; KLELBUS, M.; RIVERO-MULLER, A.; STEPULAK, A. Comprehensive review on Betulin as a Potent anticancer agent. *BioMed Research International*. 1-11, 2015.
- KUMARI, P.; MISRA, K.; SISODIA, B. S.; FARIDI, U.; SRIVASTAVA, S.; LUQMAN, S.; DAROKAR, M. P.; NEGI, A. S.; GUPTA, M. M.; SING, S. C.; KUMAR, J. K. A promising anticancer and antimalarial component from the leaves of *Bidens pilosa*. *Planta medica*, 75, 59-61, 2009.
- KVIECINSKI, M. R.; FELIPE, K. B.; SCHOENFELDER, T.; WIESE, L. P.; ROSSI, M. H.; GONÇALVES, E.; FELICIO, J. D.; FILHO, D. W.; PEDROSA, R. C. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 69-75, 2008.
- KVIECINSKI, M.; BENELLI, P.; FELIPE, K.; CORREIA, J.; PICH, C.; FERREIRA, S.; PEDROSA, R. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity. *Journal of Supercritical Fluids*, 56, 243-248, 2011.
- LEE, S.; KANG, K.; ODOVSAMBUU, S.; JHO, E.; YUN, J.; YOO, J.; LEE, E. H.; PAN, C. H.; LEE, J. K.; JUNG, S. H.; NHO, C. W. A polyacetylene from *Gymnaster koraiensis* exerts hepatoprotective effects in vivo and in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (11), 3035-3041, 2010.
- LIEN-CHAI, C.; JUNG-SAN, C.; CHI-CHAIN, C.; LEAN-TEIK, N.; CHUN-CHING, L. Anti-Herpes simplex virus activity of *Bidens pilosa* and *Houttuynia cordata*. *The American Journal of Chinese Medicine*, 31 (3), 355-362, 2003.
- LIMA, M. A.; CHARALAMPOPOULOS, D.; CHATZIFRAGKOU, A. Optimisation and modelling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction process of carotenoids from carrot peels. *The Journal of Supercritical Fluids*, 133, 94-102, 2018.
- LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides, Farmacologia de Flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 3, 18-22, 2003.
- LÓPEZ-PADILLA, A.; RUIZ-RODRIGUEZ, A.; REGLERO, G.; FORNARI, T. Supercritical carbon dioxide extraction of *Calendula officinalis*: Kinetic modeling and scaling up study. *The Journal of Supercritical Fluids*, 130, 292-300, 2017.
- LUCCHETTI, L.; TEIXEIRA, D. F.; BARBI, N. S.; SILVA, A. J. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). *Revista Fitos*, 4, 60-70, 2009.
- MABRY, T.; MARKHAM, K.; THOMAS, M. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, 1970.
- MARCETIC, M.; BOŽIĆ, D.; MILENKOVIĆ, M.; LAKUSIĆ, B.; KOVACEVIĆ, N. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of different parts of *Seseli rigidum*. 8 (7), 1091-1094, 2012.

