



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**PRISCILA DO NASCIMENTO BEZERRA**

**TEOR DE PILOCARPINA EM EXTRATOS DAS FOLHAS DE JABORANDI**  
**(*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) OBTIDOS VIA EXTRAÇÃO**  
**SUPERCRÍTICA**

**BELÉM - PARÁ**

**2019**

**PRISCILA DO NASCIMENTO BEZERRA**

**TEOR DE PILOCARPINA EM EXTRATOS DAS FOLHAS DE JABORANDI  
(*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) OBTIDOS VIA EXTRAÇÃO  
SUPERCRÍTICA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará - UFPA.

**Orientador:** Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior.

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gracialda Costa Ferreira.

**BELÉM - PA**

**2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

B574t Bezerra, Priscila do Nascimento  
Teor de pilocarpina em extratos das folhas de jaborandi  
(*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) obtidos via  
extração supercrítica / Priscila do Nascimento Bezerra. — 2019.  
74 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior  
Coorientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Gracialda Costa Ferreira  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia,  
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Extração supercrítica. 2. Pilocarpina. 3. Atividade  
antioxidante. I. Título.

CDD 664.022

---

**PRISCILA DO NASCIMENTO BEZERRA**

**TEOR DE PILOCARPINA EM EXTRATOS DAS FOLHAS DE JABORANDI  
(*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) OBTIDOS VIA EXTRAÇÃO  
SUPERCRÍTICA**

Data da Avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nota/ Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gracialda Costa Ferreira**  
(UFRA- Coorientadora)

---

**Prof. Dr. Renan Campos Chisté**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

---

**Dr. Mozaniel Santana de Oliveira**  
(Membro Externo)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geormenny Rocha dos Santos**  
(FEA/ITEC/UFPA – Suplente interno)

---

**Prof. Dr. Nélio Texeira Machado**  
(IEC – Suplente Externo)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela sua infinita misericórdia e compaixão, por ter me dado o dom da vida e concedido tantas graças. Agradeço aos meus pais por terem sempre acreditado em mim, e a minha mãe por ter dado todo o amor e suporte necessário nesta caminhada.

Aos meus irmãos, Márcio, Jéssica e Márcia. Aos meus tios e primos que formam essa família tão complexa que amo. Agradeço a minha avó que foi extremamente presente na minha criação e ajudou a formar o meu caráter, à Joana por cuidar tão bem de nós. Agradeço a Família Gurjão, por também ser minha família.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior, pela confiança em me aceitar como orientada, por ter confiado um trabalho de grande importância sempre permitindo crescimento pessoal e licença criativa durante o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço a minha coorientadora, Prof. Dra. Gracialda Ferreira, pela confiança e pelo auxílio material, assim como pela contribuição intelectual.

Agradeço ao CVACBA, por permitir a utilização de seus equipamentos e dado auxílio no desenvolvimento das análises, ao Prof. Dr. Jesus Nazareno, Helber Samon, Daniel Issac e Bruno Teixeira.

Aos meus amigos de adolescência, Renata, Stefani e Saulo, agradeço pela paciência. Aos amigos que fiz ao longo desta caminhada, Robson Carvalho, Anselmo Melo, Fernanda Wariss, Wanessa Almeida, Marielba Salazar, Mozaniel Santana, Rafael Holanda, Vânia Maria, Marcilene Paiva, Caroline Ferreira, Ana Paula, Eduardo Ortiz, e tantos outros. A toda família Labex, que me acolheu e rapidamente de me fez mais uma integrante, compartilhando conhecimento e acreditando num potencial que eu mesma não sabia possuir.

## RESUMO

O *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth, conhecido como jaborandi, é uma das poucas fontes naturais do alcalóide pilocarpina, que é obtido através de metodologias agressivas ao meio ambiente. Desta forma, existe a necessidade da realização de pesquisas científicas voltadas para obtenção deste composto utilizando tecnologias que não agridam ao meio ambiente, como a extração com fluido supercrítico (SFE). No desenvolvimento desta pesquisa, a SFE foi realizada com CO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> + EtOH, os quais foram realizados com 40 e 60 °C a 200, 290 e 420 bar de pressão. O uso do cossolvente e o aumento da pressão e da temperatura aumentaram o rendimento em massa e o conteúdo dos compostos polares, como a pilocarpina e os compostos fenólicos totais. Os maiores valores de massa de rendimento (4,78±0,38%), conteúdo de pilocarpina (2,37±0,02% de pilocarpina/extrato x 100) e teor de compostos fenólicos (173,67±1,5 mg GAE/g de extrato) foram obtidos na mesma condição (60 °C/420 bar com CO<sub>2</sub> + 10% EtOH). A única diferença foi encontrada na atividade antioxidante, que alcançou seu melhor desempenho a 40 °C/200 bar com CO<sub>2</sub> + 10% EtOH, no entanto, alcançou seus resultados mais promissores nas amostras obtidas com o cossolvente, assim como os melhores resultados em massa de rendimento, teor de pilocarpina e teor de compostos fenólicos totais. A condição de extração com maior teor de pilocarpina foi utilizada para realizar a cinética e a curva obtida foi ajustada no modelo de Sovová (2012), mostrando um bom ajuste.

**Palavras-chave:** Extração supercrítica, Pilocarpina, Atividade antioxidante.

## ABSTRACT

*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth, known as jaborandi, is one of the few natural sources of alkaloid pilocarpine, which is obtained through aggressive methodologies to the environment. Thus, there is a need for scientific research to obtain this compound without pleasing the environment, such as supercritical fluid extraction (SFE). In the development of this research, SFE was performed by CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> + EtOH, which were conducted with 40 and 60 °C at 200, 290, and 420 bar pressure. The use of cosolvent and the increase in the pressure and temperature increased the mass yield and the polar compounds contents, such as pilocarpine and phenolic compounds. The highest values of mass yield (4.78±0.38%), pilocarpine content (2.37±0.02 % wt of pilocarpine/wt of extract x 100), and phenolic compounds content (173.67±1.5 mg GAE/g of extract) were obtained at the same condition (60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10 % EtOH). The only difference was found in the antioxidant activity, which achieved its best performance at 40 °C/ 200 bar with CO<sub>2</sub> + 10 % EtOH, however, it achieved its most promising results in the samples obtained with cosolvent, as well as the best results in mass yield, pilocarpine content, and phenolic compounds content. The extraction condition with the highest pilocarpine content was used to perform the kinetics and the curve obtained was adjusted in the Sovová (2012) model, showing a good fit.

**Keywords:** Supercritical extraction, Pilocarpine, Antioxidant activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Localização das populações de <i>Pilocarpus microphyllus</i> , na área da mina N4SW ao Sudeste e Sudoeste da Floresta Nacional de Carajás, Pará.....	15
<b>Figura 2</b> - Folhas terminais do <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth.....	16
<b>Figura 3</b> - Alcalóides presentes nas folhas de <i>Pilocarpus microphyllus</i> : 13-nor-8(11)-diidropilocarpina; Pilosinina; Pilocarpina; Pilocarpidina; Ácido Pilocárpico; Anidropilosina; Pilosina; Ácido Piloturínico e os quatro inferiores denominados “alcaloides” são alcalóides inéditos.....	18
<b>Figura 4</b> - Molécula do alcalóide Pilocarpina.....	19
<b>Figura 5</b> - Diagrama de fases P-T de uma substância pura .....	23
<b>Figura 6</b> - Curva de extração de cravo-da-Índia.....	26



## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Valores nominais de Temperatura Crítica (TC), Pressão Crítica (PC) e Densidade Crítica (DC) de algumas substâncias.....	23
---	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>9</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>12</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Geral .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Específicos .....</b>	<b>13</b>
<b>4 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>4.1 Ocorrência de <i>P. microphyllus</i> na Floresta Nacional de Carajás .....</b>	<b>14</b>
4.1.1 O extrativismo do Jaborandi .....	15
<b>4.2 <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth .....</b>	<b>16</b>
4.2.1 Alcalóides oriundos do <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth .....	17
4.2.2 Pilocarpina .....	19
4.2.3 Efeitos farmacológicos da pilocarpina.....	20
4.2.4 Extrações convencionais da pilocarpina .....	21
<b>4.3 Processo de extração supercrítica .....</b>	<b>22</b>
4.3.1 Curvas Globais de Extração.....	25
4.3.2 Modelagem Matemática .....	26
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>
<b>6 CAPÍTULO 2 – ARTIGO: Jaborandi (<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth) leaf extracts by supercritical fluid extraction: Extract’s global yield, pilocarpine quantification, antioxidant activity, and kinetic data .....</b>	<b>36</b>
<b>7 ANEXO I – Artigos e capítulos publicados durante o período do mestrado .....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Pertencente à família Rutaceae, conhecido popularmente como jaborandi, o *Pilocarpus* reúne 16 espécies, das quais as mais conhecidas são *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*. As espécies do gênero são representadas pelo porte arbustivo verdejante, bastante ramificado, com altura média de 3 metros, folhas compostas com aproximadamente 40 centímetros, folíolos sesseis, lâmina com ápice obtuso ou emarginado e flores pediceladas. Suas espécies são encontradas em todo o território nacional, principalmente na região Leste da Amazônia e nas regiões do Centro-Sul e Nordeste. *Pilocarpus* apresenta boa taxa de crescimento vegetativo tanto em solos arenosos e rochosos como em argilosos de baixa fertilidade (KAASTRA, 1982; MARQUES & COSTA, 1994; MERCK, 1997).

Informações existentes na literatura recente, que utilizam dados altimétricos, indicam a distribuição geográfica de *P. microphyllus* nos estados do Pará, Maranhão e Piauí, não sendo uma espécie endêmica do Brasil (MARTINELLI & MORAES, 2013). No estado do Pará, levantamentos florísticos realizados na Floresta Nacional de Carajás (FLONA de Carajás) e no município de São Félix do Xingú, abrangendo principalmente a Estação Ecológica Terra do Meio, apontam a ocorrência natural da espécie em áreas de floresta ombrófila aberta com afloramentos rochosos, ou com o solo arenoso, com teores altos de minério, coberta por vegetação de porte reduzido, herbáceo e arbustivo (HOMMA, 2003).

Na Floresta Nacional de Carajás (FLONA de Carajás), cujo direito de exploração de minérios pertence à empresa mineradora Vale S. A., tem-se o registro de alta incidência de jaborandi, em agregados, chamados popularmente de “reboleiras”, que variam de 1,5 a 151 hectares (MERCK, 1997; SILVA et al., 1996).

O interesse comercial e incentivo da indústria farmacêutica sobre as folhas em função da produção de pilocarpina, aliados ao desmatamento resultou em uma redução maior que 50% de suas populações no período de 2003 a 2013 (MARTINELLI & MORAES, 2013) levando a manutenção da espécie na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção do Ministério do Meio Ambiente e no Livro Vermelho da Flora do Brasil, lista da qual já faz parte desde 1992 (IBAMA, 1992), tendo como motivação a perda de área de ocupação por atividades de supressão da vegetação nativa e atividades agropecuárias nas áreas onde a espécie está distribuída geograficamente.

Nas folhas de *Pilocarpus microphyllus* concentra-se o alcaloide pilocarpina, que tem seu teor de forma variada nas espécies conhecidas de *Pilocarpus*, sendo essa variação de aproximadamente 0,4 a 1,2 em sua massa total (SOUZA et al., 2013). Em termos econômicos *Pilocarpus microphyllus* e *Pilocarpus jaborandi* se sobressaem pela maior concentração do alcaloide, especialmente em suas folhas e, mais especificamente nas folhas mais novas, sendo ambas mais facilmente encontradas no Pará, Maranhão, Piauí, Pernambuco e Ceará (JOSEPH, 1967; KAASTRA, 1982).

A disponibilidade da pilocarpina impulsiona o interesse farmoquímico mundial como matéria-prima para a obtenção do alcaloide (SANTOS e MORENO, 2004). É um alcaloide colinérgico, com ações nicotínicas e muscarínicas; utilizada no tratamento de glaucoma, assim como para evitar a formação de aderências entre a íris e o cristalino; no tratamento de xerostomia; é adicionada em loções capilares para fortalecimento dos bulbos capilares e usada na dermatologia como modificador da pele, além de ter efeitos mais amenos no coração e trato gastrointestinal (OLIVEIRA e AKISUE, 1991; GILMAR, 2003; VITAL e ACOO, 2006).

Para a obtenção deste alcaloide nos dias atuais, é usual que as indústrias façam uso de técnicas convencionais de extração, onde utilizam uma escala excessiva de solventes como etanol, clorofórmio e éter em séries sucessivas até a sua purificação, produzindo resíduos altamente contaminantes (MAAT e BEYERRNAN, 1984; MCKILLOP, 1970). Assim, a necessidade e a possibilidade de se utilizar a extrações menos agressivas ao meio ambiente, como a extração com fluidos supercríticos tem sido uma opção.

A extração com fluido supercrítico é um processo que vem ganhando destaque nos últimos anos, que de certa forma consegue agregar os princípios da destilação e extração por solvente, sendo que utiliza fluidos em condições supercríticas. É tido como um processo promissor em matéria-prima vegetal, pois acaba diminuindo a instabilidade de compostos naturais, evitando a degradação térmica e a presença de resíduos de solvente nos extratos (GARCÍA-RISCO et al., 2011).

Apesar de exigir um investimento inicial maior é uma tecnologia verde, pois não gera resíduos tóxicos, já que faz o uso de dióxido de carbono, que além de não ser tóxico tem propriedades físicas críticas baixas, logo chega ao ponto crítico em pressões e temperaturas relativamente baixas e pode ser facilmente reciclado; além de prevenir a degradação térmica que ocorre na extração convencional já que não requer altas temperaturas durante a extração, podendo extrair compostos termossensíveis; é uma tecnologia com alto grau de seletividade de compostos a serem extraídos e essa seletividade pode sofrer modificações de acordo com o

solvente utilizado, e dependendo da necessidade pode-se fazer uso de um cossolvente com polaridade diferente, além de alterações nas variáveis termodinâmicas, desta forma, é o processo mais indicado para a extração e purificação de alcaloides como a pilocarpina (BRUNNER, 1994; MERCER e ARMENTA, 2011; MCHUGH e KRUKONIS, 2013).

## 1 JUSTIFICATIVA

A presente pesquisa é de grande importância tanto para a indústria farmacêutica quanto para a comunidade agroextrativista da Floresta Nacional de Carajás, visto que ambas podem ser favorecidas pela disponibilização uma nova alternativa para a obtenção do composto de interesse (pilocarpina) por uma tecnologia verde, que não utiliza solventes que são tóxicos ao homem e ao meio ambiente, e que vem sendo amplamente utilizados no atual método de obtenção, além de poder proporcionar à comunidade confirmação do teor de pilocarpina na matéria prima.

Em Carajás uma comunidade de extrativista da FLONA que como principal fonte de renda a comercialização de folhas de *P. microphyllus* para a indústria. No entanto, a comercialização tem se dado pela quantidade (peso) de folhas e não pela qualidade (teor de pilocarpina), visto que não há acesso aos métodos tradicionais de determinação deste teor. Assim, a disponibilização de uma alternativa de quantificação na massa de material vegetal do teor de pilocarpina no processo de comercialização pode potencializar a negociação com empresas compradoras agregando valor ao produto natural e trazendo lisura às transações comerciais e, ainda minimizando os impactos sobre a população natural visto que material oriundo de áreas com baixos teores poderiam ser preservadas.

Neste contexto, a finalidade deste trabalho é utilizar a tecnologia supercrítica, pois é econômica, em longo prazo, com menor gasto de tempo e causa menos danos ao meio ambiente quando comparada as técnicas convencionalmente utilizadas. De modo que o potencial de produção de folhas de jaborandi da Floresta Nacional de Carajás seja utilizado de forma sustentável, quanto à geração de efluentes e, possa aumentar e prolongar a renda para a comunidade que trabalha diretamente na coleta deste material vegetal. Portanto, os resultados deste trabalho serão muito importantes ao oferecer uma alternativa metodológica para a obtenção de extratos de *P. microphyllus* com foco na redução de resíduos liberados no meio ambiente e ainda, potencializar o uso dos recursos naturais da Floresta Nacional de Carajás por comunidades populacionais tradicionais agregando valor e qualidade de vida.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Este estudo tem como objetivo geral, determinar os parâmetros de processo da extração de compostos bioativos de folhas de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), oriundas da FLONA de Carajás, via extração com fluido supercrítico, determinar o teor de pilocarpina nos extratos obtidos, avaliar a sua atividade antioxidante e realizar o estudo cinético da extração.

#### **3.2 Específicos**

- Caracterizar a matéria-prima (*P. microphyllus*) quanto à presença de minerais;
- Determinar as melhores condições operacionais da extração supercrítica quanto ao teor de pilocarpina utilizando CO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>+cossolvente (etanol);
- Estimar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos;
- Quantificar o teor de pilocarpina nos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Validar o método de quantificação do teor de pilocarpina no extrato;
- Determinar os parâmetros cinéticos da extração por fluido supercrítico.

