

ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS  
DOUTORADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

CRISTINA LORENSKI FERREIRA

**EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO CARDANOL A PARTIR DO LÍQUIDO DA CASCA DA  
CASTANHA DE CAJU E SUA INCORPORAÇÃO EM MATRIZ DE PLGA: MODELAGEM  
MATEMÁTICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA**

Porto Alegre

2022

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul



**EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO CARDANOL A PARTIR DO LÍQUIDO  
DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU E SUA INCORPORAÇÃO EM  
MATRIZ DE PLGA: MODELAGEM MATEMÁTICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE CITOTÓXICA**

**CRISTINA LORENSKI FERREIRA**  
QUÍMICA LICENCIATURA E INDUSTRIAL  
MESTRA EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre**  
**Agosto, 2022**

## Ficha Catalográfica

F383e Ferreira, Cristina Lorenski

Extração Supercrítica do Cardanol a partir do Líquido da Casca da Castanha de caju e sua Incorporação em matriz de PLGA : Modelagem Matemática e Avaliação da Atividade Citotóxica / Cristina Lorenski Ferreira. – 2022.

151 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas.

1. Cardanol. 2. Extração supercrítica. 3. Modelagem matemática. 4. Solubilidade do cardanol em CO<sub>2</sub>. 5. Atividade citotóxica. I. Vargas, Rubem Mário Figueiró. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051



**Extração supercrítica do cardanol a partir do líquido da casca da castanha de caju e sua incorporação em matriz de PLGA: modelagem matemática e avaliação da atividade citotóxica**

**CANDIDATA: CRISTINA LORENSKI FERREIRA**

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

*Rubem Mário F. Vargas*

**DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - ORIENTADOR**

**BANCA EXAMINADORA**

*Gilsane Lino von Poser*

**DRA. GILSANE LINO VON POSER - DA FACULDADE DE FARMÁCIA - UFRGS**

*Fernando Mendonça Diz*

**DR. FERNANDO MENDONÇA DIZ - INSTITUTO DO CÉREBRO - PUCRS**

*Eduardo Cassel*

**DR. EDUARDO CASSEL - PGETEMA - PUCRS**

*“Quando a situação for boa, desfrute-a. Quando a situação for ruim, transforme-a. Quando a situação não puder ser transformada, transforme-se.”  
(Viktor Frankl)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu marido, Felipe, aos meus pais, Dirceu e Helena, e a minha irmã, Andreza. Obrigada pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Rubem Vargas e à Professora Nara Basso, meus orientadores, exemplos de profissionais e seres humanos. Agradeço por todo incentivo, apoio e por me orientarem com competência e carinho. Ao Professor Eduardo Cassel, por me encorajar a enfrentar os desafios e a acreditar no meu potencial.

Ao Rafael Nolibos, pelo conhecimento compartilhado e por tantas contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Às Professoras Aline Lucas e Gilsane Poser e ao Rodrigo Scopel, pelas valorosas contribuições para a elaboração deste trabalho.

Ao Fernando Diz e à Thuany Maraschini, pela amizade, incentivo e contribuições essenciais para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Operações Unitárias, pelas importantes colaborações: Guilherme Evaldt, Raiane Gonçalves, Charles Bartolomeu, Victor Rodrigues, Pedro Tondo, Bruna Sgarioni, Leandro Martins, Arthur Cavassa, Luane Angeli e Raul Filho.

À CAPES pela bolsa de estudo.