- MARTÍNEZ, J. Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO<sub>2</sub> supercrítico: Desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos. *Tese* (Tese em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, 190 p., 2005.
- MARTÍNEZ, J. Estudo de modelos de transferência de massa na interface sólido-fluido durante processos de extração supercrítica. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Alimentos, 154 p., 2002.
- MASSIMINO, S.; KEARNS, R. J.; LOOS, K. M.; BURR, J. Effects of age and dietary beta-carotene on immunological variables in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17 (6), 835-842, 2003.
- MATOS, F. J. Introdução à fitoquímica experimental. UFC, 1997.
- MAUL, A. Fluidos supercríticos - Situação atual e futuro da extração supercrítica. *Biotecnologia ciência e desenvolvimento*, 11, 42-46, 1999.
- MELECCHI, M. I. Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L.: Estudo comparativo de métodos de extração. *Tese* (Tese em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 218 p., 2005.
- MICHIELIN, E. M. Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina de cavalinha (*Equisetum arvense*). *Dissertação* (Dissertação em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, 105 p., 2002.
- MODZELEWSKA, A.; PETTIT, C.; ACHANTA, G.; DANIDSON, N. E.; HUANG, P.; KHAN, S. R. Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, 14, 3491-3495, 2006.
- MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-HALLOUTY, S. M.; EL-BAZ, F. K.; MISRA, A. N. GC/MS Profiling, *in vitro* antioxidant and cytotoxic activities of *Bidens pilosa*. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants*, 47, 2051-4263, 2014.
- MONTEAGUDO, J. J. Síntesis de produtos naturales y derivados com actividad antiparasitária y antitumoral a partir de ácido abiético. *Tese* (Tese em Química) Universidade de Granada, p. 435, 2015.
- MOODLEY, S.; KOORBANALLY, N. A.; MOODLEY, T.; RAMJUGERNATH, D.; PILLAY, M. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid, cheap, screening test for the *in vitro* anti-tuberculous activity of chalcones. *Journal of Microbiological Methods*, 104, 72-78, 2014.
- MOREIRA, M. M. Diterpenos com atividade antitumoral frente células leucêmicas: uma revisão. *Trabalho de Conclusão* (Trabalho de Conclusão em Farmácia) Universidade Federal da Paraíba, 92 p., 2013.
- MORI, S. A. Eastern, extra-Amazonian Brazil. In Floristic inventory of tropical countries: the status of plant systematics, collections, and vegetation, plus recommendations for the future (D.G. Campbell & H.D. Hammond, eds.). *The New York Botanical Garden*, 427-454, 1989.
- MORI, S.; MATTOS-SILVA, L.; LISBOA, G.; CORADIN, L. Manual de manejo do herbário fanerogâmico. *Ilhéus, CEPLAC*, 1989.

- MOTA, M. F.; BENFICA, P. L.; BATISTA, A. C.; MARTINS, F. S.; PAULA, J. R.; VALADARES, M. C. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. *Journal of Ethnopharmacology*, 139 (2), 319-329, 2012.
- NADIA, N. A. C.; PONE, W., KAUSHI, K., KRISHNAN, M., GARIMA, M., ARLETTE, N. T., SHUBBI, M.; MBIDA, M.; SAHAL, D. In vitro Antiplasmodial activity and cytotoxicity of extracts and fractions of *Bidens pilosa*. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 61, 28-34, 2017.
- NAKAMA, S.; ISHIKAWA, C.; NAKACHI, S.; MORI, N. Anti-adult t-cell leukemia effects of *Bidens pilosa*. *International journal of oncology*, 38, 1163-1173, 2011.
- NAKAMA, S.; TAMAKI, K.; ISHIKAWA, C.; TADANO, M.; MORI, N. Efficacy of *Bidens pilosa* extract against herpes simplex virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10, 2012.
- NAKAMURA, M. J. Qualificação química e extrativa da oleorresina de copaíba (*Copaifera paupera*) no estado do Acre. *Dissertação* (Dissertação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 226 p., 2016.
- NASCIMENTO, G. M. Extração e avaliação farmacológica de óleos essenciais de pimenta para fins tecnológicos. *Dissertação* (Dissertação em Inovação Tecnológica) Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 101 p., 2015.
- OLIVEIRA, F.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A.; BRANDÃO, M. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 39-42, 2004.
- OLIVEIRA, L. R. A influência do aquecimento na estrutura semicristalina da polianilina sal de esmeraldina (PANI-ES). *Dissertação* (Dissertação em Física) Universidade Federal do Amazonas, 81 p., 2015.
- OLIVEIRA, R. P. Desenvolvimento de nanoemulsões contendo flavonoides de *Ocotea notata* (Ness) Mez e Avaliação de atividades biológicas. *Dissertação* (Dissertação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) Universidade Federal Fluminense, 63 p., 2014.
- PARAGINSKI, R. T.; TALHAMENTO, A.; OLIVEIRA, M.; ELIAS, M. C. Efeitos da temperatura nas alterações do teor de compostos com potencial antioxidante em grãos de milho durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 17 (2), 159-167, 2015.
- PEREIRA, C. S. Avaliação de diferentes tecnologias na extração do óleo do Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L). *Dissertação* (Dissertação em Engenharia Química) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 91 p., 2009.
- PEREIRA, J. A. Avaliação da viabilidade do metabolismo secundário em *Cordia verbenacea* DC. *Tese* (Tese em ciências farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista, 158 p., 2017.
- PINTO, G. M.; PINTO, J. F.; JARDIM, I. C. Extração com Fluido Supercrítico. *Chemkeys*, 2006.
- PIVA, G.; WESCHENFELDER, T.; FRANCESCHI, E.; CANSIAN, R.; PAROUL, N.; STEFFENS, C. Extraction and modeling of flaxseed (*Linum usitatissimum*) oil using subcritical propane. *Journal of Food Engineering*, 228, 50-56, 2018.

