

## **OBTENÇÃO E SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Schinus terebinthifolius* raddi EM MEIO SUPERCRÍTICO.**

M.A. LIVIA<sup>1</sup>, A.W.ZIBETTI<sup>1</sup>, A. MARANGONI<sup>1</sup> e A.BOLZAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

E-mail para contato: [mayarau0@gmail.com](mailto:mayarau0@gmail.com)

**RESUMO** – Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), distribuída amplamente no território brasileiro, possui várias ações terapêuticas, tais como: cicatrizante, antisséptica, antifúngica e anti-inflamatória. Estudos recentes mostraram que seu óleo essencial possui também potencial citotóxico em linhagens de células cancerosas. Visando a aplicação de compostos bioativos desta planta na área biomédica, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo para a obtenção e separação destes compostos utilizando fluido supercrítico. Para isto, diferentes condições operacionais de extração foram avaliadas. Os resultados obtidos apresentaram a existência de duas frações com diferente composição química sendo a condição de 80 bar de pressão e 35 °C a que mostrou uma melhor separação dos compostos. A primeira fração apresentou os seguintes compostos majoritários: alfa-felandreno, delta-3-carene e limoneno. Já a segunda apresentou: beta-Elementen-7 alfa-ol, Elemol e beta-elemene.

### **1. INTRODUÇÃO**

Na indústria farmacêutica também a descoberta de novos fármacos, cada vez mais potentes e menos tóxicos é constante. Neste sentido, o reino vegetal detém as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzida, sendo a fonte mais antiga de medicamentos para o homem (SAMUELSSON, 1999).

Os métodos de extração para a obtenção e separação de compostos bioativos a partir de material vegetal são diversos. Entre os métodos tradicionais podem ser citados a hidrodestilação e extração com arraste a vapor. As técnicas tradicionais apresentam desvantagens, como o emprego de alta temperatura, o que pode incorrer na degradação de compostos termo-lábeis e formação de outros compostos indesejados. Outro método comumente utilizado é a extração com solvente orgânico, porém esse processo demanda uma etapa posterior de separação, o que pode elevar os custos de produção, além da possibilidade de contaminação ambiental e da provável presença de resíduos desses solventes no produto final, restringindo a sua aplicação (MUKHOPADHYAY, 2000).

Nesse contexto, tem-se a *Schinus terebinthifolius* raddi, comumente conhecida como pimenta rosa, pertencente à família Anacardiaceae e amplamente distribuída ao longo da costa do território brasileiro (LORENZI, 1998; LENZI, 2004). Esta planta apresenta-se como uma fonte prospera,

especialmente quando se considera seu uso popular abundante. Diversas partes desta são utilizadas pelas diferentes ações terapêuticas que possuem, como a cicatrizante, antisséptica, antifúngica e anti-inflamatória, (VELAZQUEZ, et al., 2003; SCHMOURLO, et al., 2005; DE LIMA, et al., 2006). Além destas, recentemente o óleo essencial dos frutos extraído por hidrodestilação apresentou ação anti-tumoral em linhagens de células cancerosas de seio (BENDAOU et al., 2010).

Na composição química dos frutos hidrodestilados de *S. terebinthifolius* destacam-se os seguintes compostos majoritários:  $\alpha$ -pineno;  $\alpha$ -felandreno; delta-3-careno;  $\beta$ -felandreno e germacrene-D. Porém, estudos realizados por Barbosa, et al. (2007) confirmam que existe uma elevada variabilidade na composição química dos óleos essenciais dos frutos desta planta, sendo relevante para uma investigação padronizar o local e tempo de colheita.

No processo de extração com dióxido de carbono em estado supercrítico isso já é, em parte, possível, pois ao modificar a densidade do solvente manipula-se a seletividade do fluido supercrítico e, com isso, a solubilidade dos compostos (BRUNNER, 1994; REVERCHON, et al., 2006). Para isto, atualmente utilizam-se separadores acoplados ao extrator e o processo de fracionamento se realiza de maneira contínua durante o processo de extração (GAÑÁN; BRIGNOLE, 2013), no entanto, o controle do processo de separação (fracionamento) é uma tarefa complexa que envolve o equilíbrio de fases (ZIBETTI et al., 2013).

Assim, este trabalho mostra que com a utilização da tecnologia supercrítica logrou-se obter duas frações com diferente composição química do extrato de *S. terebinthifolius* sem precisar de separadores acoplados ao extrator. Para isto, diferentes condições operacionais de extração foram avaliadas e a separação do extrato foi realizada de maneira simultânea.