Finalmente, ao meu amado marido Felipe A. Linhares, pelo amor e companheirismo, estando ao meu lado em todos os momentos. Aos meus pais, Dirceu da S. Ferreira e Helena L. Ferreira e à minha irmã, Andreza L. Ferreira, pelo amor e por estarem sempre presentes. Aos meus sobrinhos, Artur F. Peixoto e Natan F. Peixoto, pela alegria que me proporcionam. Ao meu cunhado, Junior B. Peixoto, e à minha dinda, Terezinha Lorenski, pelo apoio e carinho. À Fernanda Borges, pela preciosa amizade.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>6</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>15</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>17</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	<b>18</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>20</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	25
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>27</b>
3.1. Líquido da casca da castanha de caju .....	27
3.2. Extração supercrítica com CO <sub>2</sub> .....	33
3.3. Cardanol .....	36
3.4. Extração de Cardanol com CO <sub>2</sub> supercrítico .....	38
3.5. Modelagem matemática .....	39
3.5.1. Equilíbrio líquido-vapor (ELV) .....	40
3.5.2. Modelagem matemática da transferência de massa .....	41
3.6. Terapias no tratamento do Câncer .....	45
3.6.1. Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) .....	47
3.6.1.1. Mecanismos de liberação de fármacos baseados em PLGA .....	49
3.6.1.2. <i>Scaffold</i> de PLGA: aplicação na terapia do Câncer .....	51
3.6.2. Propriedades anticâncer do LCC e do Cardanol .....	52
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
4.1. Materiais .....	56
4.2. Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico no vaso de alta pressão .....	57
4.3. Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico no equipamento em escala piloto .....	59



4.3.1. Etapa 1: Varredura de pressão e varredura de temperatura .....	61
4.3.2. Etapa 2: Estratégia para a construção das curvas de extração .....	61
4.3.3. Etapa 3: Metodologia de superfície de resposta com planejamento Box- Behnken .....	62
<b>4.4. Cálculo da solubilidade do Cardanol em CO<sub>2</sub> supercrítico .....</b>	<b>64</b>
4.4.1. Equilíbrio de fases a alta pressão .....	64
4.4.2. Modelagem termodinâmica do equilíbrio líquido-vapor .....	66
<b>4.5. Transferência de massa .....</b>	<b>67</b>
<b>4.6. Técnicas de caracterização dos extratos .....</b>	<b>69</b>
4.6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	69
4.6.2. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) ...	69
4.6.3. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) .....	70
4.6.4. Ensaio <i>in Vitro</i> .....	70
4.6.4.1. Cultura e manutenção das células .....	71
4.6.4.2. Preparação das amostras .....	71
4.6.4.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT) .....	72
4.6.4.4. Determinação dos valores de IC <sub>50</sub> .....	73
4.6.4.5. Análise estatística .....	73
<b>4.7. Filmes biodegradáveis de PLGA .....</b>	<b>73</b>
4.7.1. Preparação dos filmes biodegradáveis de PLGA .....	73
4.7.2. Ensaio de liberação do Cardanol a partir da matriz de PLGA .....	75
4.7.2.1. Cinética de liberação do Cardanol a partir da matriz de PLGA .....	76
4.7.3. Técnicas de caracterização dos filmes biodegradáveis de PLGA .....	77
4.7.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV- FEG) .....	77
4.7.3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	77
4.7.3.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	77
4.7.3.4. Determinação do ângulo de contato .....	78
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>5.1. Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico .....</b>	<b>79</b>
5.1.1. Rendimento das extrações e pureza dos extratos .....	79
5.1.1.1. Extração no vaso de alta pressão .....	80