- POLITI, F. A. Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber). *Dissertação* (Dissertação em ciências farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista, 144 p., 2009.
- RABÊLO, G. O.; FERREIRA, A. L.; YAMAGUSHI, M. Q.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Bidens pilosa* L. na germinação e no desenvolvimento de espécies cultivadas. *Revista Científica da Faminas*, 4 (1), 1-8, 2008.
- RAFFA, D.; MAGGIO, B.; RAIMONDI, M.; PLESCIA, F.; DAIDONE, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 213-228, 2017.
- RAINTREE. *Tropical Plant Database*. Acesso em 20 de janeiro de 2017, disponível em Raintree: <http://www.rain-tree.com/picaopreto.htm#.WodB5IPwbIU>, 1996.
- RAMOS, J. C. Polímeros quirais: Polipirróis e politiofenos modificados com R-(-) ou S-(+)-N-(3,5-Dinitrobenzoi)-a-fenilflicina. *Tese* (Tese em Química) Universidade Federal de Pernambuco, 116 p., 2007.
- REVERCHON, E. Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil. *AIChE, The Global Home of Chemical Engineers*, 42 (6), 1765–1771, 1996.
- REVERCHON, E.; OSSEO, L. S. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of basil oil: characterization of products and process modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 7, 185–190, 1994.
- REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista Escola de Enfermagem*, 36 (3), 282-288, 2002.
- RODRIGUEZ, J.; YANEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; BENAVENTE-GARCIA, O.; LORENTE, J.; LOZANO, J. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines: relationship between structure and activity. *Melanoma Research*, 12, 99-107, 2002.
- ROIG Y MESA, J. T. *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba* (Vol. 1). Científico-Técnica, 1992.
- ROSA, A.; MAXIA, A.; PUTZU, D.; ATZERI, A.; ERA, B.; FAIS, A.; SANNA, C. P. Chemical composition of *Lycium europaeum* fruit oil obtained by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and evaluation of its antioxidant activity, cytotoxicity and cell absorption. *Food Chemistry*, 230, 82-90, 2017.
- ROSSO, S. R. Aproveitamento do resíduo da agroindústria da banana: caracterização química e levantamento de parâmetros termodinâmicos. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, 164 p., 2009.
- RUBIO-RODRIGUEZ, N.; DIEGO, S. M.; BELTRAN, S.; JAIME, I.; SANZ, M. T.; ROVIRA, J. Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis* – *Merluccius paradoxus*) by-products: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47, 215-226, 2008.
- SAHENA, F.; ZAIDUL, I.; JINAP, S.; KARIM, A.; ABBAS, K.; NORULAINI, N.; OMAR, A. Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 95 (2), 240-253, 2009.
- SALGADO, G. C.; SANTANA, C. A.; FONTANETTI, A.; MARIANO, E. D. Interação do manejo cultural e mecânico no desenvolvimento do Picão Preto (*Bidens pilosa* L.). *Cadernos de Agroecologia*, 9 (4), 2014.

- SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E.; HERRERO, M. Chapter - Supercritical fluid extraction, *Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 1-58, 2014.
- SANTOS, G. J.; PINHEIRO, D. C. Aspectos da terapia etnofarmacológica associados à atividade antitumoral. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 10 (3), 494 – 509, 2016.
- SANTOS, J.; CURY, J. Picão-preto: uma planta daninha especial em solos tropicais. *Planta Daninha*, 29, 1159-1171, 2011.
- SANTOS, M. S.; MEYDANI, S. N.; LEKA, L.; WU, D.; FOTOUHI, N.; MEYDANI, M.; HENNEKENS, C. H.; GAZIANO, J. M. Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64 (5), 772-777, 1996.
- SANTOS, R. A. Estudo fitoquímico e avaliação biológica dos flavonoides isolados de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard . *Tese (Tese em Química)* Universidade Federal da Bahia, 137 p., 2014.
- SARTOR, R. B. Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor. *Dissertação (Dissertação em Engenharia Química)* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 99 p., 2009.
- SARTORI, R. B.; HIGINO, M. L.; BASTOS, L. H.; MENDES, M. F. Supercritical extraction of pesticides from banana: Experimental and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 128, 149–158, 2017.
- SCOTT, A. *Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products*. PERGAMON PRESS, 1964.
- SHAN, B.; XIE, J.; ZHU, J.; PENG, Y. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 579-587, 2012.
- SHEN, Y.; SUN, Z.; SHI, P.; WANG, G.; WU, Y.; LI, S.; ZHENG, Y.; HUANG, L.; LIN, L.; LIN, X.; YAO, H. Anticancer effect of petroleum ether extract from *Bidens pilosa* L and its constituent's analysis by GC-MS. *Journal of Ethnopharmacology*, 217, 126-133, 2018.
- SIANI, A. C.; NAKAMURA, M. J.; NEVES, G. P.; MONTEIRO, S. S.; FREIMAN, M. S. Leaf Essential Oil from Three Exotic Myrtaceae Species Growing in the Botanical Garden of Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal of Plant Sciences*, 7, 834-840, 2016.
- SILVA, D. B. Atividade antialérgica e estudos químicos das espécies *Bidens gardneri* Bak. e *Bidens sulphurea* (cav.) Sch. Bip. (Asteraceae). *Tese (Tese em Ciências Farmacêuticas)* Universidade de São Paulo, 53 p., 2009.
- SILVA, D. C. Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* less). *Dissertação (Dissertação em Engenharia de Alimentos)* Universidade Federal de Santa Catarina, 130 p., 2004.
- SILVA, E. A. S. Estudos dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécies *Protium* spp. *Dissertação (Dissertação em Química Analítica)* Instituto de Química de São Carlos, 2006.
- SILVA, F. L.; FISCHER, D. C.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. *Molecules*, 16, 1070-1102, 2011.