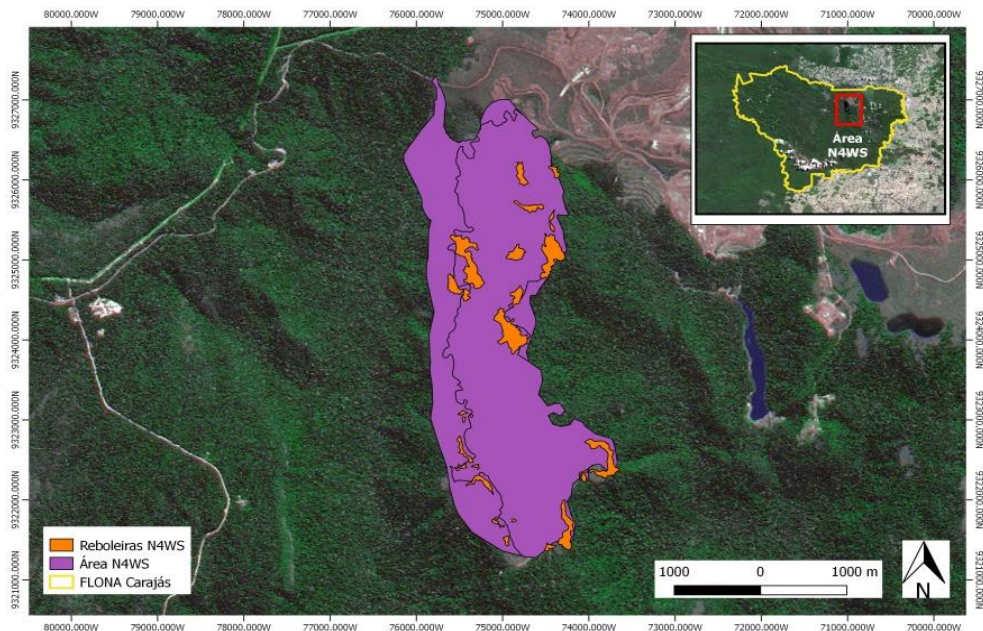
## 4 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Ocorrência de *P. microphyllus* na Floresta Nacional de Carajás

A Amazônia brasileira, é a floresta com maior cobertura vegetal original, é a mais extensa floresta tropical do planeta, que a torna um patrimônio biológico de valor inestimável para a humanidade (SILVA et al., 2005; SOUZA JR. et al., 2013; ALMEIDA et al., 2016). Com o intuito de preservar esta riqueza e promover a proteção reduzindo taxas de desmatamento, foram criadas as Unidades de Conservação (UCs). Na região da Serra de Carajás, foi criada a Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, por meio do Decreto de Lei 2.486 em 1998, com o objetivo de promover a utilização de forma sustentável para a comunidade e a realização de pesquisas científicas que promovem a geração de novas tecnologias em diversas áreas, estudos em matérias primas vegetais ainda não exploradas nos levando a novas descobertas e o avanço dessas pesquisas científicas (PORTO & SILVA, 1989). Na Figura 1 podemos observar as populações de *Pilocarpus microphyllus* na área da mina N4SW ao Sudeste e Sudoeste da Floresta Nacional de Carajás.

Localizada na região sudeste do Estado do Pará, 550 km ao sul de Belém, capital do Estado, entre as coordenadas geográficas de 05°52' e 06°33' de latitude sul e 49°53' e 50°45' de longitude oeste, com uma área total de 391.263,04 hectares a FLONA de Carajás, administrada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), engloba os municípios de Parauapebas, Canaã dos Carajás e Água Azul do Norte (STCP, 2016). Dentro da região da FLONA de Carajás se encontram elevações importantes de serras ferruginosas, sendo elas a Serra Norte, a Serra Sul e parte da Serra Leste, abrigando uma das maiores reservas conhecidas do mundo, de forma que em conjunto com as Serras do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais detém praticamente toda a reserva de ferro do Brasil (VIANA, 2016).





**Figura 1** - Localização das populações de *Pilocarpus microphyllus*, na área da mina N4SW ao Sudeste e Sudoeste da Floresta Nacional de Carajás, Pará.

Fonte: Acervo do projeto.

Na Flona de Carajás, o clima é tropical e úmido, com precipitação média anual de 1600 mm e em estação chuvosa uma precipitação que pode chegar a 1300 mm, já no período não-chuvoso pode apresentar menos de 320 mm (DE MORAES et al., 2005).

#### 5.1.1 O extrativismo do Jaborandi

Nos anos 80 e 90 tem-se o registro de extrativismo descontrolado da planta, onde além da obtenção e coleta dos ramos algumas plantas foram totalmente destruídas, e não houve plantio ou replantio para renovação da população e, assim evitar riscos para a extinção da espécie. Diante deste quadro, em 1992 a espécie passou a fazer parte da Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, publicada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, na categoria vulnerável, devido à sua exploração descontrolada (IBAMA, 1992) e, atualmente é mantida dentre as 2.113 espécies de plantas do território nacional na mesma categoria de risco de extinção (BRASIL, MMA, 2014).

É do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) que se extraem os sais de pilocarpina, um composto de extrema importância no ramo farmacológico, utilizado no tratamento do glaucoma, a maior causa de cegueira do mundo (SKAAT, 2016). Em Carajás, a Cooperativa de Agroextrativista de Carajás (COEX-Carajás) é responsável pelo extrativismo da planta na

FLONA de Carajás, e fornece anualmente de 40 a 50 toneladas de folhas colhidas por aproximadamente 47 trabalhadores (folheiros), que coletam, secam e ensacam o material vegetal entre julho e dezembro, em seguida comercializam para o Grupo Centroflora, no Piauí, principal comprador deste material. O Centroflora realiza a extração da pilocarpina das folhas e comercializa o composto. Para Oliveira (2017) atualmente o manejo de jaborandi é considerado sustentável.

#### 4.2 *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth

O jaborandi, nome popular de espécies de *Pilocarpus*, que foi descrito inicialmente por Martin Vahl in 1797, é pertencente à *Rutaceae*. De acordo com Kaastra (1982) e Skorupa (1996) abrange 16 espécies, das quais 13 podem ser encontradas no território brasileiro, mas apenas 11 são endêmicas ao território, sendo que as principais, em termos de exploração, por terem maiores teores de pilocarpina, são o *Pilocarpus microphyllus* e *Pilocarpus jaborandi* (KAASTRA, 1982; MERCK, 1997; SKORUPA, 2000; VAHL, 1797).

É uma planta de porte arbustivo, bastante ramificado, com altura média de 3 metros, podendo chegar até aproximadamente 7,5 metros. Seus folíolos têm por volta de 2-6 centímetros, possuindo forma lanceolada a oval, organizada em folhas compostas de cerca de 40 centímetros sendo composta pelo folíolo e a raque, suas pequenas flores e frutos são compostos em ráculos (cachos) (HENRIQUES et al., 2004; OLIVEIRA et al., 1991; PINHEIRO, 2002)

Ia-mbor-endi, da língua Tupi guaraní, “o que faz babar” em sua tradução literal, chamado assim por causar a indução de secreções, sendo muito usada por indígenas por vários séculos, onde faziam a mastigação do mesmo. (CORRÊA, 1984).

A importância do *P. microphyllus* (Figura 2), se dá pelos seus princípios ativos, possuindo efeito farmacológico, que justifica a sua aplicação medicinal, sendo largamente utilizada em indústrias farmoquímicas na produção de medicamentos (SANTOS e MORENO, 2004).



**Figura 2** - Folhas terminais do *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth.

Fonte: LIMA et al. (2017)

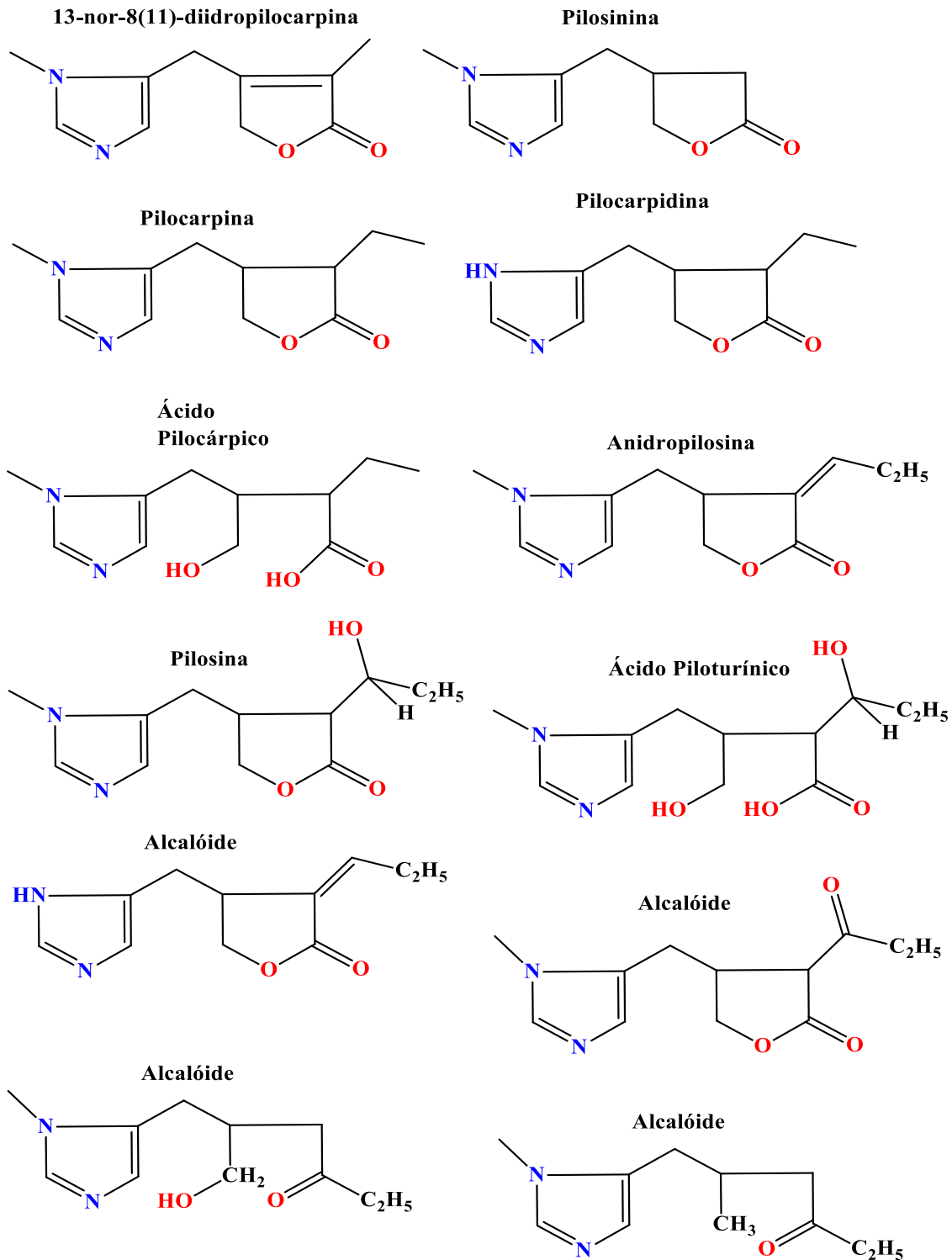
É rica em metabólitos secundários, especialmente alcaloides. Esta espécie foi estudada e analisada por Byasson em 1875, que foi capaz de identificar a presença de alcaloides na planta, em maior concentração em suas folhas. Em Paris (1874), o engenheiro João Coutinho levou o jaborandi ao uso medicinal oficialmente. O maior destaque farmacêutico está no controle do glaucoma, reduzindo a pressão intra-ocular e no tratamento de xerostomia (boca seca), resultante de tratamentos como quimioterapia, devido à presença do alcaloide pilocarpina (MERK, 1997; MOURA, 2003; PETIT E POLONOVSKI, 1987; VITAL e ACCO, 2006).

#### 4.2.1 Alcaloides oriundos do *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth

Alcaloides são compostos orgânicos de caráter básico que contém pelo menos um átomo de nitrogênio de caráter básico no anel heterocíclico, são originárias majoritariamente de plantas, podendo ser encontradas em fungos, bactérias e alguns animais. Para a síntese deste composto é necessária a presença de nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono. Atualmente, os únicos alcaloides em plantas contendo um núcleo simples imidazol conhecidos são os alcaloides do jaborandi (*Pilocarpus*). A pilocarpina e a isopilocarpina são usualmente isolados como óleos viscosos sem cor, no entanto, na forma de sais são sólidos higroscópicos. (COSTA, 1975; HENRIQUES et al., 2004).

A definição desse grupo de metabólitos é um tanto árdua, devido à amplitude de diversidade das estruturas químicas dos mesmos, às suas propriedades físico-químicas e às suas atuações na farmacologia, ou seja, à sua atividade biológica quando em contato com organismos vivos (HENRIQUES et al., 2004; LIMA, 2008), no entanto, não estão incluídos dentro da definição de alcaloide os compostos nitrogenados oriundos de síntese orgânica, nem aminoácidos, aminas simples, vitaminas, peptídeos, ácidos nucleicos, porfirinas, nucleotídeos e compostos nitro e nitroso (ROBBERS et al., 1997).

Foram identificados 11 alcaloides imidazólicos oriundos do *P. microphyllus* (Figura 3), sendo eles: a) 13-nor-8(11)-diidropilocarpina; b) Pilosinina; c) Pilocarpina; d) Pilocarpidina; e) Ácido Pilocárpico; f) anidropilosina; g) Pilosina; h) Ácido Piloturínico; i, j, k e l - alcalóides inéditos (LINK et al., 1972; 1974, VOIGTLANDER et al.; 1978; ABREU et al., 2007; ANDRADE-NETO et al., 1996). Acredita-se que estes alcalóides estejam envolvidos em diferentes rotas biossintéticas na formação de pilocarpina e da pilosina.

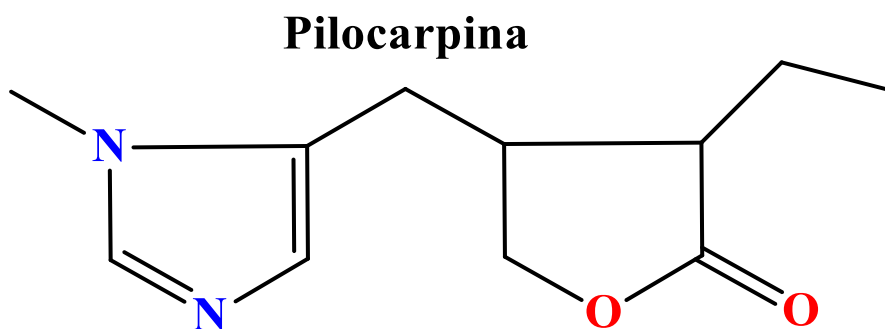


**Figura 3** - Alcaloides presentes nas folhas de *P. microphyllus*: 13-nor-8(11)-dihydropilocarpina; Pilosinina; Pilocarpina; Pilocarpidina; Ácido Pilocárpico; anidropilosina; Pilosina; Ácido Piloturínico e os quatro inferiores denominados “alcaloides” são alcalóides inéditos.

#### 4.2.2 Pilocarpina

O alcaloide pilocarpina é encontrado no *P. microphyllus* em concentrações entre 0,5 a 1% da sua massa total, essa concentração é dependente de diversos fatores, como o clima, o solo, a localização (GUMIER-COSTA, 2016). Teores mais elevados desse composto são encontrados nas folhas mais jovens, pois nessa fase ocorrem as formações de enzimas necessárias para o processo de desenvolvimento e diferenciação dos tecidos e nessa fase tem-se a dependência do alcaloide (SCHEERER, 2001)

Ele possui um núcleo imidazólico e outro pentagonal lactônico sendo um alcaloide derivado, provavelmente do aminoácido histidina (Figura 4) (DEWICK, 2002). Foi isolado em 1875, por Hardy e a primeira síntese realizada em 1933 pelo químico Preobrashenski (MINGOIA, 1967). Pode ser obtido na forma de cristais puros ou como óleos viscosos, sofre cristalização em baixa temperatura, sendo altamente higroscópicos (PINNER, 1900), não é encontrado isolado, pois possui isômeros e estruturas semelhantes, sendo eles a Epiisopiloturina, Isopilocarpina, Pilosina e Isopilosina.



**Figura 4** - Molécula do alcalóide Pilocarpina

Este alcaloide é solúvel em água, álcool e clorofórmio, sendo mais solúvel em benzeno e pouco solúvel em éter ou éter de petróleo (HARDY, 1875; JOWETT, 1900; PETIT, 1987). Sua fórmula química é  $C_{11}H_{16}N_2O_2$ , e sua massa molecular é 208,26 g/gmol. Seu ponto de fusão é 34°C e o de ebulição é 260°C, sendo que acima de 34°C inicia-se uma conversão parcial da Pilocarpina em Isopilocarpina.

A degradação da Pilocarpina ocorre devido à ação do tempo, o aumento de temperatura e mudanças de pH, decrescendo à estabilidade em pH mais elevado, podendo ocorrer também em solução aquosa através de hidrólise e a epimerização da molécula (BUNDGAARD et al. 1986; NEVILLE et al., 1976; FAN et al. 1996). A isomerização pode ocorrer também na própria planta, devido à sua idade (PETIT, 1987).

Devido à sua atividade biológica este alcalóide está presente em forma de sais de Pilocarpina (cloridrato e nitrato) em diversos produtos, que podem ser encontrados com os seguintes nomes: Adsorbocarpine, Akarpine, Almocarpine, I-pilocarpine, Isopto carpine, Minims Pilocarpine, Miocarpine, Ocu-carpine, OcusertPilo, Pilocar, Pilocair, Pilopine HS, Piloptic, Pilostat, P.V. Carpine, P.V. Carpine Liquifilm, Spectro-pilo, Spersacarpine (COSENTINO, 1998)

#### 4.2.3 Efeitos farmacológicos da pilocarpina

O alcalóide pilocarpina tem ação sobre as terminações nervosas das células secretoras, que ocasiona o aumento de excreções, como suor e da saliva. Por ter essa função sobre as células secretoras acaba possuindo ação renal, onde remove metabólitos tóxicos. Além disso, é utilizada na indústria de cosméticos, pois pesquisas mostraram que ela ocasiona o estímulo de crescimento de cabelo, e por isso tem sido incorporada em algumas loções capilares. Na dermatologia, usa-se como modificador da pele (SWAN, 1967; OLIVEIRA e AKISSUE, 1991).

Farmacologicamente esse alcaloide é muito utilizado no tratamento do glaucoma. Principalmente por costumar ser mais bem tolerado que os anticolinesterásicos utilizados com o mesmo intuito, além de constituir o agente colinérgico padrão no tratamento inicial do glaucoma de ângulo aberto (BEASLEY e FRAUNFELDER, 1991). É também usado para impedir a formação de aderências entre a íris e o cristalino, permite realizar medições oftalmológicas e por ter ação miótica ela se faz útil na correção da midriase produzida pela atropina. (LAIBOVITZ et al., 1996; TAYLOR, 1991). A pilocarpina, no entanto, apresenta toxicidade, que pode causar entre outros efeitos: dor de cabeça, náusea, vômito, diarreia, salivação e edema pulmonar, já com doses mais baixas, próximas a 10 mg, pode ocorrer diaforesis intensa em um adulto (KUSHNICK et al., 1996).