## **2. MATERIAIS E METODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle de Processos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCP/ENQ/UFSC).

As sementes de *S. terebinthifolius* R., utilizadas neste trabalho foram adquiridas da empresa Brasfoods Exportação e Importação Ltda. Todos os testes foram realizados com sementes provenientes do mesmo lote. Imediatamente após sua aquisição o material vegetal foi triturado e a casca foi retirada mediante esforço mecânico em um peneirador (Mesh Tyler 8 [2,362 mm])

Logo após este processo foi novamente particulado e peneirado (Mesh Tyler 14 [1,168], separado, embalado hermeticamente a vácuo em saco de 500 g, e mantido sob refrigeração (Brastemp, Modelo Frostfree, Brasil) sob temperaturas abaixo de (4°C).

### **2.1 Extração com dióxido de carbono em estado supercrítico**

O processo de extração com dióxido de carbono em estado supercrítico foi conduzido no equipamento HPLC-SC da Jasco Inc (Figura 1), com opção de extração e cromatografia supercrítica.

Utilizou-se como solvente o dióxido de carbono com 99,95% de pureza. O tempo total de extração foi 90 minutos, com em regime contínuo. A vazão do CO<sub>2</sub> supercrítico foi mantida em 3,0 mL/min para todas as condições experimentais testadas.

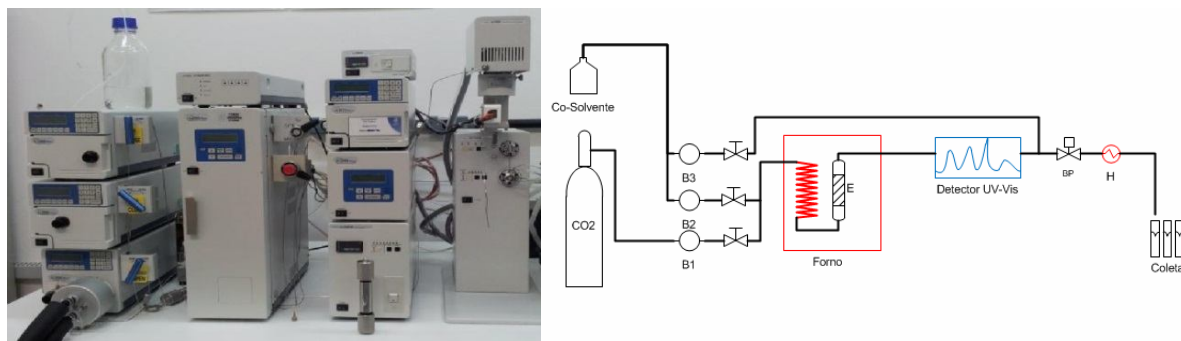


Figura 1 – Unidade de extração do laboratório de Controle de Processos: HPLC SC. B- bomba HPLC, E- extrator, BP- Válvula Backpressure, H –Aquecimento

Como se observa na Figura 1, o HPLC-SC é composto por três bombas: bomba de CO<sub>2</sub> (B1), bomba de cossolvente (B2) e bomba de eluente (B3); forno de aquecimento, trocador de calor, transdutores de pressão, detector UV-vis em linha, válvula back-pressure automatizada (BP), sistema de aquecimento (H) controlado para amenizar o efeito de resfriamento provocado pela expansão do CO<sub>2</sub> (Efeito Joule-Thompson). Utilizou-se o vaso de extração (E) com volume interno de 0,010 L (1,0 x 10<sup>-6</sup> m<sup>3</sup>), com filtro de 10 µm na saída do extrator, para evitar a contaminação com particulados sólidos na linha. O equipamento possui uma interface de comunicação LC-net II (Jasco Inc.) com o computador onde por meio do software ChromNAV podem ser controladas as variáveis operacionais (temperatura, vazão de solvente, cossolvente e eluente além da pressão mediante a back-pressure automatizada).

Os experimentos foram realizados utilizando aproximadamente 8,0 gramas de semente. Para determinação do rendimento global de extração utilizou-se um planejamento fatorial completo com cinco níveis (planejamento em estrela) conforme Tabela 1. Foram conduzidos 9 experimentos para estimar os coeficientes do modelo empírico e mais 1 experimento para determinar o erro experimental. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1: Matriz do planejamento em estrela.