- SILVA, J.; DUCCINI, C.; SOUZA, E.; NEVES, V.; PASIN, L. Efeito alelopático in vitro de *Malva sylvestris* e *Artemisia camphorata* na germinação e desenvolvimento de sementes de petúnia (*Petunia integrifolia*). *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 2007.
- SILVA, M. D.; DREVECK, S.; ZENI, A. L. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população rural no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí – Indaial. *Revista Saúde e Ambiente*, 10, 54-64, 2009.
- SILVA, M. P.; BARBOSA, F. S.; BARROS, R. F. Estudo taxonômico e etnobotânico sobre a família Asteraceae (Dumortier) em uma comunidade rural no Nordeste do Brasil (Vol. Volume Especial Populações Tradicionais). *Gaia Scientia*, 2014.
- SILVA, R. P.; ROCHA-SANTOS, T. A.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51, 2016.
- SILVA, R. S. Incorporação de modelos termodinâmicos na modelagem matemática de processos de extração supercrítica. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia e Tecnologia de Materiais) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 86 p., 2013.
- SILVERSTEIN, R.; BASSLER, G.; MORRIL, T. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos* (5ª ed.). Guanabara Koogan S.A, 1994.
- SIMÕES, C.; SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J.; MENTZ, L.; PETROVICK, R. P. *Farmacognosia, da planta ao medicamento* (6ª ed.). Editora da UFSC, 1104 p., 2010.
- SONG, S.; HAM, Y.; KO, Y.; KO, E.; OH, D.; KIM, C.; KIM, D.; KIM, K. N.; YOON, W. Anti-inflammatory activities of the products of supercritical fluid extraction from *Litsea japonica* fruit in RAW 264.7 cells. *Journal of Functional Foods*, 22, 44-51, 2016.
- SOUZA, A. L. Extração e caracterização da biomassa e do óleo da microalga *Desmodesmus* sp. usando dióxido de carbono supercrítico. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia Química) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 66 p., 2015.
- SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>. I. Modeling of extraction curves. *Chemical Engineering Science*, 49 (3), 409-414, 1994.
- SPIRO, M.; SELWOOD, R. The kinetics and mechanism of caffeine infusion from coffee: the effect of particle size. *Journal of the Science of food and agriculture*, 35, 915-924, 1984.
- TALMACIU, A.; RAVBER, M.; VOLF, I.; KNEZ, Z.; POPA, V. Isolation of bioactive compounds from spruce bark waste using suband supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 117, 243-251, 2016.
- TEWTRAKUL, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; PURIPATTANAVONG, J.; PANPHADUNG, T. HIV-1 protease inhibitory substances from the rhizomes of *Boesenbergia pandurata* Holtt. *Songklanakarín Journal of Science and Technology*, 25 (4), 503-508, 2003.
- THIEN, T. V. N.; HUYNH, V. H. T.; VO, L. K. L.; TRAN, N. T.; LUONG, T. M.; LE, T. H.; DUC, T. P.; THAT, Q. T. Two new compounds and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from the leaves of *Bidens pilosa* L. *Phytochemistry Letters*, 20, 119-122, 2017.
- TOBINAGA, S.; SHARMA, M. K.; AALBERSBERG, W. G.; WATANABE, K.; IGUCHI, K.; NARUI, K.; SASATSU, H.; WAKI, S. Isolation and identification of a potent antimalarial and antibacterial polyacetylene from *Bidens pilosa*. *Planta Medica*, 75, 624-628, 2009.