Por ser menos irritante que o salicilato de fisistigmina, a pilocarpina pode ser usada em períodos mais longos e com menos efeitos indesejados. Ela está presente em soluções oftálmicas em forma de cloreto ou nitrato, por conta disso está em muitas prescrições médicas, com concentrações que vão de 0,25 a até 10%. (TAYLOR, 1991; CHUNG et al., 1970). Trabalha também estimulando as secreções do trato respiratório, das glândulas gástricas, lacrimais, salivares e outras glândulas, acelera o pulso, aumenta o peristaltismo e promove contração uterina.

A sua aplicação na farmacologia é tão ampla que se faz presente como componente de formulações para o tratamento da asma, calvície, catarro, diabetes, náusea, reumatismo e sífilis (HILL e BARCZA, 1966; AROMDEE et al., 1996). Estudos em cima deste composto são extensivas e continuam em adaptação e aumento de áreas de ação, melhorando estas formulações e melhorando a biodisponibilidade da pilocarpina, inclusive já existe a possibilidade de aumentar a viscosidade da molécula para ser melhor drenada e a sua penetração na córnea (BUCOLO e MANGIAFICO, 1999; MESEGUER et al. 1996; ZUROWSKA et al., 1999).

#### 4.2.4 Extrações convencionais da pilocarpina

Para a obtenção do alcaloide pilocarpina diversas metodologias foram criadas e empregadas, mantendo entre si a semelhança de utilizarem solventes tóxicos ao meio ambiente. Algumas destas metodologias de obtenção serão mencionadas a seguir.

Pereira et al. (2018) obteve extrato contendo pilocarpina de folhas de *P. microphyllus* através de moagem, seguida de maceração sob agitação com 100 mL de clorofórmio por 30 min, com pH 10 em 30% (v/v) de solução de hidróxido de amônio. Em seguida, o filtrado foi separado em funil de separação contendo 10 ml de clorofórmio e 50 ml de ácido sulfúrico aquoso a 5%. A fase orgânica foi então separada e destilada sob pressão reduzida em um evaporador rotativo, obtendo o extrato.

Para a obtenção de extrato aquoso e extrato etanólico Castro et al. (2016) primeiramente processou as folhas em moinho de facas. Na obtenção do extrato aquoso foi realizada infusão em água destilada por 20 minutos a 95 °C, para obter o extrato etanólico foi realizada maceração em etanol (grau analítico) por sete dias, com troca de solvente. Este material foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo e diluído em etanol a 50% e dimetilsulfóxido a 3%.

A obtenção de alcaloides presentes nas folhas de *P. microphyllus* em escala industrial foi descrita por Vêras et al. (2013). Sendo um processo baseado na alcalinização das folhas em solução de carbonato de potássio, seguida da extração de todos os alcaloides (extração sólido-líquido) com solventes de tolueno e cloreto de metileno. A fase orgânica passa por extração líquido-líquido com solução aquosa de ácido sulfúrico. Em seguida a solução com os alcaloides em forma de sal é resfriada, alcalinizada e tratada. Após o tratamento com carbono e areia de diatomáceas, os alcaloides impuros são dissolvidos em solução aquosa de ácido clorídrico e filtrado. O filtrado é alcalinizado com solução de hidróxido de amônio para precipitar a forma neutra dos alcaloides, ao final é filtrado novamente.

Outra forma industrial de obtenção da pilocarpina foi descrita por Wiess et al. (2011) muito semelhante a descrita por Vêras et al. (2013), na qual ocorre de forma que inicialmente as folhas do jaborandi são moídas e colocadas em solução de carbonato de potássio para serem alcalinizadas e em seguida são extraídas com uma mistura de tolueno/diclorometano (TDM). Este processo ocasiona a formação micelas, que sofrem uma extração líquido-líquido com ácido sulfúrico diluído. É formada uma solução de sulfato de pilocarpina, de onde se forma a base de pilocarpina através da ação do cloreto de metileno. Uma solução de metanol e acetona é utilizada para solubilizar a base de pilocarpina e auxiliar na passagem por filtração e então sofre uma neutralização com ácido clorídrico gás. O cloridrato cru cristalino obtido é purificado mediante filtrações com carvão ativo e recristalizações

### **4.3 Processo de extração supercrítica**

Com o passar dos anos novas tecnologias têm sido criadas no intuito de se preservar e recuperar compostos bioativos de material vegetal ou animal. Uma dessas tecnologias inovadoras é a extração por fluido supercrítico, que é uma tecnologia limpa, pois não se faz necessário o uso de solventes tóxicos, é uma extração seletiva, sendo essa seletividade modificada com o uso de cossolventes, desta forma possui um processo favorável para a área alimentícia, cosmética e farmacológica.

Na Extração por Fluido Supercrítico (SFE) o solvente é um fluido no estado supercrítico, sendo o termo “fluido supercrítico” utilizado para designar a condição de fase supercrítica da matéria. Para que uma substância atinja a sua fase supercrítica um conjunto de valores de suas propriedades físicas devem ser levados em consideração. Para isto valores nominais mínimos dessas variáveis intensivas são definidos para que a partir deles cada substância esteja na fase supercrítica. Estes valores são denominados pelo ponto crítico de cada substância, onde observamos a temperatura crítica ( $T_C$ ), pressão crítica ( $P_C$ ) e Densidade crítica ( $D_C$ ) (SOVOVÁ et. al., 2005; BRUNNER, 2004; BRUNNER, 1994).

Pode-se notar a diferença de temperaturas críticas entre o dióxido de carbono e a água (Tabela 1), isto ocorre pelo fato de esta propriedade está diretamente ligada às forças intermoleculares. A água, por apresentar ligações de ponte de hidrogênio (energia de dissociação de uma ligação desse tipo: 4-38 kJ mol<sup>-1</sup>) necessita de mais energia térmica para chegar na fase supercrítica, enquanto que o dióxido de carbono apresenta ligações dipolo-dipolo, que são consideravelmente menos intensas.

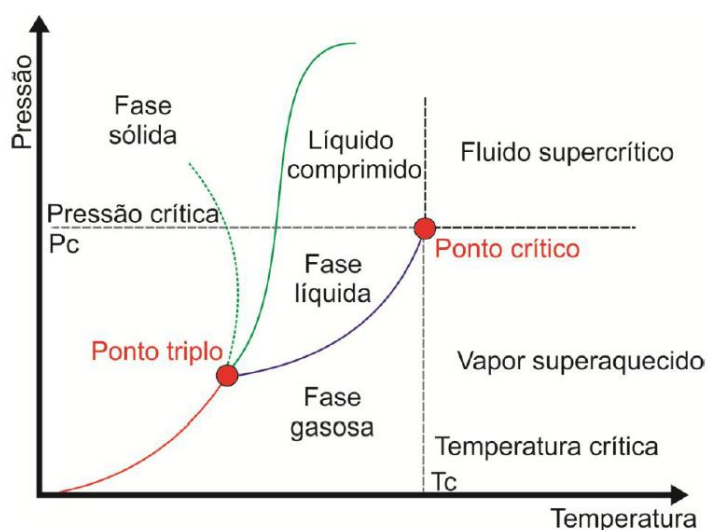


**Tabela 1** - Valores nominais de Temperatura Crítica ( $T_C$ ), Pressão Crítica ( $P_C$ ) e Densidade Crítica ( $D_C$ ) de algumas substâncias.

	$T_C$ (°C)	$P_C$ (bar)	$D_C$ (g/cm <sup>3</sup> )
H <sub>2</sub> O	374,2	214,8	0,32
NH <sub>3</sub>	132,5	109,8	0,23
Trifluorometano	26	46,9	0,52
CO <sub>2</sub>	31	72	0,47

Fonte: Turner, King e Mathiasson (2001)

O estado supercrítico de um fluido apresenta propriedades com características intermediárias entre as de um líquido e um gás, onde tem a densidade e a difusividade similares às do líquido e a viscosidade próxima à dos gases. Logo, temos que, quando são aplicados baixos valores de viscosidade aliada à ausência de tensão superficial, há uma facilidade de penetração do fluido no interior da matriz sólida, e altos valores de densidade conferem ao fluido elevado poder de solubilização. O comportamento de um composto puro pode ser observado no diagrama de fases sob influência da pressão e da temperatura (Figura 5).



**Figura 5** - Diagrama de fases P-T de uma substância pura  
Fonte: Oliveira, 2016.

Um solvente com boas características para ser um solvente no estado supercrítico, como o CO<sub>2</sub>, por exemplo, apresenta temperatura crítica baixa, pequena entalpia de vaporização, alta volatilidade, deve ser inerte, não tóxico, não corrosivo, não inflamável e de

fácil acesso no mercado. Por conta disso o CO<sub>2</sub> tem sido o solvente mais aplicado neste tipo de extração, pois além de ainda ter um valor baixo em comparação com outros solventes no mercado ele, por ter T<sub>C</sub> baixa, é relevante na extração de compostos termosensíveis. (BRUNNER, 1994; BRUNNER, 2005; QUISPE-CONDORI et. al., 2005; BRAGA, 2005).

O dióxido de carbono é uma substância apolar, constituído por dois átomos de oxigênio e um átomo de carbono, tem momento dipolo igual a zero, o que torna a sua polaridade semelhante à de outros solventes apolares tipicamente utilizados em processos de extração sólido-líquido, como o hexano (LUQUE DE CASTRO et al., 2004; ROSA et. al., 2009). No entanto, mesmo tendo a sua densidade elevada, o CO<sub>2</sub> possui certa limitação em obter moléculas polares, e por conta disto são adicionados ao processo de extração cossolventes ou modificadores, que são compostos miscíveis e polares. A polaridade destes solventes está ligada às propriedades físicas e químicas de suas moléculas, exercendo influência sobre o ponto de fusão, o ponto de ebulição e a solubilidade do solvente (MORRISON e BOYD, 1996; JEON e CHESNEY, 1999).

Portanto, pequenas quantidades de substâncias polares (etanol, acetona e água) têm sido utilizadas em extrações supercríticas para a obtenção de compostos polares com o objetivo de aumentar a solubilidade destes compostos no CO<sub>2</sub> supercrítico aumentando o rendimento de extração destes constituintes. Com a adição de cossolventes os rendimentos obtidos sofrem alterações, pois um sistema de interação muito mais complexo é formado quando comparado com o sistema matéria prima + CO<sub>2</sub> (PASQUEL et al., 2000; ZANCAN et al., 2002; PEREIRA et al., 2004; SOVOVÁ et al., 2004; REVERCHON e DE MARCO, 2006; TAKEUCHI, 2009).

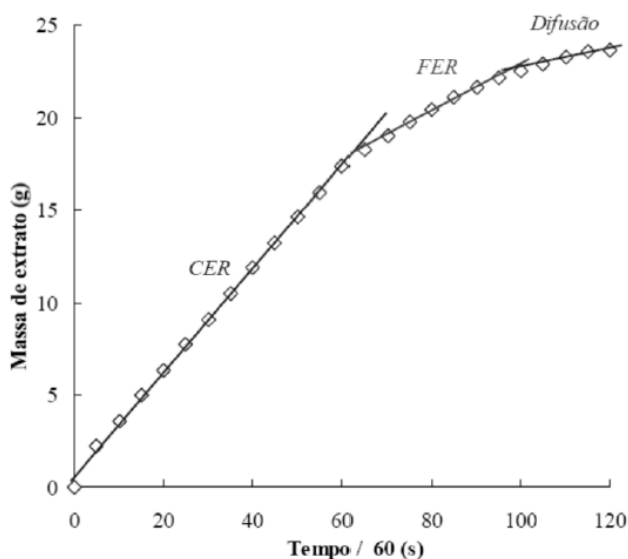
Desta forma, a SFE possui vantagens consideráveis quando comparada com métodos convencionais de extração, pois ao final da extração o solvente, que em pressão atmosférica retorna ao seu estado gasoso, se separa facilmente do extrato, fornecendo um produto final acabado, sem necessidade de um processo posterior a extração. O solvente supercrítico possui menor requerimento energético quando comparado à destilação e possibilita uma rápida extração devido à baixa viscosidade, alta difusividade e adequado poder de solvatação. É uma tecnologia que não requer o uso de solventes orgânicos, sendo consagrado como uma tecnologia verde, segura e ecologicamente correta, uma vez que, industrialmente, o dióxido de carbono é recirculado no sistema (VASCONCELLOS, 2007).

#### 4.3.1 Curvas Globais de Extração

As curvas globais de extração supercrítica expressam a taxa de extração, isto é, massa de extrato ou rendimento em função do tempo ou da massa de solvente utilizada. A taxa de extração não é uma função linear do tempo e, portanto, o comportamento das curvas globais de extração pode ser divergente. As curvas globais de extração são estudadas, pois permitem a determinação dos parâmetros de processo, tal qual, o tempo total de extração, as etapas da extração, a determinação da solubilidade e a modelagem matemática de transferência de massa no sistema (BRUNNER, 1994).

No estudo cinético, as curvas de extração podem ser divididas em três etapas, que são controladas por mecanismos de transferência de massa. BRAGA (2005) afirma que as curvas globais de extração podem ser divididas em três tempos ( Figura 6). O primeiro, denominado de período de taxa constante de extração (CER), o soluto de fácil acesso encontra-se presente em grande quantidade na superfície das partículas da matriz. Nesse período, a taxa de extração é constante e a convecção é o mecanismo de transferência de massa dominante e controlado pela convecção, ou seja, pelo escoamento do solvente. Em geral, esse período pode ser caracterizado pelos seguintes parâmetros:  $t_{CER}$  (duração do período CER, s);  $Y_{CER}$  (razão mássica de soluto na fase supercrítica na saída do leito);  $M_{CER}$  (taxa de transferência de massa, kg/s) e  $R_{CER}$  (rendimento do período CER);

No período de taxa de extração decrescente (FER), o soluto de fácil acesso está chegando ao fim, logo a taxa de transferência de massa decresce e então se inicia o mecanismo de difusão, fenômeno que atua combinado com a convecção. No terceiro e último tempo de extração, a obtenção de soluto está ligada apenas ao processo de difusão no interior das partículas da matriz sólida, a taxa de extração decai drasticamente e se torna quase linear.



**Figura 6** - Curva de extração de cravo-da-Índia (adaptado de RODRIGUES et al., 2002)

#### 4.3.2 Modelagem Matemática

A habilidade de prever as curvas cinéticas de extração é de fundamental importância tanto no projeto como na elaboração de uma planta industrial. Dessa maneira, modelagem matemática é provavelmente a principal ferramenta de previsão que tem por objetivo a estimativa dos parâmetros envolvidos no processo, como as dimensões requeridas para a coluna de extração, a vazão de solvente necessária para a obtenção da taxa de extração desejada, o tamanho das partículas de sólidos e possivelmente a previsão da viabilidade do processo (QUISPE-CONDORI, 2005; MARTINEZ ET AL. 2003). Para tanto, os modelos matemáticos devem ajustar parâmetros de valor predito como função das condições operacionais, de forma que a partir de curvas modeladas seja possível projetar um processo de extração supercrítica em escala industrial (BRAGA, 2005)

Sovová (2012) propôs várias equações capazes de serem aplicadas na modelagem de curvas de extrações das matérias-primas mais diversificadas possíveis. Este modelo utiliza a combinação de tempos característicos para períodos ou fases individuais que podem ser observados durante o processo de extração, tais como a transferência de massa externa e interna, o tempo característico da transferência de massa na fase fluida ( $t_f$ ), o tempo característico da transferência de massa interna ( $t_i$ ) e o tempo médio de residência do solvente no extrator ( $t_r$ ) (Sovová, 2012; Nadalin et al. 2014).

O modelo considera dois períodos de extração na curva cinética: o primeiro é dependente da solubilidade do soluto ( $Y_{sat}$ ) em  $CO_2$  supercrítico ( $t \leq t_1$ ), onde  $t_1$  é o fim do primeiro período de extração, e no segundo, a transferência de massa é controlada pela

difusão da matéria-prima vegetal ( $t > t_1$ ). Mouahid et al (2013) representou o modelo de Sovová (2012) com a curva de extração descrita pelas seguintes equações:

Para  $t \leq t_1$

$$e = t y_{sat} \left[ 1 - \exp\left(\frac{-1}{\theta_f}\right) \right] q' \quad (1)$$

Onde  $e$  é o rendimento da extração,  $t$  é o tempo de extração,  $\theta_f$  ( $=t_f/t_r$ ) é a resistência a transferência de massa externa (adimensional) e  $q'$  é a taxa de fluxo específico.

Para  $t = t_1$

$$e_1 = G X_u \quad (2)$$

Onde  $G$  é a fração inicial de extrato na célula intacta e  $X_u$  é a concentração de extrato no sólido antes da extração.