5.1.1.2. Extração no equipamento em escala piloto .....	83
5.1.2. Metodologia de superfície de resposta com planejamento Box-Behnken ..	87
<b>5.2. Equilíbrio de fases a alta pressão .....</b>	<b>92</b>
<b>5.3. Modelagem matemática .....</b>	<b>95</b>
<b>5.4. Técnicas de caracterização dos extratos .....</b>	<b>97</b>
5.4.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) ...	97
5.4.2. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) .....	101
5.4.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT) .....	103
<b>5.5. Filmes biodegradáveis de PLGA .....</b>	<b>110</b>
5.5.1. Filmes biodegradáveis de PLGA preparados .....	110
5.5.2. Ensaio de liberação .....	111
5.5.3. Técnicas de caracterização dos filmes biodegradáveis de PLGA .....	117
5.5.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV- FEG) .....	117
5.5.3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	120
5.5.3.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	123
5.5.3.4. Determinação do ângulo de contato .....	125
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>129</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>132</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>134</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.	(A) Cajueiro, <i>Anacardium occidentale</i> L.; (B) Caju; (C) Cascas da castanha de caju (Kumar et al., 2018). ....	27
Figura 3.2.	Estruturas químicas dos constituintes do LCC (Caillol, 2018). ....	28
Figura 3.3.	Reação de descarboxilação do ácido anacárdico (Adaptada de Mazzeto e Lomonaco, 2009). ....	29
Figura 3.4.	Representação esquemática do processo de extração por fluido supercrítico: 1- Cilindro de CO <sub>2</sub> , 2- Bomba de alta pressão, 3- Vaso de extração, 4- Agitador magnético, 5- Vaso separador (Adaptada de Cassel et al., 2008). ....	34
Figura 3.5.	Estruturas químicas do cardanol diferindo pelo grau de instauração da cadeia alifática (Fonte: autora). ....	37
Figura 3.6.	Estrutura do PLGA: x é o número de unidades de ácido láctico e y, o número de unidades de ácido glicólico (Fonte: autora). ....	47
Figura 3.7.	Reação de hidrólise do PLGA (Fonte: autora). ....	50
Figura 3.8.	Curvas de liberação de fármaco, <i>in vivo</i> , para PLGA 50:50, 65:35, 75:25 e 85:15. PLGA 65:35 significa 65% de ácido láctico e 35% de ácido glicólico (Makadia e Siegel, 2011). ....	50
Figura 4.1.	Esquema representativo das etapas do trabalho. ....	55
Figura 4.2.	Fluxograma da célula de alta pressão. 1- Cilindro de CO <sub>2</sub> ; 2- Bomba termostática; 3- Vaso de alta pressão; 4- Agitador magnético; 5- Vaso de expansão; TT- Transmissor de temperatura; CT- Controlador de temperatura; IP- indicador de pressão. ....	57
Figura 4.3.	Célula de alta pressão. ....	58
Figura 4.4.	Diagrama simplificado do processo de extração supercrítica. ....	60
Figura 4.5.	Fluxograma da célula de equilíbrio de fases de alta pressão. SC – Cilindro de CO <sub>2</sub> ; CO – cooler; SP – bomba de seringa; EC – célula de equilíbrio; MV – válvula de agulha; SV – válvula de esfera; TT – transmissor de temperatura; TC – controlador de temperatura; PI – transmissor de pressão. ....	65

Figura 4.6.	Esquema representativo do preparo das amostras. ....	72
Figura 4.7.	Reação de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) (Adaptada de Stockert et al., 2012). ....	72
Figura 4.8.	Curva padrão de cardanol. ....	75
Figura 5.1.	Cromatograma de CLAE da mistura de cardanóis isolados a partir do LCC técnico (Costa et al., 2019). ....	79
Figura 5.2.	Cromatograma de CLAE do LCC técnico utilizado nesta tese. ....	80
Figura 5.3.	Cromatograma de CLAE do extrato obtido a 80 bar e 35 °C. ....	82
Figura 5.4.	Cromatograma de CLAE do extrato obtido a 120 bar e 55 °C. ....	84
Figura 5.5.	Cromatograma de CLAE do extrato obtido a 150 bar e 55 °C. ....	85
Figura 5.6.	Cromatograma de CLAE do extrato obtido a 150 bar e 50 °C. ....	87
Figura 5.7.	Superfície de resposta do teor de cardanol no LCC ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ): A) temperatura versus pressão, com vazão de solvente fixado no nível médio; B) vazão de solvente versus pressão, com temperatura fixada no nível médio; C) vazão de solvente versus temperatura, com pressão fixada no nível médio. ....	90
Figura 5.8.	ELV isotérmico para o sistema CO <sub>2</sub> (1)/ Cardanol (2) a 40 °C (○), 50 °C (□) e 60 °C (△)Dados Experimentais; (-) Peng-Robinson EOS. ....	94
Figura 5.9.	Curva de extração do cardanol a partir do LCC técnico a 50 °C e 150 bar (o) dados experimentais; (-) modelo matemático. ....	96
Figura 5.10.	A) Cromatograma do extrato obtido na condição 50 °C /150 bar a uma razão massa/carga de 108. B) Espectro de massas correspondente ao pico cromatográfico do cardanol com tempo de retenção de 26,537 min. ....	98
Figura 5.11.	Cromatograma do LCC técnico comercial a uma razão massa/carga de 108. ....	99
Figura 5.12.	Cromatograma do cardanol padrão comercial a uma razão massa/carga de 108. ....	100
Figura 5.13.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da região dos aromáticos e dos alcenos do extrato rico em cardanol. ....	102