Fatores	$-\alpha$	$-1$	$0$	$1$	$+\alpha$
Temperatura	31	35	45	55	60
Pressão	80	100	150	200	220

Os frascos com os extratos obtidos foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer a -18 °C. O rendimento global ( $X_o$ ) foi calculado pela razão entre a massa de extrato ( $m_{extrato}$ ) obtida e a massa de *S. terebinthifolius* ( $m_{semente}$ ) utilizada para formar o leito, conforme a equação (1):

$$X_o = \text{extrato(g)}/\text{semente(g)} \dots\dots\dots (1)$$

## **2.2 Caracterização química dos extratos obtidos de *S. terebinthifolius*.**

Para a caracterização química dos extratos foram conduzidas análises Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas (GC-MS) nos laboratórios do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB – FURB – Blumenau-SC). Posteriormente no laboratório de Controle de processos realizou-se análise de cromatografia gasosa em detector de ionização de chama (GC-FID).

As análises cromatográficas com espectro de massa foram realizadas com um GC-MS (Shimadzu GCMS-GC2010-QP2010 plus + AOC 5000) equipado com uma coluna RTX 5 (30m de comprimento x 0,25mm de diâmetro x 0,25µm de espessura do filme) O gás de arraste utilizado foi hélio (He) a fluxo constante de 1ml/min. A temperatura do injetor manteve-se em 250°C e a temperatura do forno foi mantida a 60°C por um minuto e, em seguida, aumentada até 240°C a uma taxa de 3°C/min. No espectrômetro de massas (MS) foram utilizadas as seguintes temperaturas: temperatura de iontrap (250°C), temperatura de interface (280°C). O software de gerenciamento utilizado foi o GCMS Solutions da Shimadzu e as bibliotecas de compostos utilizadas para identificação foram a NIST08s e a Willey.

Análises de cromatografia gasosa em detector de ionização de chama (GC-FID) também foram realizadas. No cromatógrafo a gás, a coluna e os patamares de temperatura utilizados foram os mesmos usados na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O detector de ionização de chama foi mantido a 280°C e o gás de arraste, He, a fluxo constante de 1,2ml/min. Foi utilizado o mesmo software de gerenciamento.

## **2.3 Separação da composição química extratos utilizando fluido supercrítico**

Para separação química dos extratos supercríticos de *S.terebinthifolius* foi determinada a metodologia durante a construção das curvas de extração com ajuda da leitura do gráfico UV do HPLC-SC. Este detector possui a característica de fazer a varredura pontual durante o processo enquanto está sendo extraído o material vegetal. A leitura foi realizada em 254 nm. Esta observação determinou a coleta de duas frações durante o processo de extração supercrítica.

Segundo mostra a Figura 2, houve uma mudança na coloração dos extratos ao longo do tempo da extração. Assim, a fração 1 apresentou uma coloração amarelo clara e corresponde aos primeiros minutos do processo. Já a fração 2 apresenta uma coloração amarelo escura correspondente aos minutos restantes.

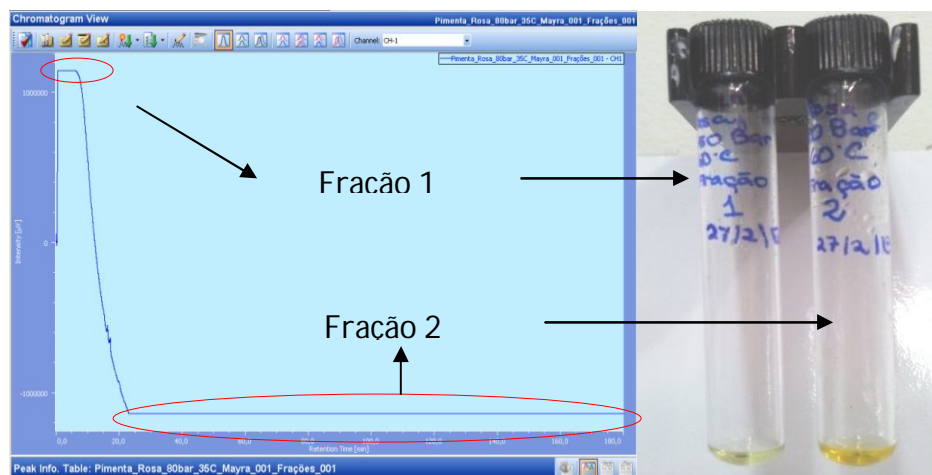


Figura 2 – Leitura do gráfico UV durante a extração supercrítica de *S. terebinthifolius* apresentando duas regiões (fração 1 e fração 2) com seus extratos correspondentes.

Desta maneira se padronizou o momento da coleta durante o processo obtendo-se duas frações para cada condição experimental como descrito na Tabela 2.

Tabela 2– Tempo de coleta da fração 1 e a fração 2

Fração	Tempo de coleta
1	Do início até o minuto 4.
2	Do minuto 5 até o minuto 180.