Para  $t > t_1$

$$e = X_u \left[ 1 - (1 - G) \exp\left(-\frac{t-t_1}{t_i}\right) \right] \quad (3)$$

Onde  $t_i$  é o tempo característico da transferência de massa da fase sólida (difusão interna).  $t_1$  e  $Y_{sat}$  correspondem à duração do período *CER* ( $t_{CER}$ ) e a proporção em massa de soluto na fase fluida na saída do extrator no período *CER* ( $Y_{CER}$ ), respectivamente.  $G$ ,  $t_i$  e  $\theta_f$  são os parâmetros ajustáveis. O parâmetro  $\theta_f$  é ajustado com a equação 1 a partir do segmento linear da curva,  $G$  e  $t_i$  são ajustados com a equação 3. Com esses parâmetros, é possível calcular o coeficiente de transferência de massa na fase fluida (coeficiente externo) ( $k_f$ ) e o coeficiente de transferência de massa interno ( $k_i$ ) usando as seguintes equações:

$$t_r = \frac{\gamma}{q'} \quad (4)$$

$t_r$  representa o tempo característico do deslocamento do fluido no extrator e  $\gamma$  ( $=\rho_f \varepsilon / \rho_s (1-\varepsilon)$ ) é a relação mássica entre o solvente e sólido no extrator, sendo  $\rho_f$  a densidade do solvente e  $\rho_s$  a densidade da partícula

$$t_f = \frac{\varepsilon \lambda}{1 - \varepsilon k_f}, \quad \theta_f = \frac{t_f}{t_r} \quad (5)$$

$t_f$  é o tempo característico de transferência de massa externa na fase fluida e  $\varepsilon$  é a porosidade do leito.

$$t_i = \frac{\lambda}{k_i} \quad (6)$$

Onde  $\lambda$  é a dimensão característica das partículas (volume-superfície)

Para avaliar a qualidade do ajuste matemático se calcula o coeficiente de ( $R^2$ ) e a soma residual dos quadrados (RSS).

## 5 REFERÊNCIAS

ABREU et al., 2007a AB'SÁBER, A.N. **Geomorfologia da região: Corredor Carajás** - São Luiz. In: Carajás. Desafio Político, Ecologia e Desenvolvimento. São Paulo: Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e tecnológico. Pp. 88-123, 1986.

ALMEIDA, Cláudio Aparecido de et al. High spatial resolution land use and land cover mapping of the Brazilian Legal Amazon in 2008 using Landsat-5/TM and MODIS data. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 291-302, 2016.

ANDRADE-NETO, Manoel; MENDES, Paulo Henriques; SILVEIRA, Edilberto Rocha. An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachyllophus*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 885-887, 1996.

AROMDEE, Chantana et al. Serum pilocarpine esterase activity and response to oral pilocarpine. **Biochemical and molecular medicine**, v. 59, n. 1, p. 57-61, 1996.

BEASLEY AND FRAUNFELDER, 1979. IN: GILMAN, A. G. et al. As Bases Farmacológicas da Terapêutica-8a edição-1991. **Ed Guanabara Koogan**.

BRAGA, Benedito. **Introdução à engenharia ambiental**. 2ª edição. São Paulo: Person Prentice Hall, 2005.

BRUNNER, Gerd H. **Supercritical fluids as solvents and reaction media**. Elsevier, 2004.

BRUNNER, Gerd. **Gas extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes**. 1 st ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994.

BRUNNER, Gerd. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of food engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21-33, 2005.

BUCOLO, CLAUDIO; MANGIAFICO, PAOLO. Pharmacological profile of a new topical pilocarpine formulation. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 15, n. 6, p. 567-573, 1999.

BUNDGAARD, Hans et al. Pilocarpine prodrugs II. synthesis, stability, bioconversion, and physicochemical properties of sequentially labile pilocarpine acid diesters. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 75, n. 8, p. 775-783, 1986.

CASTRO, Karina Neob de Carvalho et al. In vitro effects of *Pilocarpus microphyllus* extracts and pilocarpine hydrochloride on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 248-253, 2016.

CHUNG, Ping-Hong; CHIN, Ting-Fong; LACH, John L. Kinetics of the hydrolysis of pilocarpine in aqueous solution. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 59, n. 9, p. 1300-1306, 1970.

CORRÊA, M. Pio. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, Ministério da Agricultura. **Brasil: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, v. 6, p. 123-129, 1984.

COSENTINO, Hélio Morrone. Proposta de substituição do uso de benzeno na obtenção de sais de Pilocarpina a partir de folhas de pilocarpus Jaborandi. São Paulo, Universidade Mackenzie, mestrado em Saneamento Ambiental, Dissertação, 1998.

COSTA, Aloísio Fernandes. Farmacognosia, vol. 3. **Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian**, p. 986-989, 1975.

DE MORAES, Bergson Cavalcanti et al. Variação espacial e temporal da precipitação no estado do Pará. **Acta Amazon**, v. 35, p. 207-217, 2005.

DE OLIVEIRA, Mozaniel Santana et al. Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 118, p. 185-193, 2016.

DEWICK, Paul M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

FAN, Tony Y. et al. Improved high-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine and its degradation products in ophthalmic solutions Importance of octadecylsilane column choice. **Journal of Chromatography A**, v. 740, n. 2, p. 289-295, 1996.

FERREIRA, Gracialda Costa et al. RELATÓRIO ANUAL DE MONITORAMENTO, Programa de Conservação do jaborandi nativo da Floresta Nacional de Carajás. **FUNPAPA/UFRA/VALE**, 2017.

GARCÍA-RISCO, Mónica R. et al. Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 949-954, 2011.

GILMAR, A. G. As bases farmacológicas da terapêutica. **São Paulo: Mac GrawHill**, 2003. In: TAYLOR, P. **Agonistas colinérgicos**, v. 8, p. 79-84, 1991

GUMIER-COSTA, Fabiano et al. Parcerias institucionais e evolução do extrativismo de jaborandi na Floresta Nacional de Carajás, Pará, Brasil. **Sustentabilidade em Debate**, v. 7, n. 3, p. 91-111, 2016.

HARDY, E. Bull., **Soc. chim.** France, v.24, n.2, p497, 1875.

HENRIQUES, Amélia T. et al. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 765-792, 2004. In SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

HILL, Richard K.; BARCZA, S. Stereochemistry of the jaborandi alkaloids. **Tetrahedron**, v. 22, n. 8, p. 2889-2893, 1966.

HOMMA, Alfredo Kingo Oyama. História da agricultura na Amazônia: da era pré-colombiana ao terceiro milênio. **Área de Informação da Sede-Livro científico (ALICE)**, 2003.



IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). 2016. Portaria No. 443, de 17 de dezembro de 2014. **Diário Oficial da União**, sessão 1, ISSN 1677-7042, Nº 245, quinta-feira, 18 de dezembro de 2014.

JEONG, M.; CHESNEY, D. J. Investigation of modifier effects in supercritical CO<sub>2</sub> extraction from various solid matrices. **Journal of Supercritical Fluid**, v. 16, 1999, p. 33-42.

JOSEPH, C. J. Revisão sistemática do gênero *Pilocarpus* (ssp. brasileiras). **Mecânica Popular**, v. 40, p. 1-9, 1967.

JOWETT, Hooper Albert Dickinson. LXXIX.—The constitution of pilocarpine. Part 1. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 77, p. 851-860, 1900.

KAASTRA, Roel C. *Pilocarpinae* (Rutaceae). **Flora Neotropica**, p. 1-197, 1982.

KUSHNICK, Howard; LIEBMANN, Jeffrey M.; RITCH, Robert. Systemic pilocarpine toxicity from ocusert leakage. **Archives of Ophthalmology**, v. 114, n. 11, p. 1432-1432, 1996.

LAIBOVITZ, Robert et al. Dorzolamide versus pilocarpine as adjunctive therapies to timolol: a comparison of patient preference and impact on daily life. **Clinical therapeutics**, v. 18, n. 5, p. 821-832, 1996.

LIMA, D. F. Alcalóides de interesse industrial: aspectos químicos e biológicos. 2008. 56 f. **Monografia (Especialização em Plantas Medicinais)–Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.**

LIMA, David Fernandes et al. Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0170281, 2017.

LINK, H.; BERNAUER, Karl. Über die Synthese der *Pilocarpus*-Alkaloide Isopilosin und Pilocarpin, sowie die absolute Konfiguration des (+)-Isopilosins. **Helvetica chimica acta**, v. 55, n. 4, p. 1053-1062, 1972.

LUQUE-GARCIA, J. L.; DE CASTRO, MD Luque. Ultrasound-assisted soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment: application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. **Journal of Chromatography A**, v. 1034, n. 1-2, p. 237-242, 2004.

MAAT, L.; BEYERMAN, H. C. The imidazole alkaloids. In: **The alkaloids: chemistry and pharmacology**. Academic Press, p. 281-333, 1984.

MARQUES, M. E. T.; DA COSTA, J. P. C. Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). **Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E)**, 1994.

MARTINELLI, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 2013.

MCHUGH, Mark; KRUKONIS, Val. **Supercritical fluid extraction: principles and practice**. Elsevier, 2013.

MCKILLOP, Alexander et al. introduction to the chemistry of the alkaloids. 1970.

MERCER, Paula; ARMENTA, Roberto E. Developments in oil extraction from microalgae. **European journal of lipid science and technology**, v. 113, n. 5, p. 539-547, 2011.

MERCK, S.; QUÍMICAS, A. INDÚSTRIAS. Manejo sustentado do jaborandi nativo no parque ecológico de Carajás. **Unidade Agroindustrial da Fazenda Chapada, Barra do Corda, Maranhão**, 1997.

MESEGUER, Georges et al. Gamma scintigraphic comparison of eyedrops containing pilocarpine in healthy volunteers. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 12, n. 4, p. 481-488, 1996.

MINGOIA, Quintino. Química farmacêutica. In: **Química farmacêutica**. 1967.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química orgânica**. 13.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. 1510p.

Mouahid, A. Crampon, C. Toudji, E. Badens, S. A. A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling. **J. of Supercritical Fluids** 77 (2013) 7–16

MOURA, E. F. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. 2003. 75p. 2003. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Nađalin, V. Lepojević, Ž. Ristić, M. Vladić, J. Nikolovski, B. Adamović, D. Investigation of cultivated lavender (*Lavandula officinalis* L.) extraction and its extracts, **Chem. Ind. Chem. Eng. Q.** 20 (2014) 71–86.

NEVILLE, George A.; HASAN, Fariza B.; SMITH, Ian CP. Stereoselective epimerization of pilocarpine in aqueous solution as determined by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 2094-2100, 1976.

OLIVEIRA F., AKISUE, G., AKISUE, M. K., **Farmacognisia**, Editora Atheneu, São Paulo – Brasil, p. 216, 412; 1991.

OLIVEIRA, Carla. Em Carajás, jaborandi gera saúde e renda. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. **Ministério do Meio Ambiente**, 2017.

OLIVEIRA, Mosaniel Santana de. **Composição química e atividade fitotóxica de óleo essencial de cravo da índia (*syzygium aromaticum*) obtido com co2 supercrítico**. p. 30, 2016. Dissertação de mestrado – Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade Federal do Pará, Pará.

PASQUEL, A., MEIRELES, M. A. A., MARQUES, M. O. M., PETENATE, A. J. Extraction of stevia glycosides with CO<sub>2</sub> + water, CO<sub>2</sub> + ethanol, and CO<sub>2</sub> + water + ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, 2000, p. 271-282.

PEREIRA, C. G., MARQUES, M. O. M., BARRETO, A. S., SIANI, A. C., FERNANDES, E. C., MEIRELES, M. A. A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO<sub>2</sub>+ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 30, 2004, p. 51-61.

PEREIRA, Rafael Caldas et al. Development and validation of a rapid RP-HPLC-DAD analysis method for the quantification of pilocarpine in *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae). **Food and Chemical Toxicology**, 2018.

PETIT, A. AND POLONOVSKI, M. *Bull. Chim. France*, [3], 17, 554, 1987.

PINHEIRO, C. U., Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus* Stapf Ex Holm., Rutaceae) no Maranhão, Brasil. *Acta Bot. Brás*, 16: 141 - 150, 2002.

PINNER, A., KOHLHAMMER, E., Ueber pilocapin. (Mittheilungen). **Ber**, v.33, p.1424-1431, 1900.

PORTO, M. & SILVA, M.F.F. Tipos de Vegetação Metalófila da Área da Serra dos Carajás e Minas Gerais. **Acta Botânica Brasílica**, 3(2):13-21, 1989.

QUISPE-CONDORI, Sócrates et al. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. **The Journal of supercritical fluids**, v. 36, n. 1, p. 40-48, 2005.

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

REVERCHON, Ernesto; DE MARCO, Iolanda. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146-166, 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Tradução de Ivone Castilho Benedetti. São Paulo: Ed. Premier, p. 163-208, 1997.

RODRIGUES, V. M. et al. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO<sub>2</sub>: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, 2002, p. 21-36.

ROSA, Paulo TV et al. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: **Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications**. CRC Press, 2009. In: MEIRELES, M. Angela A. **Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications**. CRC press, 2008.

SANTOS, Ana Paula; MORENO, Paulo Roberto Hrihorowitsch. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 116-137, 2004.

SCHEERER, Jochen. Untersuchungen zum Einfluss exogener und endogener Faktoren auf den Pilocarpingehalt von *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth unter natürlichen Bedingungen. 2001.

SILVA, JMC da; RYLANDS, A. B.; FONSECA, GAB da. O destino das áreas de endemismo da Amazônia. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 124-131, 2005.

SILVA, Manoela Ferreira Fernandes da; LOBO, Maria da Graça A.; SECCO, Ricardo de Souza. Aspectos ecológicos da vegetação rupestre da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil. 1996.

SKAAT, Alon et al. Effect of pilocarpine hydrochloride on the Schlemm canal in healthy eyes and eyes with open-angle glaucoma. *JAMA ophthalmology*, v. 134, n. 9, p. 976-981, 2016.

SKORUPA, L. A. **Revisão taxonômica de *Pilocarpus vahla* (Rutaceae)**. USP, 1996.

SKORUPA, Ladislau A. Espécies de *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae) da Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, v. 30, n. 1, p. 59-70, 2000.

SOUZA JR, Carlos M. et al. Ten-year Landsat classification of deforestation and forest degradation in the Brazilian Amazon. *Remote Sensing*, v. 5, n. 11, p. 5493-5513, 2013.

SOVOVÁ, H., SAJFRTOVA, M., BÁRTLOVÁ, M., OPLETAL, L. Near-critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 30, 2004, p. 213-224.

SOVOVÁ, Helena. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 33, n. 1, p. 35-52, 2005.

SOVOVÁ, Helena. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 66, p. 73-79, 2012.

SWAN, GA. **An introduction to the alkaloids**. Blackwell Scientific Publications, Great Britain, p. 188-192, 1967.

TAKEUCHI, T. M. **Extração supercrítica de macela, cravo-da-índia e vetiver: aspectos tecnológicos e econômicos**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2009, 417 p.

TURNER, Charlotta; KING, Jerry W.; MATHIASSEN, Lennart. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 936, n. 1-2, p. 215-237, 2001.

VAHL, M. ***Pilocarpus racemosus***. *Eclog Amer* 1, 10, 1797.

VASCONCELLOS, C. M. C. **Extração supercrítica dos óleos voláteis de *Achyrocline satureioides* (Macela) e *Vetiveria zizanioides* (Vetiver): determinação da cinética de extração e estimativa de custos de manufatura**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007, 114 p.

VÉRAS, Leiz MC et al. Industrial scale isolation, structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf leaves: A promising alkaloid against schistosomiasis. *PLoS One*, v. 8, n. 6, p. e66702, 2013.

VIANA, Pedro Lage et al. Flora of the cangas of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: history, study area and methodology. *Rodriguésia*, v. 67, n. 5SPE, p. 1107-1124, 2016.

VITAL, M. A. B. F.; ACCO, A. Agonistas e antagonistas colinérgicos. **Spinosa HS, Górnjak SL, Bernardi MM. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 84-85, 2006. In: SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, Silvana Lima; BERNARDI, Maria Martha. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. **Rio de Janeiro, 1999.**

VOIGTLÄNDER, Hans-Walter et al. Epiisopiloturin, ein neues Pilocarpus-Alkaloid. **Archiv der Pharmazie**, v. 311, n. 11, p. 927-935, 1978.

WEISS, B. M.; LAMEIRA, O.; MARTINS, F. D.; MENDONÇA, M. V. **A experiência promissora do Projeto Jaborandi** – Parceria que promove Manejo, Conservação e Fortalecimento da Atividade Extrativista na Flona de Carajás. Pg. 34, 2011.

ZANCAN, K. C. **Obtenção de extrato de gengibre (Zingiber officinale Roscoe) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes: um estudo da atividade biológica dos extratos.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2001, 107 p.

ZUROWSKA-PRYCZKOWSKA, Katarzyna; SZNITOWSKA, Malgorzata; JANICKI, Stanislaw. Studies on the effect of pilocarpine incorporation into a submicron emulsion on the stability of the drug and the vehicle. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 47, n. 3, p. 255-260, 1999.

**6 CAPÍTULO 2 – ARTIGO: Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) leaf extracts by supercritical fluid extraction: Extract's global yield, pilocarpine quantification, antioxidant activity, and kinetic data**

**Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) leaf extracts by supercritical fluid extraction: Extract's global yield, pilocarpine quantification, antioxidant activity, and kinetic data**

Priscila do Nascimento Bezerra<sup>a\*</sup>, Bruno José Brito Teixeira<sup>b</sup>, Marielba de Los Angeles Rodrigues Salazar<sup>a</sup>, Fernanda Wariss Figueiredo Bezerra<sup>a</sup>, Vânia Maria Borges Cunha<sup>a</sup>, Geraldo Narciso da Rocha Filho<sup>c</sup>, Jesus Nazareno Silva e Souza<sup>b</sup>, Gracialda Costa Ferreira<sup>d</sup>,  
Raul Nunes de Carvalho Júnior<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> LABEX/FEA (Laboratory of Supercritical Extraction /Faculty of Food Engineering), ITEC (Institute of Technology), UFPA (Federal University of Para), Rua Augusto Corrêa S/N, Guamá, 66075-900, Belém, PA, Brazil

<sup>b</sup> CVACBA (Center for Valorization of Amazonian Bioactive Compounds), UFPA (Federal University of Para), Avenida Perimetral, 01, 66075-150, Guamá, Belém, PA, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Catalysis and Oil-Chemistry, Graduate Program in Chemistry, Institute of Exact and Natural Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, CEP 66075-110, Brazil

<sup>d</sup> Institute of Forestry Sciences, Federal Rural University of Amazon, Av. Pres. Tancredo Neves, 2501 S/N, Terra Firme, 66053100 - Belém, PA, Brazil

\*Corresponding authors.