- Figura 5.14. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da região dos aromáticos e dos alcenos do cardanol padrão comercial. ....102
- Figura 5.15 Resultados do ensaio para a linhagem M059J (glioblastoma): (A) Efeito do cardanol na viabilidade celular por meio do ensaio MTT, após 24h, \*\*\*  $p < 0,001$ ; (B)  $\text{IC}_{50}$  do cardanol, após 24 h, na viabilidade celular; (C) Morfologia das células do grupo controle; (D) Morfologia das células em DMSO; (E, F, G, H) Morfologia das células tratadas com cardanol nas concentrações 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. ....104
- Figura 5.16. Resultados do ensaio para a linhagem T24 (células de câncer de bexiga): (A) Efeito do cardanol na viabilidade celular por meio do ensaio MTT, após 24h, \*\*\*  $p < 0,001$ ; (B)  $\text{IC}_{50}$  do cardanol, após 24 h, na viabilidade celular; (C) Morfologia das células de controle; (D) Morfologia das células em DMSO; (E, F, G, H) Morfologia das células tratadas com cardanol nas concentrações 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. ....105
- Figura 5.17. Resultados do ensaio para a linhagem Vero (células saudáveis): (A) Efeito do cardanol na viabilidade celular por meio do ensaio MTT, após 24h, \*\*\*  $p < 0,001$ ; (B)  $\text{IC}_{50}$  do cardanol, após 24 h, na viabilidade celular; (C) Morfologia das células de controle; (D) Morfologia das células em DMSO; (E, F, G, H) Morfologia das células tratadas com cardanol nas concentrações 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. ....106
- Figura 5.18. Mapa de toxicidade do cardanol frente às linhagens M059J, Vero e T24. O mapa apresenta o perfil de toxicidade frente às linhagens provocada por diferentes concentrações de cardanol e o  $\text{IC}_{50}$  do cardanol na viabilidade das linhagens, após 24 h. ....107
- Figura 5.19. Imagens dos filmes biodegradáveis preparados: (A) F\_puro; (B) F\_710; (C) F\_1430 e (D) F\_2860. ....110
- Figura 5.20. Aplicação do modelo analítico de Peppas (1985) para os dados experimentais (Exp) de liberação de cardanol a partir da matriz de PLGA em A) 55 h de ensaio e B) 10 h de ensaio, a fim de avaliar com mais clareza o perfil de liberação inicial do cardanol a partir dos filmes F\_710 e F\_1430. ....112
- Figura 5.21. Imagens de MEV-FEG dos filmes biodegradáveis de PLGA preparados: (A) F\_puro; (B) F\_710; (C) F\_1430 e (D) F\_2860. ....118
- Figura 5.22. Esquema representativo do fenômeno “*breath figure*” (Adaptado de Ponnusamy et al., 2012). ....119

Figura 5.23.	FTIR do LCC Comercial, do Cardadol Padrão e do Cardanol Extrato. ....	121
Figura 5.24.	FTIR do Cardanol Extrato e dos filmes de PLGA puro e com cardanol incorporado (F_puro, F_710, F_1430 e F_2860). ....	122
Figura 5.25.	Ligação de Hidrogênio entre o grupo hidroxila do cardanol e o grupo carboxil do PLGA. ....	123
Figura 5.26.	Curvas de DSC dos filmes: F_puro; F_710; F_1430 e F_2860 (segundo ciclo de aquecimento). ....	124
Figura 5.27.	Imagens do ângulo de contato de uma gota de água deionizada na superfície de: (A) F_puro, 78,6°; (B) F_710, 84,7°; (C) F_1430, 85,7°; (D) F_2860, 86,7°. ....	126