- TOMCZYKOWA, M.; TOMCZYK, M.; LESZCZYŃSKA, K.; KALEMBA, D. Flavonoids and Essential Oil of *Bidens cernua* of Polish Origin and in vitro antimicrobial activity of the oil. *Records of Natural Products*, 11 (5), 468-473, 2017.
- TOSS, D. Extração de compostos fenólicos de *Butia capitata* utilizando dióxido de carbono supercrítico. *Dissertação* (Dissertação em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90 p., 2010.
- UBILLAS, R. P.; MENDEZ, C.; JOLAD, S.; LUO, J.; KING, S.; CARLSON, T.; FORT, D. M. Antihyperglycemic acetylenic glucosides from *Bidens pilosa*. *Planta Médica*, 66 (1), 82-83, 2000.
- UJIKI, M. B.; DING, X. Z.; SALABAT, M. R.; BENTREM, D. J.; GOLKAR, L.; MILAM, B.; TALAMONTI, M. S.; BELL, R. H.; IWAMURA, T.; ADRIAN, T. E. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Molecular Cancer*, 5 (76), 1-8, 2006.
- VANONI, A. P. Avaliação da atividade fitoestrogênica do extrato hidroalcoólico e da infusão das folhas de *Morus nigra* L. *Dissertação* (Dissertação em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 71 p., 2016.
- VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Iheringia*, *Série Botânica*, 61, 83-103, 2006.
- VICENTE, G.; MARTÍN, D.; GARCÍA-RISCO, M.; FORNARI, T.; REGLERO, G. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves for use in edible vegetable oils. *Journal of Oleo Science*, 61 (12), 689-697, 2012.
- VLADIĆ, J.; ZEKOVIĆ, Z.; JOKIĆ, S.; SVILOVIĆ, S.; KOVAČEVIĆ, S.; VIDOVIĆ, S. Winter savory: Supercritical carbon dioxide extraction and mathematical modeling of extraction process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 117, 89-97, 2016.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. *Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer, 313 p., 1984.
- WANG, H.; JIANG, H.; LI, F.; CHEN, H.; LIU, W.; REN, S.; MEI, W. L.; DAI, H. Flavonoids from artificially induced dragon's blood of *Dracaena cambodiana*. *Fitoterapia*, 121, 1-5, 2017.
- WANG, R.; WU, Q. X.; SHI, Y. P. Polyacetylene and flavonoids from the Aerial parts of *Bidens pilosa*. *Planta Medica*, 76, 893-896, 2010.
- XUAN, T. D.; KHANH, T. D. Chemistry and pharmacology of *Bidens pilosa*: an overview. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46, 91-132, 2016.
- YADAV, A. K.; TANGPU, V. Therapeutic Efficacy of *Bidens pilosa* L. var. radiata and *Galinsoga parviflora* Cav. in Experimentally Induced Diarrhoea in Mice. *Phytopharmacology e Therapeutic Values V*, 23, 35-45, 2009.
- YANG, W. C.; CHIEN, S.; YOUNG, P.; HSU, Y.; CHEN, C.; TIEN, Y.; SHIU, S. Y.; LI, T. H.; YANG, C. W.; MARIMUTHU, P.; TSAI, L. Anti-diabetic properties of three common *Bidens pilosa* variants in Taiwan. *Phytochemistry*, 70 (10), 1246-1254, 2009.
- YOON, M.; CHOI, G.; CHOI, Y.; JANG, K.; CHA, B.; KIM, J. Antifungal activity of polyacetylenes isolated from *Cirsium japonicum* roots against various phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 34 (1), 882-887, 2011.

ZACHI, R. Influência da temperatura no processo de extração de óleo de soja em leito fixo. *Dissertação* (Dissertação em Modelagem Matemática) Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 118 p., 2007.

ZAINE, L.; MONTI, M.; VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A. S. Immunomodulatory nutraceuticals with potential clinical use for dogs and cats. *Semina: Ciências Agrárias*, 35 (4), 2513-2530, 2014.

ZEKOVIC, Z.; FILIP, S.; VIDOVIC, S.; JOKIC, S. S. Mathematical modeling of *Ocimum basilicum* L. supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Chemical Engineering & Technology*, 37 (12), 1-7, 2014.

ZEKOVIĆ, Z.; LEPOJEVIĆ, Ž.; MILOŠEVIĆ, S.; TOLIĆ, A. Modeling of the thyme–liquid carbon dioxide extraction system. *Acta Periodica Technologica*, 34, 125-133, 2003.

ZHANG, C.; LI, K.; YANG, Z.; WANG, Y.; SI, H. The effect of the aqueous extract of *Bidens pilosa* L. on androgen deficiency dry eye in rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39, 266-277, 2016.

ZOUGAGH, M.; VALCARCEL, M.; RIOS, A. Supercritical fluid extraction a critical review of its analytical usefulness. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (5), 399-405, 2004.

ZUKNIK, M. H.; NORULAINI, N.; DALILA, W. N.; ALI, N. R.; OMAR, M. Solubility of virgin coconut oil in supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 168, 240-244, 2016.