Tel.: +55-91-984190195

**E-mail address:** [priscilanbezerra@gmail.com](mailto:priscilanbezerra@gmail.com) (P. N. Bezerra), [raulncj@ufpa.br](mailto:raulncj@ufpa.br) (R.N. de Carvalho Junior).

## Abstract

*P. microphyllus* is a natural source of pilocarpine, which is obtained with organic solvents. Thus, there is a need for a research to obtain this compound without pleasing the environment, such as supercritical fluid extraction (SFE), which was performed with two isotherms (40 and 60 °C), with pressures varying from 200 to 420 bar with CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> + EtOH. The increase of cosolvent, pressure, and temperature increased mass yield, pilocarpine, and phenolic compounds contents. The highest values of mass yield (4.78±0.38 %), pilocarpine (2.37±0.02 %), and phenolic compounds (173.67±1.5 mg GAE/g extract) were obtained at 60 °C/420 bar (CO<sub>2</sub> + 10 % EtOH). The antioxidant activity reached its best performance at 40 °C/200 bar (CO<sub>2</sub> + 10 % EtOH). The extraction condition with the highest pilocarpine content was used to perform the OEC and adjusted to the Sovová (2012) model, showing a good fit.

**Keywords:** Antioxidant activity, Pilocarpine, Supercritical extraction.

## 1. Introduction

Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), known as “true” jaborandi, belonging to the Rutaceae family, is one of the most important species in Brazil, due to its medicinal application, being used by indigenous people as galactagogue, diaphoretic, and diuretic. Its name refers to one of its use in folk medicine, ia-mbor-endi or “what causes salivation” in indigenous people language and refers to the capability of this plant to stimulate salivary glands [1,2]. Endemic to Brazil (native to the northern and northeastern regions of Brazil), it is regarded for being the only vegetable where the imidazole alkaloid pilocarpine occurs naturally, varying approximately from 0.2 to 1.2 % in the leaves [3,4].



The traditional process for pilocarpine obtainment from jaborandi leaves consists of intense use of organic solvents with subsequent purifications steps, processes that produces a highly contaminant and harmful to the environment residue [5–7]. Thus, it is necessary to seek for harmless technologies to the environment, such as supercritical fluid extraction (SFE), which is considered a green technology, especially for avoiding the use of organic solvents, also operates at high pressures but low temperatures, preserving thermosensitive compounds [8]. It is also considered an excellent technology to obtain bioactive compounds. The use of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) as the main solvent in the process brings great advantages since it is a non-toxic solvent, of easy separation from the final extract, and becomes a supercritical fluid without much effort, also is a great solvent for nonpolar compounds and to obtain polar compounds, modifiers such as ethanol and water can be used [9–11].

To the authors' knowledge, there is no papers' regarding the obtainment of pilocarpine alkaloid from jaborandi leaves using supercritical fluid extraction (SFE). Based on this context, this research aims to make an initial study of the pilocarpine alkaloid from jaborandi (*P. microphyllus*) leaves behavior under different SFE operational conditions, as well as an evaluation of the extract, such as total phenolic compounds content, and antioxidant activity, with the application of mathematical modeling using the highest mass yield obtained.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Raw material preparation and characterization*

Jaborandi (*P. microphyllus*) plants were acquired from the Carajás National Forest (Pará, Brazil), during a project between VALE company and the Federal Rural University of the Amazon – UFRA (Jaborandi Conservation Program native to the Carajás National Forest),

with administrative intervention of the Fundação de Apoio a Pesquisa, Extensão e Ensino em Ciências Agrárias – FUNPEA, which occurred during February 2014 to May 2016. By the time of the project the plants were dried at 50 °C indefinitely. At the Laboratory of Supercritical Extraction (LABEX), located at the Federal University of Para (UFPA), the leaves were manually separated from the stems and then dried in a circulation oven (model 225, Fabbe-Primar<sup>®</sup>, Brazil) for 72 h at 35 °C, to reduce the moisture absorbed during storage. Afterward, the dried leaves were comminuted in a knife mill (model ma 048, Marconi<sup>®</sup>, China). The samples humidity was determined according to [12], and then vacuum packed and stored under refrigeration.

The particle size analysis was performed using Tyler sieves (Bertel, Brazil), with a vibratory sieve shaker (Bertel Metallurgic Ind. Ltda., Brazil), the samples selected to be used in this study were between -32 to +42 mesh. The geometric mean diameter ( $d_{gm}$ ) was determined by the American Society of Agricultural Engineers (ASAE) method [13], the sample real density ( $\rho_r$ ) was obtained by helium pycnometer at the Analytical Center of the Chemistry Institute of the University of Campinas (Unicamp), and the bed apparent density ( $\rho_a$ ) was determined using the bed volume and the sample mass accommodated in it. The bed porosity ( $\varepsilon$ ) was calculated thus:  $\varepsilon = 1 - (\rho_a/\rho_r)$ .

## 2.2 *Supercritical fluid extraction (SFE)*

The extractions were performed using the *Spe-ed*<sup>™</sup> SFE (model 7071, Applied Separations, USA), that is located in the Laboratory of Supercritical Extraction (LABEX), at the Federal University of Pará (UFPA). The equipment consisting of a high pressure extractor coupled to a CO<sub>2</sub> cylinder (99.9% purity, White Martins, Belém, Pará, Brazil), an air compressor (model CSA 7.8, Schulz S/A, Brazil), a recirculator (model F08400796,

Polyscience, USA), a cosolvent pump (model 1500, LabAlliance, USA) filled with ethanol (99.8%, Neon, Brazil), and a CO<sub>2</sub> flowmeter (model M 5SLPM, Alicat Scientific system, USA) on the system output.

The global yield isotherms were determined using 0.010 kg of *P. microphyllus* treated leaves using an extractor vessel with  $5 \times 10^{-5} \text{ m}^3$  volume capacity (0.3248 m height and 0.014 m of inside diameter). The process operating temperatures were 40 and 60 °C combined with 200, 290, and 420 bar pressure, also both isotherms were analyzed without (CO<sub>2</sub>) and with cosolvent (CO<sub>2</sub> + 10% EtOH). The extractions were performed in two periods of time, 0.5 h of static extraction and 2 h of dynamic extraction, both with  $1.32 \times 10^{-4} \text{ kg/s}$  CO<sub>2</sub> flow rate. All extracts obtained (CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> + EtOH) were continuously collected in glass vials at ambient pressure, then, the CO<sub>2</sub> + EtOH extracts were evaporated under vacuum at 35 °C in a CentriVap (Labconco, USA), to separate the ethanol from the final extract before weighed. The extractions were performed in triplicate in all experimental conditions.

Overall extraction curve (OEC) was obtained at 60 °C/420 bar using CO<sub>2</sub> + 10% EtOH and the same characteristics of the isotherms, such as mass, vessel, static extraction period, and cosolvent flow rate. Samples were collected at ten intervals, been four intervals of 5 min, three intervals of 10 min, one interval of 20 min, and two intervals of 30 min, resuming in 130 min of dynamic extraction time.

CO<sub>2</sub> densities under the selected conditions in this study were calculated using software developed by the National Institute of Standards and Technology (NIST), which uses the Span and Wagner equation of state [14]. The densities of CO<sub>2</sub> + EtOH mixture under the same conditions were calculated with the Peng-Robinson equation of state [15] in the Aspen Hysys simulator (an integral part of Aspen One 8.6). The global yields ( $X_0$ ) were calculated on a dry basis with the mathematical ratio between the extract mass ( $m_{\text{extract}}$ ), the

sample mass ( $m_{\text{raw material}}$ ) used for the extractions, and the percentage of moisture in the sample ( $M_{\text{raw material}}$ ), in accordance to equation 1.

$$X_0(\%) = \left( \frac{m_{\text{extract}}}{m_{\text{raw material}} \times \left( 1 - \frac{M_{\text{raw material}}}{100} \right)} \right) \times 100 \quad (1)$$

### 2.3 Total phenolic compounds

In the total phenolic compounds quantification it was used the Folin–Ciocalteu method according to the methodology described by Singleton et al. [16] and modified by Georgé et al. [17]. *P. microphyllus* extracts were solubilized in EtOH at 7% (v/v) at 140 mg/l concentration. For the reaction, 0.3 ml of diluted sample, 1.5 ml of Folin–Ciocalteu (Tedia®, Brazil) at 10% (v/v), and 2 ml of sodium carbonate solution (99.5%, Vetec®, Brazil) at 7.5% (m/v) were added to the cuvettes and subsequently homogenized. For the blank it was used ethanol at 7% instead of the sample solution. The reaction was performed for 1 h at room temperature and in the absence of light. The quantifications were performed on a spectrophotometer UV–VIS (Thermo Scientific, model Evolution 60, USA), at 760 nm, using a standard curve constructed using gallic acid (98%, Vetec®, Brazil) according to the line equation ( $y=0.0099x-0.0277$ ;  $R^2=0.9971$ ) where  $y$  is the absorbance and  $x$  is the concentration. The analyzes were performed in triplicate and the results were expressed as mg GAE by mass on a dry basis (mg GAE/g extract).

### 2.4 Antioxidant activity

The antioxidant activities quantitative determination of *P. microphyllus* extracts were determined by Brand-Williams et al. [18] and Sánchez-Moreno et al. [19] method. Based on

the DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich, Brazil) radical elimination by antioxidants that may be present in the extract. Initially, a DPPH<sup>•</sup> solution was prepared at 60  $\mu$ M in EtOH. The reaction substrate was prepared using 3.9 ml of this solution and added in 0.1 ml of the extract at different concentrations (22, 20, 18, and 16 mg/ml). During the stabilization time of tEC<sub>50</sub>, the solutions were kept at room temperature and dark conditions, at the end of this time, that is required to reduce the initial amount of the radical DPPH<sup>•</sup> by 50%, the absorbance was measured at 515 nm using the spectrophotometer UV–VIS (model Evolution 60, Thermo Scientific, USA). To quantify the antioxidant activity the EC<sub>50</sub> (amount of antioxidant needed to reduce the initial amount of the radical DPPH<sup>•</sup> by 50%) value was calculated and the results were expressed as gram of *P. microphyllus* extracts per gram of DPPH<sup>•</sup> on a dry basis (EC<sub>50</sub> expressed in g of extract/g of DPPH). The analysis was performed in triplicate.

## 2.5 *Pilocarpine content*

For pilocarpine identification and quantification, the analyzes were performed in HPLC-UV/DAD using an ACE 3 C18 column (150×4.6 mm, 3  $\mu$ m particle size), with a Thermo Scientific series Ultimate 3000 (EUA), equipped with quaternary pump (LPG-3400PS), autosampler, diode-array detector – DAD (DAD-3000), and flow cell (Standart Analytical). Based on [5,20] method with isocratic elution, the mobile phase composition was 980 mL of buffer solution with 20 mL of methanol. The buffer solution consists of 13.5 mL of phosphoric acid at 85%, followed by the addition of 3 mL of triethylamine and ultrapure water up to 1000 mL. With pH adjusted to 3 with sodium hydroxide at 50%. Before use, the mobile phase was filtered through 0.45  $\mu$ m membrane filters.

The column temperature was maintained at 25 °C, with a flow rate of 0.3 mL/min, the injection volume was 25 µL, and detector wavelength at 214. The *P. microphyllus* leaves supercritical extracts were solubilized at 0.5 mg/ml concentration and diluted twice. For the analysis, the solubilization and dilution were performed with mobile phase and sonicated for 5 min before filtered with single-use syringe filters (0.45 µm pore size) and injected into the HPLC system. The amount of pilocarpine in the different samples was calculated by peak areas and a standard calibration curve. The data were processed using the software Chromeleon 7.1 SR2.

## 2.6 HPLC Method validation

Since the alkaloid pilocarpine was not previously quantified within a supercritical extract, some method validation analyzes were included in this study to ensure no interferences and a correct quantification performance, thus the validation method included specificity, linearity, and sensitivity. To ensure that the analysis is not compromised by the interference of other secondary metabolites that may compete with pilocarpine during reading, it is important to evaluate the method specificity. In the evaluation of this parameter, the analysis of the positive test (standard solution), negative test (mobile phase), solution with extract, and the molecule spectrum were performed [5,21].

For the linearity test a sternal standard calibration methodology was performed. The curve was prepared with six points, ranging from 0.5 µg/ml to 25 µg/ml, with pilocarpine Hydrochloride standard in the mobile phase from a stock solution in triplicate. The linearity of the peak area and the pilocarpine concentration data were treated with linear regression analysis using the least squares method and linear correlation coefficient (r) [22,23].

In the sensitivity test the limit of detection (LD) and the limit of quantification (LQ) were calculated from the pilocarpine standard calibration curves. LD and LQ were obtained by using equation 2 and 3, respectively.

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (3)$$

Where: DP is the standard deviation of the curve responses; and IC is the calibration curve slope [5,24].

## 2.7 Kinetic parameters calculation and OECs modeling

The OEC experimental data were used in the kinetic parameters calculations and mass transfer rates, based on Botelho et al. [25] and Costa et al. [26] work. The two-line spline was plotted to calculate the parameters on the curve initial period, that corresponds to the period where the extraction rate is constant (CER), inside this period the mass transfer rate is called  $M_{cer}$ , this period duration is  $t_{cer}$ , and the solute mass in proportion to the supercritical phase at the extractor outlet is the  $Y_{cer}$ . The  $Y_{cer}$  is obtained by dividing the  $M_{cer}$  for the solvent flow rate in this period.

The OEC 60 °C/420 bar using a binary system (CO<sub>2</sub> + 10% EtOH) as solvent, was fitted into Sovová [27] model, using the total solvent flow rate (CO<sub>2</sub> + EtOH), and the mixture density. The equations used in this work for this model were described by Costa et al [26]. This model is based on the characteristic times for individual phases that can be observed during the extraction process, such as the time of external and internal mass transfer. Known

as the mass transfer time in the fluid phase ( $t_f$ ), the internal mass transfer time ( $t_i$ ), and the mean residence time of the solvent in the extractor ( $t_r$ ). The experimental data were fitted using Origin Pro version 8.0.

## 2.8 Statistical analyses

The tests results were expressed as mean of the repetitions  $\pm$  standard deviation, of three independent replicates ( $n=3$ ), since all the analyses were performed in triplicate. The results were analyzed through multivariate analysis of variance, using the software Statistica® program version 7.1 (Statsoft, Inc. Tulsa, USA), when significant, compared by Tukey test at 95% probability.

## 3. Results and discussion

The raw material moisture was  $7.9\pm 0.19$  %. The particle's geometric diameter ( $d_{gm}$ ) was  $0.39\pm 0.05$  mm, the real density ( $\rho_r$ ) was  $1.29\pm 0.01$  g/cm<sup>3</sup>, the apparent bed density ( $\rho_a$ ) was  $0.32\pm 0.01$  g/cm<sup>3</sup>, and the bed porosity was equal to 0.74.

### 3.1 Global yield ( $X_0$ )

The global extraction yields obtained from *P. microphyllus* leaves by supercritical fluid extraction are shown in Fig. 1. It can be observed a range from  $2.19\pm 0.11\%$  to  $4.78\pm 0.38\%$ , been the lowest obtained at 40 °C/200 bar with CO<sub>2</sub> and the highest at 60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH, indicating a considerable increase in mass yield with higher pressure and temperature and addition of cosolvent. Similar results have already been reported in the literature by others authors, such as Botelho et al. [28], that obtained a global yield of



1.3 to 4.2 % from copaiba leaves extract using 40 °C and 60 °C isotherms without cosolvent, and Salazar et al. [29] that obtained values from 1.27 % to 3.21 %, and the highest yield was obtained with the higher pressure and 10 % of cosolvent (EtOH), as in this study.

The extraction global yield values show significant differences among them ( $p \leq 0.05$ ). Where the highest value, obtained at 60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH (4.78±0.38%), differs statistically from the others. The lowest mass yields were obtained at 40 °C/200 bar and 60 °C/200 bar with CO<sub>2</sub>, and do not present significant difference between them, however, they differ from all other mass yields.

Fig. 1 (a,b) shows the pressure and density influence in the extracts global yield obtained at 40 and 60 °C, where the *P. microphyllus* + CO<sub>2</sub> system interaction showed a relationship between the global yield, pressure, temperature, and the CO<sub>2</sub> density. The global yield increases with increasing pressure and temperature. According to Carvalho et al. [30], this behavior occurs when the solute vapor pressure prevails, that is, the *P. microphyllus* + CO<sub>2</sub> system interacts so that the increase in pressure and temperature reduces the distance between the solute and solvent molecules, occurring then the phenomenon of solubilization of these molecules from a condensed to an expanded phase leading to an increase in global yield.

In Fig. 1 (c,d) it is possible to observe an inflexion point at 272 bar, also known as retrograde condensation, where the global yield at the 40 °C isotherm is higher at pressures below the inflexion point, after this point the 60 °C isotherm yield increases and stands out, been the highest yield then. This phenomenon can be justified by observing a much higher density at pressures under 272 bar at the 40 °C isotherm compared to the 60 °C isotherm. Thus, the higher the solvent density the greater it's the solubilization power, higher yields are obtained with the effect of solvent (CO<sub>2</sub> + 10%EtOH) density prevailing. The difference in the densities value between the two isotherms above 272 bar pressure became increasingly smaller. In the extractions carried out at 200 bar the 40 °C isotherm density was higher in 77.1

kg/m<sup>3</sup> than the 60 °C isotherm, at 290 bar this difference fell to 53.35 kg/m<sup>3</sup>, and at 420 bar this value was only 5.27 kg/m<sup>3</sup>. With the decrease in density values, the global yield was influenced by the pressure and temperature, modifying the solvent and solute properties, since increasing pressure and temperature the vapor pressure increases, raising the supercritical fluids solubility [31–33] (Supplementary material S1)

### 3.2 Total phenolic compounds (TPC)

Table 1 shows the total phenolic compounds content under influence of each experimental condition of SFE process used in this study. It can be observed that the extract with the highest phenolic compound (174.72 mg GAE/g extract) was obtained at 60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10 % EtOH, with one of the highest solvent density (973.14 kg/m<sup>3</sup>). From the ANOVA results, the temperature and the presence of cosolvent had a statistical significant influence on the extracts TPC, since the sample obtained at 60 °C/290 and 420 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH had the highest phenolic compound content, without significant difference ( $p > 0.05$ ) among them, and yet significantly different from all other samples.