Para análise da composição química foram selecionadas 4 amostras segundo a Tabela 3, tendo em consideração a maior e menor pressão operacional do planejamento experimental (80 bar e 35°C e 220bar e 45°C). As identificações dos extratos analisados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3– Identificação dos extratos analisados por GC-MS e GC-FID

Condição operacional	Fração
80 bar e 35°C	1
80 bar e 35°C	2
45°C e 220 bar	1
45°C e 220 bar	2

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Rendimento Global da Extração Supercrítica ( $X_0$ )

Os resultados de rendimento global de extração ( $X_0$ ) de *S. terebinthifolius* com CO<sub>2</sub> supercrítico puro são apresentados na Tabela 4, com os valores de temperatura (T), pressão (P) e densidade de

solvente ( $pCO_2$ ) correspondente. O rendimento global da extração é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas de temperatura e pressão para um tempo de processo pré-determinado (MARTÍNEZ et al . 2005).

Os resultados que se mostram no planejamento experimental mostraram que os melhores rendimentos foram obtidos na medida em que as densidades foram mais elevadas. Assim, se obteve o melhor rendimento na condição de 150 bar e 31 °C com 10,38%. Já na condição de 80 bar e 45 °C se obteve o menor rendimento. De acordo com McHugh e Krukonis (1994), o poder solvente de um fluido sub ou supercrítico está relacionado com sua densidade e, desta forma, espera-se que maiores variações de densidade entre duas condições experimentais proporcionem maiores variações no rendimento final de extrato.

Tabela 4 – Rendimento obtido a partir do planejamento em estrela.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	$pCO_2$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$X_0$	Desvio padrão ( $\pm$ )
1	35	100	712,8	5,50	0,07
2	35	200	865,7	9,03	0,04
3	55	100	325,07	1,98	0,04
4	55	200	754,6	9,99	0,06
5	31	150	840,8	10,38	0,05
6	60	150	604,09	7,83	0,06
7	45	80	241,05	1,54	0,04
8	45	220	832,36	8,17	0,06
9	45	150	741,97	8,59	0,04
10	45	150	741,97	9,24	0,07

### 3.2 Composição química dos extratos separados.

Foram identificados 16 compostos como se mostra a seguir na Tabela 5:

Tabela 5 – Composição química (% areaGC-MS) dos extratos fracionados de *S. terebinthifolius*.

N°	RT	Composto	80 bar 35 °C Fração 1	80bar 35 °C Fração 2	220 bar 45 °C Fração 1	220bar 45 °C Fração 2
1	7,767	alfa-pineno	4,86	-	3,52	0,50
2	9,376	sabineno	1,28	-	1,05	-
3	10,168	myrceno	3,88	-	3,26	0,55



4	10,820	alfa-felandreno	23,3	0,19	20,47	2,58
5	11,084	delta-3-careno	19,37	0,18	16,99	2,28
6	11,651	para-cimeno	1,81	0,12	1,67	0,37
7	11,935	limoneno	21,37	0,25	19,66	2,93
8	14,634	terpinoleno	1,33	-	1,3	0,33
9	20,028	Alfa-felandreno-epoxido	0,32	0,87	0,38	0,87
10	26,276	eneldo-pimenta	0,36	4,49-	0,75	1,79
11	27,048	delta-elemenno	0,62	1,93	0,75	1,77
12	28,677	cariofileno	1,06	4,81	1,05	3,39
13	29,825	germacrene-D	3,21	4,45	3,77	6,54
14	32,417	beta-elemen-7-alfa-ol	5,91	14,37	7,44	11,68
15	35,154	elemol	4,68	42,35	8,11	15,06
16	40,004	beta-elemenno	6,01	23,65	8,22	17,37

Devido as diferenças quantitativas (% área no cromatograma), na composição química das frações 1 e 2 nas duas condições de extração analisadas, (80 bar e 35°C; 220 bar e 45°C) pode-se observar que houve um fracionamento com CO<sub>2</sub> supercrítico dos extratos de *S. terebinthifolius* R. nas condições experimentais testadas. Os resultados mostram que, na condição de 80 bar e 35°C houve uma melhor separação dos compostos. Isto pode ser observado de maneira qualitativa nos cromatogramas (figura 3 e Figura 4) A fração 1 apresentou uma porcentagem de área no cromatograma alta de monoterpenos (1-8) e baixa em sesquiterpenos (12-16). Já, o cromatograma da fração 2 na mesma condição, observou-se que não houve presença dos primeiros compostos, resultando em uma fração com 7 compostos identificados. Estes resultados sugerem que os compostos com menor peso molecular foram os primeiros a sair deixando por último os mais pesados.