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Composição química do LCC técnico (Costa et al., 2019). ....	30
Tabela 4.1.	Lista de materiais utilizados. ....	56
Tabela 4.2.	Planejamento experimental Box-Behnken para as variáveis independentes para a extração de cardanol do LCC por fluido supercrítico. ....	63
Tabela 4.3.	Dados do experimento de ELV para o CO <sub>2</sub> (1)/ Cardanol (2). ....	67
Tabela 4.4.	Identificação dos filmes preparados. ....	74
Tabela 4.5.	Valores do expoente n para a equação de Peppas (1985) e o mecanismo de liberação para diferentes geometrias. ....	76
Tabela 5.1.	Dados da extração supercrítica no vaso de alta pressão. ....	81
Tabela 5.2.	Dados da extração supercrítica no equipamento em escala piloto a temperatura constante de 55 °C e vazão de CO <sub>2</sub> de 1000 g/h. ....	83
Tabela 5.3.	Dados da extração supercrítica no equipamento em escala piloto a pressão constante de 150 bar e vazão de CO <sub>2</sub> de 1000 g/h. ....	86
Tabela 5.4.	Resultados do planejamento de experimento por Box-Behnken no processo de extração de cardanol por fluido supercrítico do LCC. ....	88
Tabela 5.5.	Análise de variância para o teor de cardanol no LCC ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ). ....	89
Tabela 5.6.	Dados do experimento de equilíbrio líquido–vapor a 40 °C. ....	93
Tabela 5.7.	Dados do experimento de equilíbrio líquido–vapor a 50 °C. ....	93
Tabela 5.8.	Dados do experimento de equilíbrio líquido–vapor a 60 °C. ....	94
Tabela 5.9.	Parâmetros de interação binária ( $k_{ij}$ , $n_{ij}$ ) à temperatura (T) e desvio absoluto médio das pressões (DAMP). ....	95
Tabela 5.10.	Parâmetros estimados e coeficientes de transferência de massa para EFS. ....	96

Tabela 5.11.	Valores dos parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando a equação de Peppas (1985) para os filmes contendo cardanol. O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra de filme. ....	114
Tabela 5.12.	Dados calorimétricos das amostras obtidos a partir das curvas de DSC. ....	124
Tabela 5.13.	Medidas do ângulo de contato entre a interface filme-água. ....	126
Tabela 5.14.	Classificação da superfície em função do ângulo de contato ( $^{\circ}$ ). ....	127



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EFS	Extração com Fluido Supercrítico
ELV	Equilíbrio líquido-vapor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Fourier Transformed Infrared Spectroscopy</i>
LABMAG	Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear
LAFAP	Laboratório de Farmacologia Aplicada
LCC	Líquido da casca da castanha de caju
LOPE	Laboratório de Operações Unitárias
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico
OF	Função objetivo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLA	Poli (ácido láctico)
PR-EOS	Equação de estado de Peng-Robinson
RMN <sup>1</sup> H	Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SFB	Soro Fetal Bovino
vdW2	Regra de mistura de van der Waals com dois parâmetros de interação binária