The presence of cosolvent had a major influence on the phenolic compounds content, since the presence of cosolvent changes the fluid polarity to more polar, increasing the solvation power of phenolic compounds that are constituted of polar compounds. This behavior is similar to that found by De Aguiar et al. [34], at where the extractions of biquinho pepper (*Capsicum chinense*) using cosolvent, such as ethanol and water, has influenced in the polarity, improving the polar compounds extraction. Garmus et al. [35], reported in pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves an result that corroborate to this behavior, it was used CO<sub>2</sub>, methanol, and water in supercritical extractions and the total phenolic compounds concentrations achieved a significant increase in the extractions with cosolvents. Performing a

comparison with literature data it is observed that the values of phenolic compounds found in *P. microphyllus* leaves are elevated. Goyeneche et al. [36] using supercritical CO<sub>2</sub> on radish leaves obtained at its best condition (40 °C/400 bar) a TPC value of 14.55 mg GAE/g extract, Martinez-Correa et al. [37] obtained from *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO<sub>2</sub> a TPC value of 40.1 mg GAE/g extract, and Cadena-Carrera et al. [38] using supercritical CO<sub>2</sub> + EtOH on *Ilex guayusa* Loes. leaves at 75 °C/250 bar obtained a TPC value of 4.04 mg GAE/g extract. (Supplementary material S2)

### 3.3 Antioxidant activity (AA)

Table 1 shows EC<sub>50</sub> values obtained in SFE extracts, the lowest value found (753.85 g extract/g of DPPH) was statistically different ( $p > 0.05$ ) from all the others extracts values, as well as the highest EC<sub>50</sub> value (2689.88 g extract/g of DPPH). The lowest value was obtained at 40 °C/200 bar using CO<sub>2</sub> +10% EtOH and the highest at 60 °C/290 bar with CO<sub>2</sub> as cosolvent. Starting from the analysis principle, where the extracts antioxidant potential is inversely proportional to the EC<sub>50</sub> value, thus, the smaller the EC<sub>50</sub>, higher the sample antioxidant potential.

A very strong response from this analysis is the presence of cosolvent, and it can be easily observed in table 1 the difference between the values achieved by the SFE with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH that obtained twice the antioxidant activity over the samples extracted with CO<sub>2</sub>. This behavior was also observed on total phenolic compounds and pilocarpine content, where the cosolvent had a positive influence on the contents. However, the highest phenolic compounds content was obtained at (60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH) and the highest antioxidant activity at (40 °C/200 bar using CO<sub>2</sub> +10% EtOH). However, the condition with

the lowest content of phenolic compounds (60 °C/200 bar with CO<sub>2</sub>) was the same condition as the lowest antioxidant activity.

Salazar et al. [29], when analyzing the antioxidant activity of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) leaves also had better results in the extracts obtained with cosolvente, as well as Rodriguez et al. [39] in his work with burdock (*Arctium lappa*). In general, the *P. microphyllus* supercritical fluid extract presented a potential as natural antioxidant agent.

### 3.4 Pilocarpine content

The pilocarpine content values (Table 1) obtained for the SFE extracts under the conditions used in this work ranged from 0.22±0.01 to 2.37±0.02 % in the extract, showing an increase of ten times over the lower value. The conditions with the lower (40 °C/200 bar with CO<sub>2</sub> as cosolvent) and higher (60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH as cosolvent) pilocarpine content had a statistical significance difference ( $p > 0.05$ ) from the others contents and also among them. In the extracts obtained with cosolvent, a similar behavior was observed with the increase in pressure and density, both isotherms with highest pressures reached the two highest levels of pilocarpine (40 and 60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH).

It can be observed that the presence of cosolvent had a major influence in the pilocarpine obtainment during the extraction. However, the cosolvent wasn't the only condition that influenced in pilocarpine content, the temperature, the pressure, and the densities also influenced, since the increase in these conditions increased the pilocarpine content. Fact that may be occurred due to some interaction between the compound present in the vegetal matrix, whose extraction may be facilitated under determined conditions. This behavior is expected since pilocarpine is a polar compound, considering that works that used cosolvent in the SFE obtained a higher phenolic compound content, that are polar compounds

as well, and the same conditions that reached a higher phenolic compound content was the same for the highest pilocarpine content [40,41].

According to some reports in the literature [42–44] the pilocarpine content found in *Pilocarpus microphyllus* leaves usually range from 0.06 to 500 mg pilocarpine/g of raw material, in this work the highest content of pilocarpine in the leaves was 0.01 mg pilocarpine/g of raw material. Previous studies also explain that the pilocarpine molecule degrades with time and elevated temperatures [20,45], and that may be the reason of a low pilocarpine content, considering that the leaves were around tree years old and were dried at 50 °C at the collection site. However, the SFE showed to be a good technology to the obtainment of the alkaloid pilocarpine, since even with a plant matrix with the alkaloid content probably compromised by time and temperature it was possible to evaluate the pilocarpine molecule behavior in the system plant matrix + CO<sub>2</sub> + EtOH, being possible to determine the operational condition with the highest content of pilocarpine. (Supplementary material S3)

### 3.5 HPLC method validation

This method was validated by using specificity, linearity, and sensitivity as HPLC analytical characteristics. This validation is very important for this work to ensure a good identification and quantification of the alkaloid pilocarpine in such a rich extract obtained by SFE, since there is no prior publication of pilocarpine quantification directly from supercritical extracts, which are extracts rich in secondary metabolites that may interfere with sensitive analysis such as high performance liquid chromatography.

The method specificity is shown in Fig. 2, at where it's possible to analyze the alkaloid pilocarpine chromatographic separation with a good resolution and symmetrical

peaks. The chromatograms of the pilocarpine standard, the pilocarpine in the extract, and the mobile phase confirms that there is no peak co-eluting with the pilocarpine peak. However, to certify the peak purity it was used a diode array detector (DAD), comparing the standard and the extract pilocarpine spectra. This analysis is also important since the mobile phase have a pH regulation and minimum variation changes the pilocarpine peak retention time.

The pilocarpine standard showed a good linearity over the concentration range of 0.5-25 µg/mL, the linear regression equation for pilocarpine was found to be  $y = 1.556x + 0.0876$ , and linear correlation coefficient ( $r^2$ ) was 0.999. Still with the calibration curve parameters, the LD and LQ values were 0.0221 and 0.0737, respectively. These results are lower than those reported by Klimczak [24] and Akabari [46], indicating a good sensitivity. This validation confirms that this method is good enough to separate the pilocarpine peaks even when the compound is part of a supercritical extract. (Supplementary material S2)

### 3.6 Overall extraction curve modeling

A supercritical extraction study based on mathematical models of mass transfer that occur during the extraction has great importance in future applications and in process improvements, since it describes the physical phenomena that occur during the extraction in the matrix + solvent system, allowing scale up and the knowledge of the characteristic times of the extraction process individual stages, the model proposed by Sovová [27] combines these times and allows the approximate description of different types of supercritical extraction. In this model we have two periods during the extraction, one that depends on solubility in the solvent (CO<sub>2</sub> + EtOH) and another based on the process diffusivity [47–49].

The mass transfer parameters results for the two straight line spline were:  $M_{cer} = 5.12 \times 10^{-7}$  kg/s,  $t_{cer} = 360$  s, and  $Y_{cer} = 0.0038$ . At where the adjust was suitable and good for

fitting into Sovová model (Supplementary material S4). The experimental extraction curve obtained at 60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH, and modeling are presented in Fig. 5. Where it can be seen the Sovová model fitting in both extraction periods (RSS =  $1.659 \times 10^{-4}$  and  $R^2 = 0.9713$ ), showing that the model was able to satisfactorily describe the experimental curve. Some parameters of the model are important to understand the extraction behavior, such as G, which is linked to the plant matrix particle diameter and the solute availability by the cells breaking in the milling process. The G in this case was 0.4267, which determines that the extract fraction is being obtained at the beginning of the extraction, since  $G < 1$  is indicative of the first extraction period, where the available solutes are obtained [27,50]. About the two extraction periods, the first one is the external mass transfer ( $t_f$ ) and the second the internal mass transfer ( $t_i$ ), the values found were  $t_f = 103.97$  s (1.73 min) and  $t_i = 8790.26$  s (146.50 min), confirming a shorter characteristic time in the external mass transfer, which is easily accessible, and this response is confirmed by the value of the mass transfer coefficient in the fluid phase ( $k_f = 1.0676 \times 10^{-5}$  m.s<sup>-1</sup>), which is larger than the internal mass transfer coefficient ( $k_i = 4.43673 \times 10^{-8}$  m.s<sup>-1</sup>). Residence time found  $t_r = 163.57$  s (2.72 min), for being greater than the external mass transfer time, complements the extraction evaluation in the sense that in the first extraction period the available solutes are dragged by the supercritical fluid (CO<sub>2</sub> + EtOH) linearly, in a ratio of yield  $\times$  extraction time.

With the model application it is also possible to determine the maximum mass that can be obtained in the extraction, the  $X_u$ . When compared to the experimental value, the extraction efficiency is visible, since  $X_u = 4.22$  % is a value close to  $X_0 = 3.38$  %.

#### 4. Conclusion

The SFE using *P. microphyllus* leaves at 60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH and 973.14 kg/m<sup>3</sup> density achieved the highest yield in mass (4.78±0.38%), total phenolic compound content (173.67±1.5 mg GAE/g of extract), and in pilocarpine content (2.37±0.02 % in the extract). The antioxidant activity had a different result, the result that showed a better activity was obtained at 40 °C/200 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH. The condition with the highest pilocarpine content was used to obtain the OEC, and the curve was fitted in the Sovová (2012) model [27], presenting a good fit, being able to conclude that the extraction was performed efficiently and providing data for a possible scale up. Finally, the supercritical fluid extraction from *P. microphyllus* leaves allowed to study the pilocarpine molecule behavior when in contact with the supercritical solvent, which varied according to the different process conditions applied, and it was possible to observe a plausible behavior, especially since it is a polar compound and has been obtained at higher concentration in the extractions with cosolvent and of higher solvent densities, which are conditions with greater affinity for this type of compound, all of this without the use of organic solvents, that is, without the environment degradation.

### **Acknowledgments**

Priscila do Nascimento Bezerra thanks to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – process number 1697273/2017, for the master's scholarship.

### **References**

- [1] B.O. Holmstedt, S.H. Wasseén, R.E. Schultes, Jaborandi: An interdisciplinary appraisal, *J. Ethnopharmacol.* 1 (1979) 3–21.



- [2] M.P. Corrêa, Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, Ministério da Agricultura, Bras. Inst. Bras. Desenvol. Florest. 6 (1984) 123–129.
- [3] C.J. Joseph, Revisão sistemática do gênero *Pilocarpus* (ssp. brasileiras), Mecânica Pop. 40 (1967) 1–9.
- [4] L.A. Skorupa, Espécies de *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae) da Amazônia brasileira, Acta Amaz. 30 (2000) 59–70.
- [5] R.C. Pereira, C.D.F.A. Nonato, C.J. Camilo, H.D.M. Coutinho, F.F.G. Rodrigues, J. Xiao, J.G.M. da Costa, Development and validation of a rapid RP-HPLC-DAD analysis method for the quantification of pilocarpine in *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae), Food Chem. Toxicol. 119 (2018) 106–111. doi:10.1016/j.fct.2018.05.023.
- [6] A.C.H.F. Sawaya, B.G. Vaz, M.N. Eberlin, P. Mazzafera, Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids, Genet. Resour. Crop Evol. 58 (2011) 471–480. doi:10.1007/s10722-011-9660-2.
- [7] G. Avancini, I.N. Abreu, M.D.A. Saldan, P. Mazzafera, Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate, Phytochemistry. 63 (2003) 171–175. doi:10.1016/S0031-9422(03)00102-X.
- [8] M.M.R. De Melo, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva, Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology, J. Supercrit. Fluids. 92 (2014) 115–176. doi:10.1016/j.supflu.2014.04.007.
- [9] F.W.F. Bezerra, W.A. da Costa, M.S. de Oliveira, E.H. de Aguiar Andrade, R.N. de Carvalho Junior, Transesterification of palm pressed-fibers (*Elaeis guineensis* Jacq.) oil by supercritical fluid carbon dioxide with entrainer ethanol, J. Supercrit. Fluids. 136 (2018) 136–143. doi:10.1016/j.supflu.2018.02.020.
- [10] V.M.B. Cunha, M.P. da Silva, S.H.B. de Sousa, P.N. Bezerra, E.G.O. Menezes, N.J.N. da Silva, D.A.D.S. Banna, M.E. Araújo, R.N. de Carvalho Junior, Bacaba-de-leque

- (*Oenocarpus distichus* Mart.) oil extraction using supercritical CO<sub>2</sub> and bioactive compounds determination in the residual pulp, *J. Supercrit. Fluids*. 144 (2019) 81–90. doi:10.1016/j.supflu.2018.10.010.
- [11] C.G. Pereira, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives, *Food Bioprocess Technol.* 3 (2010) 340–372. doi:10.1007/s11947-009-0263-2.
- [12] AOAC, Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed., Arlington, 1997.
- [13] American Society of Agricultural Engineers (ASAE), Method of determining and expressing particle size of chopped forage materials by screening - Standards S424.1, St. Joseph. MI: ASAE, 1998.
- [14] R. Span, W. Wagner, A new equation of state for carbon dioxide covering the fluid region from the triple-point temperature to 1100 K at pressures up to 800 MPa, *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 25 (1996) 1509–1596. doi:10.1063/1.555991.
- [15] D. Peng, D.B. Robinson, A New Two-Constant Equation of State, *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 15 (1976) 59–64.
- [16] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 299 (1999) 152–178.
- [17] S. Georgé, P. Brat, P. Alter, M.J. Amiot, Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1370–1373. doi:10.1021/jf048396b.
- [18] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C.L.W.T. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT- Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

- [19] C. Sánchez-Moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agric.* 76 (1998) 270–276. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9.
- [20] T.Y. Fan, G.M. Wall, K. Sternitzke, L. Bass, A.B. Morton, E. Muegge, Improved high-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine and its degradation products in ophthalmic solutions Importance of octadecylsilane column choice, *J. Chromatogr. A.* 740 (1996) 289–295.
- [21] E. Takemoto, J. Teixeira Filho, H.T. Godoy, Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV, *Quim. Nova.* 32 (2009) 1189–1194. doi:10.1590/S0100-40422009000500020.
- [22] C.V.S. Padilha, G.A. Miskinis, M.E.A.O. de Souza, G.E. Pereira, D. de Oliveira, M.T. Bordignon-Luiz, M. dos Santos Lima, Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape, *Food Chem.* 228 (2017) 106–115. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.137.
- [23] S. El Deeb, U. Schepers, H. Wätzig, Evaluation of monolithic C18 HPLC columns for the fast analysis of pilocarpine hydrochloride in the presence of its degradation products, *Die Pharm. Int. J. Pharm. Sci.* 61 (2006) 751–756.
- [24] I. Klimczak, A. Gliszczyńska-Świąło, Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C, *Food Chem.* 175 (2015) 100–105. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.104.
- [25] J.R.S. Botelho, N.G. Medeiros, A.M.C. Rodrigues, M.E. Araújo, N.T. Machado, A. Guimarães Santos, I.R. Santos, W. Gomes-Leal, R.N. Carvalho, Black sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds extracts by CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction: Isotherms

- of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects, *J. Supercrit. Fluids*. 93 (2014) 49–55. doi:10.1016/j.supflu.2014.02.008.
- [26] W.A. da Costa, F.W.F. Bezerra, M.S. de Oliveira, E.H. de Aguiar Andrade, A.P.M. dos Santos, V.M.B. Cunha, D.C.S. dos Santos, D.A.D. da S. Banna, E. Teixeira, R.N. de Carvalho Junior, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and transesterification of the residual oil from industrial palm kernel cake with supercritical methanol, *J. Supercrit. Fluids*. 147 (2019) 179–187. doi:10.1016/j.supflu.2018.10.012.
- [27] H. Sovová, Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times, *J. Supercrit. Fluids*. 66 (2012) 73–79. doi:10.1016/j.supflu.2011.11.004.
- [28] J.R.S. Botelho, A.G. Santos, M.E. Araújo, M.E.M. Braga, W. Gomes-Leal, R.N. Carvalho Junior, M.A.A. Meireles, M.S. Oliveira, Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects, *J. Supercrit. Fluids*. 98 (2015) 167–171. doi:10.1016/j.supflu.2014.12.006.
- [29] M.A.R. Salazar, J. V. Costa, G.R.O. Urbina, V.M.B. Cunha, M.P. Silva, P.N. Bezerra, W.B. de S. Pinheiro, W. Gomes-Leal, A.S. Lopes, R.N. de Carvalho Junior, Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction, *J. Supercrit. Fluids*. 138 (2018) 36–45. doi:10.1016/j.supflu.2018.03.022.
- [30] R.N. Carvalho Jr., L.S. Moura, P.T. V. Rosa, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity, *J. Supercrit. Fluids*. 35 (2005) 197–204.
- [31] A.M.A. Dias, A.C.S. da Silva, J.R.S. Botelho, R.N.C. Júnior, H.C. de Sousa, M.E.M. Braga, Temperature and density effects of the scCO<sub>2</sub> extraction of spilanthol from

- Spilanthes acmella* flowers, J. Supercrit. Fluids. 121 (2017) 32–40. doi:10.1016/j.supflu.2016.11.004.
- [32] M.S. de Oliveira, W.A. da Costa, D.S. Pereira, J.R.S. Botelho, M.T.O. A., E.H. de Aguiar Andrade, S.H.M. da Silva, A.P. da S. Sousa Filho, R.N. de Carvalho Junior, The Journal of Supercritical Fluids Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO<sub>2</sub>, J. Supercrit. Fluids. 118 (2016) 185–193.
- [33] H.P. Cornelio-Santiago, C.B. Gonçalves, N.A. De Oliveira, A.L. De Oliveira, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil from green coffee beans : solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling, J. Supercrit. Fluids. 128 (2017) 386–394. doi:10.1016/j.supflu.2017.05.030.
- [34] A.C. de Aguiar, A.P. da Fonseca Machado, C.F.F. Angolini, D.R. de Moraes, A.M. Baseggio, M.N. Eberlin, M.R. Maróstica Junior, J. Martínez, Sequential high-pressure extraction to obtain capsinoids and phenolic compounds from biquinho pepper (*Capsicum chinense*), J. Supercrit. Fluids. 150 (2019) 112–121. doi:10.1016/j.supflu.2019.04.016.
- [35] T.T. Garmus, L.C. Paviani, C.L. Queiroga, F.A. Cabral, Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents, J. Supercrit. Fluids. 99 (2015) 68–75. doi:10.1016/j.supflu.2015.01.016.
- [36] R. Goyeneche, A. Fanovich, C.R. Rodrigues, M.C. Nicolao, K. Discala, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds from radish leaves : Yield, antioxidant capacity and cytotoxicity, J. Supercrit. Fluids. 135 (2018) 78–83. doi:10.1016/j.supflu.2018.01.004.
- [37] H.A. Martinez-Correa, R.G. Bitencourt, A.C.A.V. Kayano, P.M. Magalhães, F.T.M.