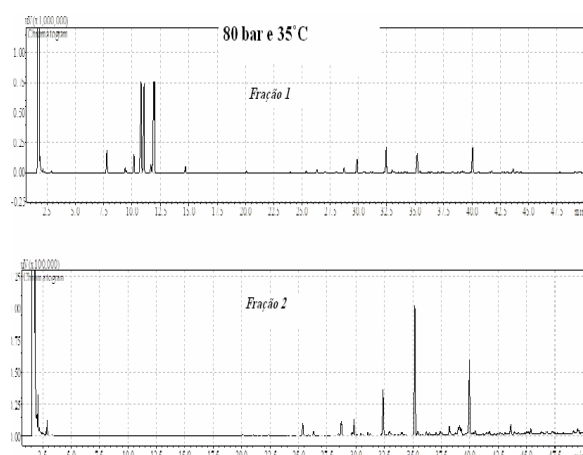


Figura 3 - Cromatograma 220 bar e 45°C

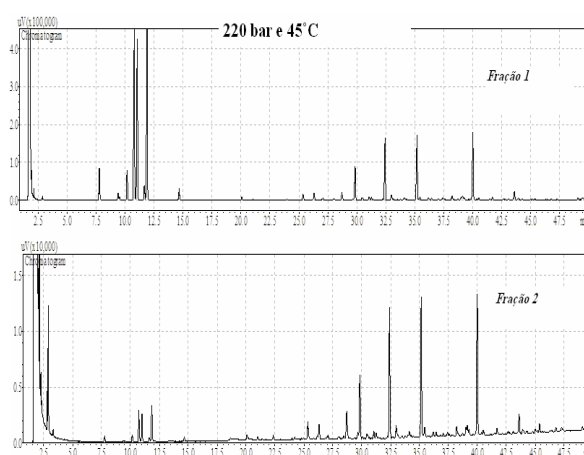


Figura 4 – Cromatograma 220 bar e 45°C

Este resultado está de acordo com os estudos realizados por Gupta, et al., (2007), demonstraram que a solubilidade de monoterpenos hidrocarbonados como o limoneno em CO<sub>2</sub> supercrítico é maior

quando se trabalha em condições operacionais menores que 96 bar e 50°C.

Na condição de 220 bar e 45°C, observa-se que para fração 1, os primeiros oito compostos identificados se apresentaram em menor proporção em comparação com a fração 2 para condição operacional de. Analisando a fração 2 (220 bar e 45°C), observa-se que os compostos identificados se encontraram em uma maior proporção do que não fração 2 na condição de 80 bar e 35 °C. Este fato pode ser explicado pela perda de seletividade do CO<sub>2</sub> supercrítico por se encontrar a uma pressão elevada (BRUNNER, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000).

## 4. CONCLUSÕES

Ao utilizar o processo de extração e separação com dióxido de carbono em estado supercrítico, determinou-se que para a obtenção de frações com composição química diferente, a densidade do solvente deve ser mantida em valores baixos com pressões e temperaturas moderadas, a fim de garantir um bom fracionamento dos extratos. Assim, a condição de 80 bar com 35°C, foi a que apresentou frações mais definidas em sua composição química;

Foram identificados como compostos majoritários na matriz vegetal. Na fração 1: alfa felandrene, delta-3 carene e limonene. Na fração 2: beta-Elemen-7 alfa-ol e elemol;

## 5. REFERÊNCIAS

BRUNNER, G., Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. Steinkopff, 1994. (Topics in physical chemistry). ISBN 9783798509443.

GAÑÁN, N.; BRIGNOLE, E. A. Supercritical carbon dioxide fractionation of T. minuta and S. officinalis essential oils: Experiments and process analysis. The Journal of Supercritical Fluids, v. 78, p. 12–20, jun. 2013.

GUPTA R.B. and Shim J.J. Solubility in supercritical carbon dioxide. New york : Taylor and Francis Group, 2007. - 1 st..

LORENZI H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas. São Paulo : Inst. Plantarum de estudos da flora Ltda, 1998. – 8586714070

MUKHOPADHYAY M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. - Washington : CRC Press, 2000.

OCA E. [et al.] Supercritical fluid extraction of different processed of rosemary plant. J. Agric. Food Chem.. - 1999. - Vol. 47. - p. 1400

SAMUELSSON Gunnar Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy - Stockholm : [s.n.], 1999.

REVERCHON E., DE MARCO Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. Journal of Supercritical Fluids. - 2006. - 38. - pp. 146-166.