- Costa, F.A. Cabral, Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water, *Ind. Crops Prod.* 95 (2017) 535–542. doi:10.1016/j.indcrop.2016.11.007.
- [38] S. Cadena-Carrera, D.P. Tramontin, A. Bella Cruz, R.C. Bella Cruz, J.M. Müller, H. Hense, Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as cosolvent, *J. Supercrit. Fluids.* 152 (2019). doi:10.1016/j.supflu.2019.104543.
- [39] J.M.F. Rodriguez, A.R.C. de Souza, R.L. Krüger, M.C.M. Bombardelli, C.S. Machado, M.L. Corazza, Kinetics, composition and antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa*) root extracts obtained with supercritical CO<sub>2</sub> and co-solvent, *J. Supercrit. Fluids.* 135 (2017) 25–33. doi:10.1016/j.supflu.2017.12.034.
- [40] L. Valadez-Carmona, A. Ortiz-Moreno, G. Ceballos-Reyes, J.A. Mendiola, E. Ibáñez, Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds, *J. Supercrit. Fluids.* 131 (2017) 99–105. doi:10.1016/j.supflu.2017.09.011.
- [41] F.A. Espinosa-Pardo, V.M. Nakajima, G.A. Macedo, J.A. Macedo, J. Martínez, Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using supercritical CO<sub>2</sub> and cosolvents, *Food Bioprod. Process.* 101 (2016) 1–10. doi:10.1016/j.fbp.2016.10.002.
- [42] S.S. Sandhu, I.N. Abreu, C.A. Colombo, P. Mazzafera, Pilocarpine content and molecular diversity in Jaborandi, *Sci. Agric.* 63 (2006) 478–482.
- [43] C.U.B. Pinheiro, Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop, *Econ. Bot.* 51 (1997) 49–58.
- [44] A.C.H.F. Sawaya, Y.D. Costa, P. Mazzafera, Unraveling the Biosynthesis of Pilocarpine in *Pilocarpus microphyllus*, *Nat. Prod. Commun.* 10 (2015) 721–724. doi:10.1177/1934578X1501000506.

- [45] H. Bundgaard, E. Falch, C. Larsen, G.L. Mosher, T.J. Mikkelsen, Pilocarpine prodrugs II. Synthesis, stability, bioconversion, and physicochemical properties of sequentially labile pilocarpine acid diesters, *J. Pharm. Sci.* 75 (1986) 775–783.
- [46] A.H. Akabari, B.N. Suhagia, M.G. Saralai, V.A. Sutariya, Development and Validation of Stability Indicating RP- HPLC Method for Estimation of Fluvastatin Sodium in Bulk and Capsule Dosage Form, *Eurasian J. Anal. Chem.* 12 (2017) 87–105. doi:10.12973/ejac.2017.00156a.
- [47] A. López-Padilla, A. Ruiz-Rodriguez, G. Reglero, T. Fornari, Supercritical carbon dioxide extraction of *Calendula officinalis*: Kinetic modeling and scaling up study, *J. Supercrit. Fluids.* 130 (2017) 292–300. doi:10.1016/j.supflu.2017.03.033.
- [48] E. Langa, J. Cacho, A.M.F. Palavra, J. Burillo, A.M. Mainar, J.S. Urieta, The evolution of hyssop oil composition in the supercritical extraction curve. Modelling of the oil extraction process, *J. Supercrit. Fluids.* 49 (2009) 37–44. doi:10.1016/j.supflu.2008.11.022.
- [49] N. Herzi, S. Camy, J. Bouajila, P. Destrac, M. Romdhane, J. Condoret, The Journal of Supercritical Fluids Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling, *J. Supercrit. Fluids.* 82 (2013) 72–82. doi:10.1016/j.supflu.2013.06.007.
- [50] I. Zizovic, J. Ivanovic, D. Misic, M. Stamenic, S. Djordjevic, J. Kukic-Markovic, S.D. Petrovic, SFE as a superior technique for isolation of extracts with strong antibacterial activities from lichen *Usnea barbata* L., *J. Supercrit. Fluids.* 72 (2012) 7–14. doi:10.1016/j.supflu.2012.07.018.

Table 1 Pilocarpine content, total phenolic compound content, and half-maximal inhibitory concentration of *P. microphyllus* extracts using SC-CO<sub>2</sub> and SC-CO<sub>2</sub> + 10% EtOH.

Samples	Extractions conditions	Cosolvent (EtOH) (%)	Density (kg/m <sup>3</sup> )	Pilocarpine in extract (%)	TPC (mg GAE/g of extract)	AA (EC <sub>50</sub> : g of extract/g of DPPH)
1	40 °C/200 bar	0	839.81	0.2221±0.002 <sup>h</sup>	73.13±0.96 <sup>e</sup>	1546.75±2.75 <sup>e</sup>
2	40 °C/290 bar	0	904.33	0.4108±0.002 <sup>f</sup>	65.50±2.66 <sup>e</sup>	1917.25±3.81 <sup>d</sup>
3	40 °C/420 bar	0	963.79	0.6740±0.001 <sup>c</sup>	66.64±2.45 <sup>e</sup>	1822.14±9.54 <sup>d</sup>
4	60 °C/200 bar	0	723.68	0.7183±0.017 <sup>c</sup>	65.05±2.85 <sup>e</sup>	2260.87±8.86 <sup>c</sup>
5	60 °C/290 bar	0	822.06	0.3026±0.001 <sup>g</sup>	64.86±3.32 <sup>e</sup>	2689.88±1.02 <sup>a</sup>
6	60 °C/420 bar	0	899.61	0.4099±0.001 <sup>f</sup>	74.22±0.88 <sup>e</sup>	2444.27±8.83 <sup>b</sup>
7	40 °C/200 bar	10	884.46	0.4679±0.001 <sup>e</sup>	104.42±2.75 <sup>c</sup>	731.84±3.20 <sup>i</sup>
8	40 °C/290 bar	10	931.66	0.5347±0.001 <sup>d</sup>	97.91±0.40 <sup>cd</sup>	1081.36±8.35 <sup>gh</sup>
9	40 °C/420 bar	10	978.41	0.8263±0.001 <sup>b</sup>	89.99±0.73 <sup>d</sup>	929.24±7.03 <sup>h</sup>
10	60 °C/200 bar	10	807.36	0.3287±0.001 <sup>g</sup>	140.38±0.95 <sup>b</sup>	1302.12±20.42 <sup>f</sup>
11	60 °C/290 bar	10	878.31	0.5174±0.002 <sup>d</sup>	172.00±1.00 <sup>a</sup>	1094.99±23.34 <sup>g</sup>
12	60 °C/420 bar	10	973.14	2.3702±0.021 <sup>a</sup>	173.67±1.50 <sup>a</sup>	1178.91±11.77 <sup>fg</sup>

\*Mean ± Standard Deviation



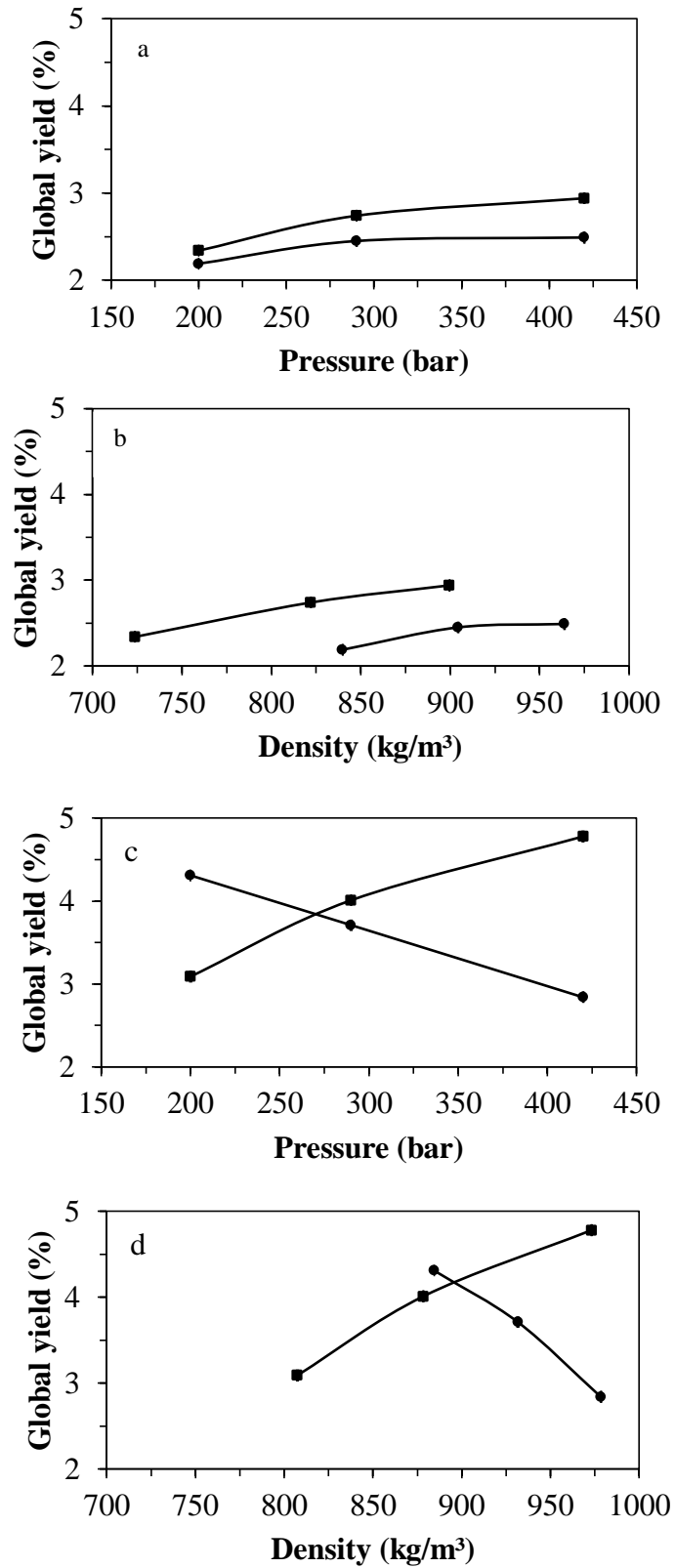


Fig. 1 *P. microphyllus* global yield isotherms with CO<sub>2</sub> (a,b) and with CO<sub>2</sub> + 10 % EtOH (c,d). Values expressed as dry basis, (●) 40 °C e (■) 60 °C.

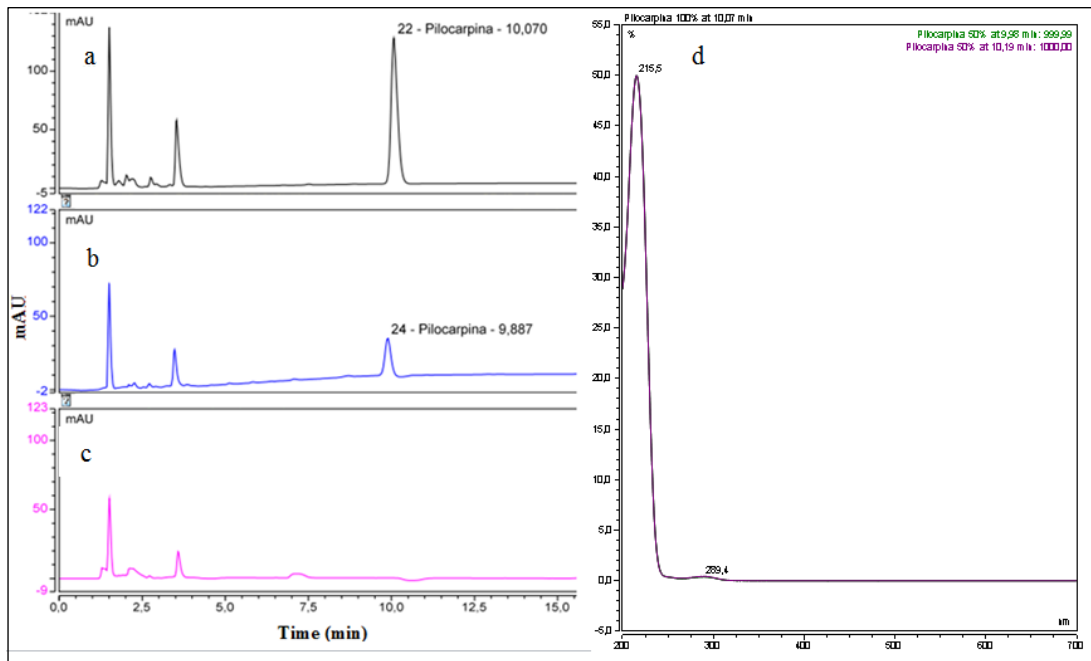


Fig. 2 Chromatograms of standard (a), sample (b), mobile phase (c), standard and sample pilocarpine spectra overlaid (d).

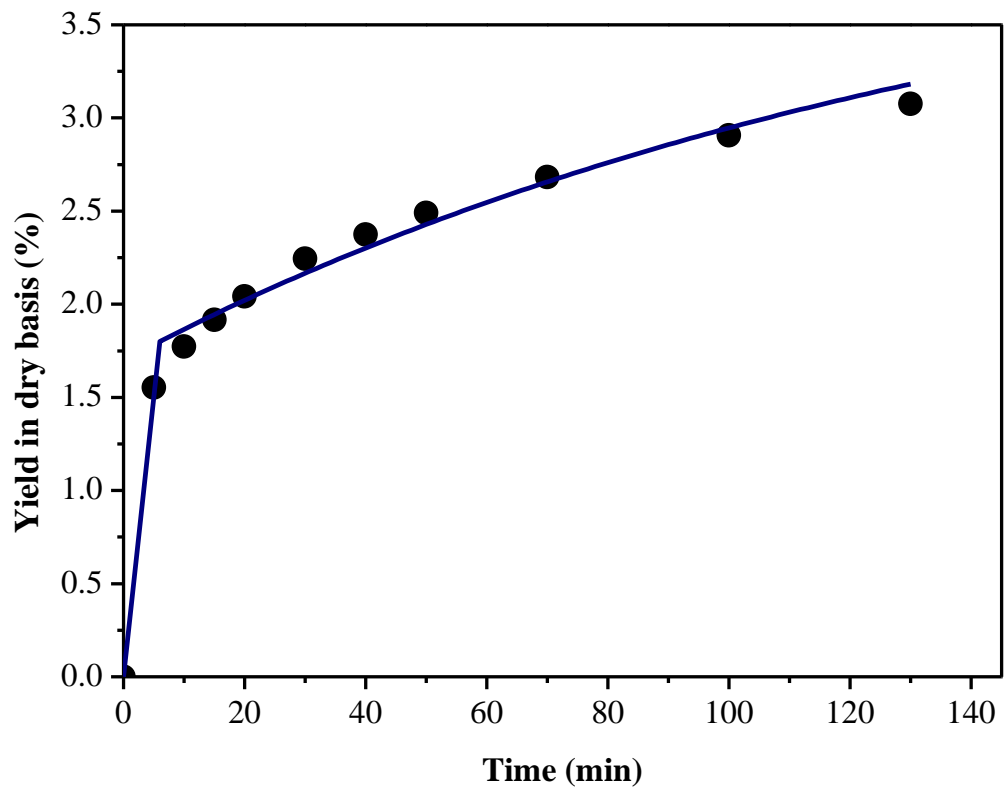


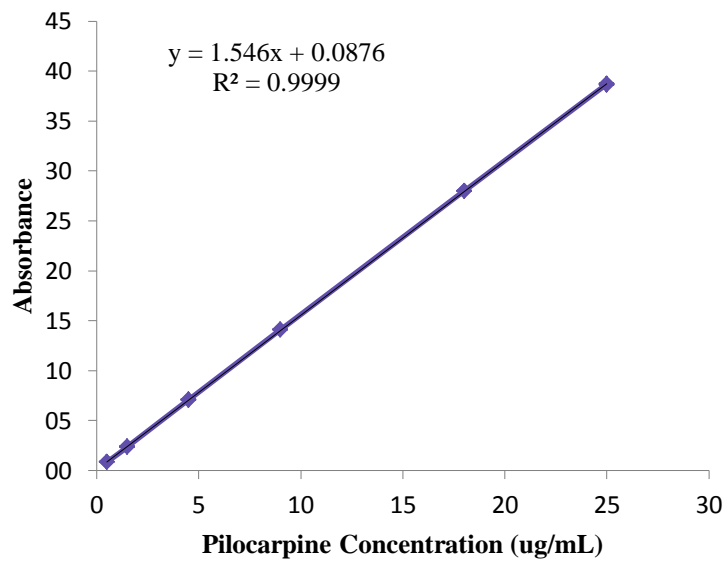
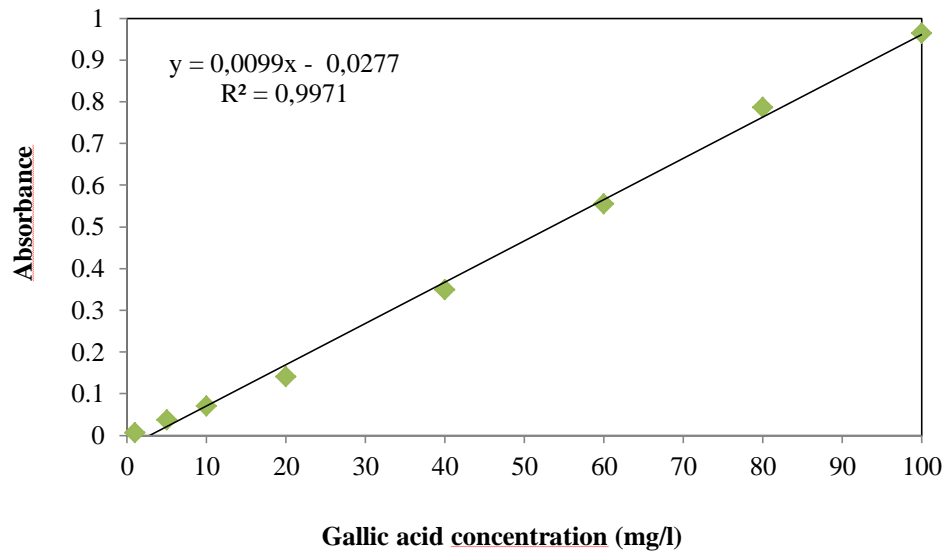
Fig. 3. Kinect SFE data obtained in 60°C/420 bar with CO<sub>2</sub> + 10% EtOH and the mathematical modeling, (●) Experimental, (—) Sovová (2012).

**S1. *P. microphyllus* extract global yield with supercritical CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> + EtOH**

Temperature (°C)	Pressure (bar)	Mixture Density	Yield
		(kg/m <sup>3</sup> )	(%)
<b>SFE – CO<sub>2</sub></b>			
40	200	839.81	2.19±0.11 <sup>d</sup>
	290	904.33	2.45±0.32 <sup>cd</sup>
	420	963.79	2.49±0.31 <sup>cd</sup>
60	200	723.68	2.34±0.07 <sup>d</sup>
	290	822.06	2.74±0.06 <sup>bcd</sup>
	420	899.61	2.94±0.22 <sup>bcd</sup>
<b>SFE – CO<sub>2</sub>+10%EtOH</b>			
40	200	884.46	4.31±0.06 <sup>ab</sup>
	290	931.66	3.71±0.36 <sup>abcd</sup>
	420	978.41	2.84±0.32 <sup>bcd</sup>
60	200	807.36	3.09±0.44 <sup>bcd</sup>
	290	878.31	4.01±0.28 <sup>abc</sup>
	420	973.14	4.78±0.38 <sup>a</sup>

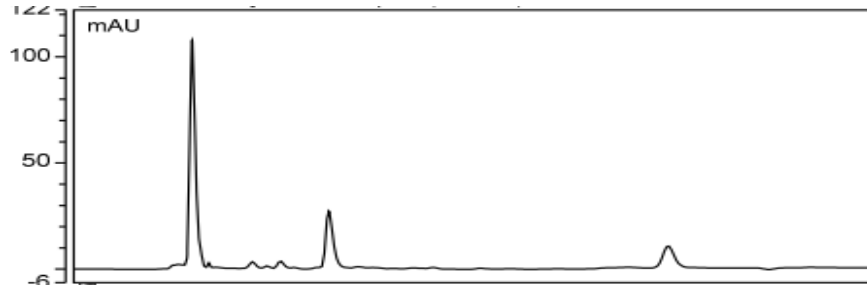
\*Mean ± Standard Deviation

S2. Calibration curve: (a) total phenolic compounds and (b) pilocarpine.

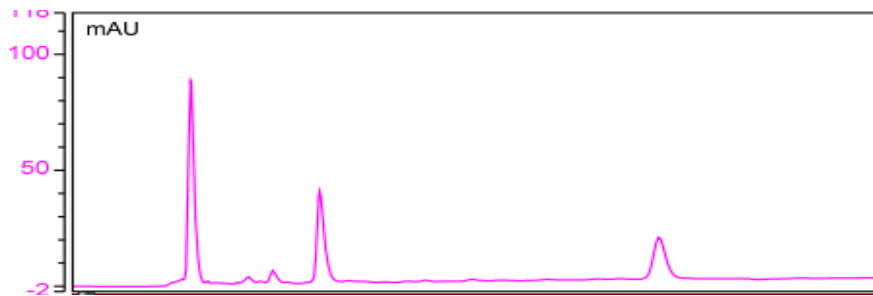


**S3.** Chromatograms of Pilocarpine identified in the different extractions of *P. microphyllus* obtained with supercritical CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> + EtOH.

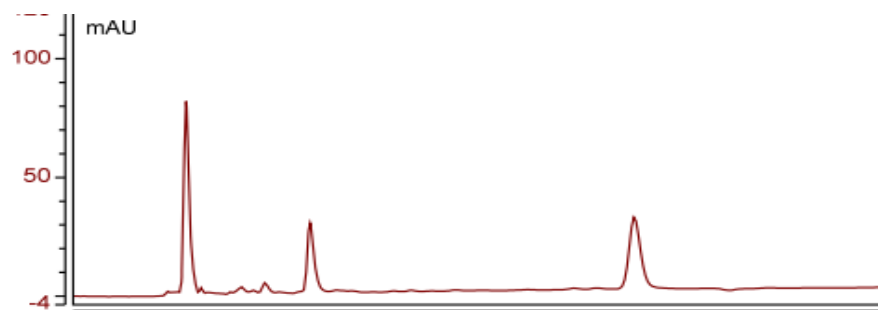
40 °C/200 bar with CO<sub>2</sub>



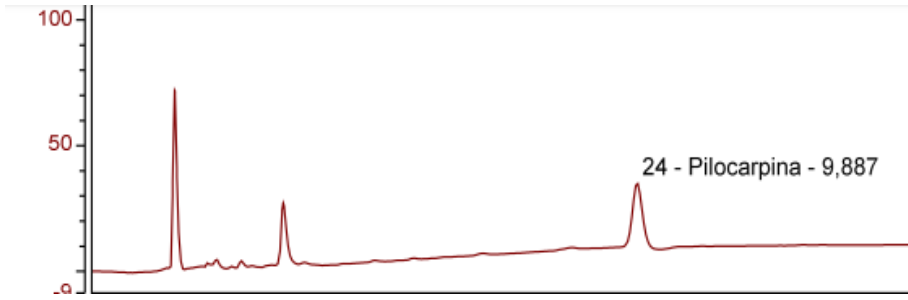
40 °C/290 bar with CO<sub>2</sub>



40 °C/420 bar with CO<sub>2</sub>



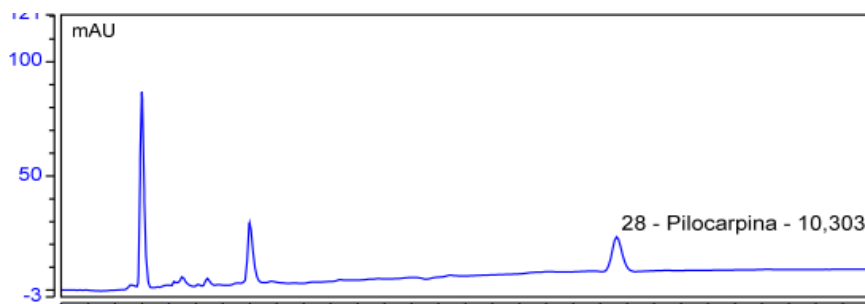
60 °C/200 bar with CO<sub>2</sub>



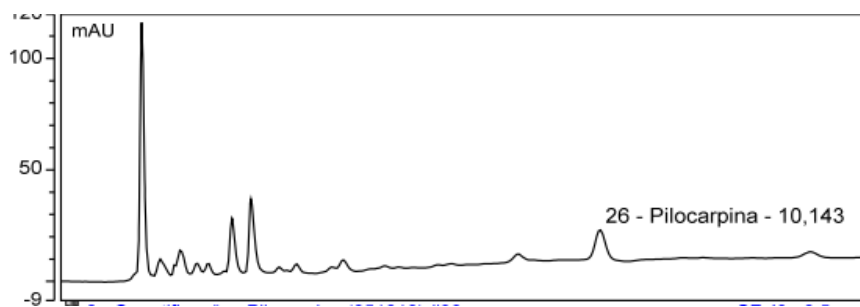
60 °C/290 bar with CO<sub>2</sub>



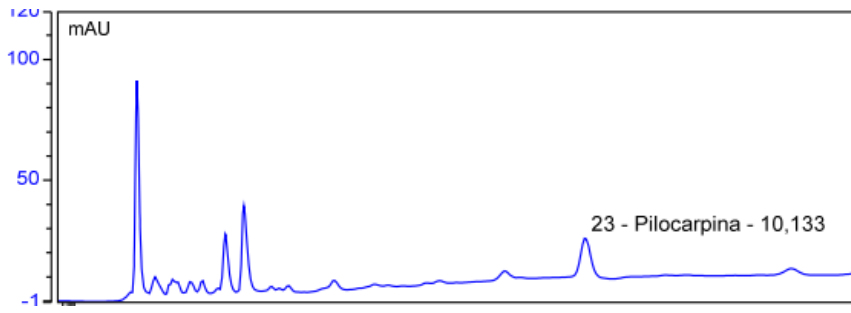
60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub>



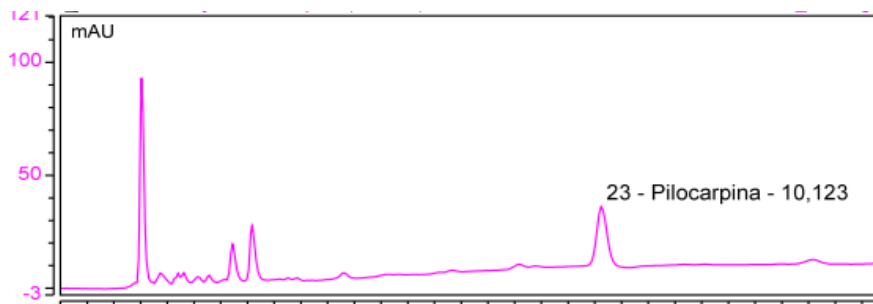
40 °C/200 bar with CO<sub>2</sub> + EtOH



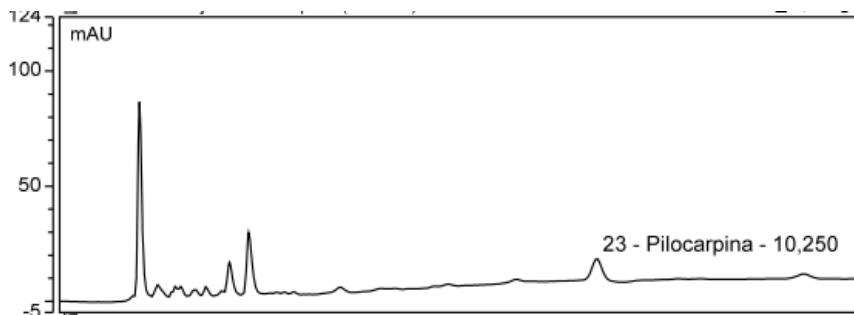
40 °C/290 bar with CO<sub>2</sub> + EtOH



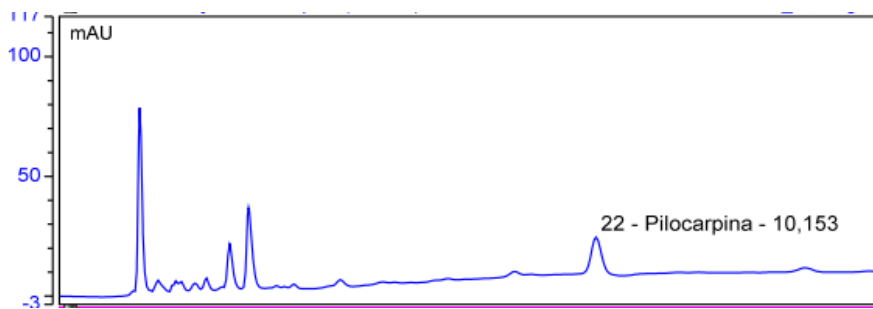
40 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + EtOH



60 °C/200 bar with CO<sub>2</sub> + EtOH

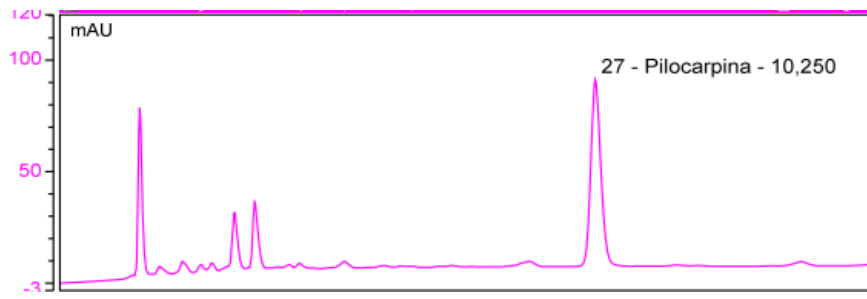


60 °C/290 bar with CO<sub>2</sub> + EtOH





60 °C/420 bar with CO<sub>2</sub> + EtOH



## 7 ANEXO I - ARTIGOS E CAPÍTULOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO:

- **Artigos publicados:**

Salazar, M. A. R., Costa, J. V., Urbina, G. R. O., Cunha, V. M. B., Silva, M. P., **do Nascimento Bezerra, P.**, ... & Junior, R. C. (2018). Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 138, 36-45.

Fernanda W.F. Bezerra, **Priscila do N. Bezerra**, Mozaniel S. de Oliveira, Wanessa A. da Costa, Gracialda C. Ferreira, Raul N. de Carvalho Jr. (2018). Bioactive Compounds and Biological Activity of Croton Species (Euphorbiaceae): An Overview. *Current Bioactive Compounds*.

Costa, W. A., Bezerra, F. W. F., Oliveira, M. S., **Bezerra, P. N.**, Pires, F. C. S., Silva, A. P. S., ... & Junior, R. C. (2018). Obtainment, Applications and Future Perspectives of Palm Kernel. *Journal of Science and Technology*.

Cunha, V. M. B., Silva, M. P., Sousa, S. H. B., **Bezerra, P. N.**, Menezes, E. G. O., Silva, N. J. N., Banna, D. A. D. S., Araújo, M. E., Carvalho, R. N. Bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart.) oil extraction using supercritical CO<sub>2</sub> and bioactive compounds determination in the residual pulp. (2018). *The Journal of Supercritical Fluids*.

SILVA, MARCILENE P. ; CUNHA, VANIA MARIA B. ; SOUSA, SÉRGIO HENRIQUE B. ; MENEZES, EDUARDO G. ORTIZ ; **BEZERRA, PRISCILA DO NASCIMENTO** ; FARIAS NETO, JOÃO T. DE ; FILHO, GERALDO N.R. ; ARAÚJO, MARILENA E. ; CARVALHO JR., RAUL N. DE . Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lyophilized Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp oil from three municipalities in the state of Pará, Brazil. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, v. 31, p. 226-234, 2019.

- **Capítulos de livro publicados:**

Pires, F. C. S., Almeida, M. M., Silva, A. P. S., Salazar, M. A. R., Urbina, G. R. O., Silva, P. S., **do Nascimento Bezerra, P.**, ... & Junior, R. C. (2017). Therapeutic potential of extracts from Amazonian plants with antimicrobial activity. *IntechOpen*.

Silva, A. P. S., Pires, F. C. S., Salazar, M. A. R., **do Nascimento Bezerra, P.**, Urbina, G. R. O., ... & Junior, R. C. (2018). Therapeutic potential of fat acids in diseases treatments and preventions. *IntechOpen*.

de los Angeles Rodriguez Salazar, Marielba; Rafael Olivo Urbina, Glides; **do Nascimento Bezerra, Priscila**; Maria Borges Cunha, Vânia ; Paiva da Silva, Marcilene; Cristina Seabra Pires, Flávia; Paula de Souza e Silva, Ana; Henrique Brabo de Sousa, Sérgio; Nunes de Carvalho Jr, Raul. Antioxidant and Biological Activity of Cissus sicyoides and Rosmarinus officinalis Extracts. Antioxidants [Working Title]. 1ed.: *IntechOpen*, 2019, v. , p. 1-.

Oliveira, Mozaniel Santana de; Costa, Wanessa Almeida da; **Bezerra, Priscila Nascimento**; Filho, Antonio Pedro da Silva Souza; Junior, Raul Nunes de Carvalho. Potentially Phytotoxic of Chemical Compounds Present in Essential Oil for Invasive Plants Control: A Mini-Review. In: IntechOpen. (Org.). Biological Approaches for Controlling Weeds. 1ed.London: *InTech*, 2018, v. 1, p. 49-62

Silva, Ana Paula de Souza e; Lima, Cinthya Elen Pereira de; Menezes, Eduardo Gama Ortiz; Salazar, Marielba de Los Angeles Rodriguez; Urbina, Glides Rafael Olivo; **Bezerra, Priscila do Nascimento**; Bezerra, Fernanda Wariss Figueiredo; Ferreira, Maria Caroline Rodrigues; Carvalho, Antônio Robson Batista de; Pires, Flávia Cristina Seabra; Sarges, Pedro Alam de Araújo ; Carvalho Junior, Raul Nunes de. Predição da solubilidade de constituintes do óleo de jambu em co2 supercrítico, utilizando contribuição de grupos e equações de estado. A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde 2. 1ed.: *Atena Editora*, 2019, v. , p. 305-314.