## LISTA DE SÍMBOLOS

t	Tempo	s
$v$	Volume molar	$\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$
R	Constante dos gases	$\text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
a	Parâmetro da PR-EOS	
b	Parâmetro da PR-EOS	
k	Constante cinética (Eq. 3.4)	
$q_{rs}$	Concentração de oleorresina deixada na partícula vegetal	$\text{kg m}^{-3}$
n	Número inteiro (Eq. 3.6)	
r	Variável radial	m
D	Coeficiente de difusão do soluto na esfera	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
q	Concentração do soluto restante na esfera (Eq. 3.6)	$\text{kg m}^{-3}$
$q_0$	Concentração inicial do material extraível	$\text{kg m}^{-3}$
$\epsilon$	Porosidade do leito	
V	Volume do extrator	$\text{m}^3$
c	Concentração do extrato na fase fluida	$\text{kg m}^{-3}$
q	Concentração do extrato na fase sólida (Eq. 3.7 e 3.8)	$\text{kg m}^{-3}$
u	Velocidade superficial do solvente	$\text{m s}^{-1}$
$A_p$	Superfície total das partículas	$\text{m}^2$
$q^*$	Concentração na interface fluido-sólido em equilíbrio com a fase fluida	$\text{kg m}^{-3}$
h	Coordenada espacial ao longo da leito	m
K	Coeficiente de transferência de massa interna (Eq. 3.8)	$\text{m s}^{-1}$
C	Fração mássica do soluto	
$C_{inf}$	Quantidade total de soluto presente no sólido	kg
K	Constante de velocidade (Eq. 3.9)	
T	Temperatura	K
P	Pressão	Pa

F	Vazão mássica de solvente	kg s <sup>-1</sup>
M <sub>w</sub>	Massa molar	g mol <sup>-1</sup>
T <sub>c</sub>	Temperature crítica	K
T <sub>b</sub>	Temperatura de ebulição	K
P <sub>c</sub>	Pressão crítica	Pa
w	Fator acêntrico	
P <sub>calc</sub>	Pressão calculada	Pa
P <sub>exp</sub>	Pressão experimental	Pa
N <sub>p</sub>	Número de pontos experimentais	
e	Rendimento de extração	kg(ext) kg(sól) <sup>-1</sup>
K	Coeficiente de partição (Eq. 4.6)	
x <sub>u</sub>	Concentração nas partículas sólidas intactas	kg(sol) kg(sól) <sup>-1</sup>
C <sub>1</sub>	Constante do modelo	
C <sub>2</sub>	Constante do modelo	
q <sub>c</sub>	Quantidade relativa do solvente na transição	kg(sol) kg(sól) <sup>-1</sup>
q	Quantidade relativa do solvente (Eq. 4.6 e 4.7)	kg(sol) kg(sól) <sup>-1</sup>
γ	Razão solvente-matriz do leito	kg(sol) kg(sól) <sup>-1</sup>
r	Eficiência de disponibilidade do soluto	
Q	Vazão do solvente	kg s <sup>-1</sup>
N <sub>m</sub>	Carga do sólido insolúvel	kg
a <sub>s</sub>	Área específica entre as regiões de células intactas e quebradas	m <sup>-1</sup>
k <sub>s</sub>	Coeficiente de transferência de massa da fase sólida	m s <sup>-1</sup>
ρ <sub>f</sub>	Densidade do solvente	kg m <sup>-3</sup>
ρ <sub>s</sub>	Densidade do sólido	kg(sól) m(fs) <sup>-3</sup>
M <sub>t</sub>	Massa acumulada em um determinado tempo	kg
M <sub>∞</sub>	Massa no tempo infinito	kg
k	Constante que incorpora efeitos estruturais e geométricos (Eq. 4.13)	
n	Ordem cinética de entrega (Eq. 4.13)	

## RESUMO

LORENSKI FERREIRA, CRISTINA. **Extração Supercrítica do Cardanol a partir do Líquido da Casca da Castanha de caju e sua Incorporação em matriz de PLGA: Modelagem Matemática e Avaliação da Atividade Citotóxica**. Porto Alegre. 2022. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O líquido da casca da castanha de caju (LCC) é um subproduto agroindustrial que apresenta características peculiares devido à rica composição de alquilfenóis. Dentre os seus constituintes fenólicos, destaca-se o cardanol que tem atraído atenção por apresentar efeito antiproliferativo sobre células cancerosas. O objetivo deste trabalho é estudar o processo de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (EFS) do cardanol a partir do LCC técnico e produzir filmes biodegradáveis de PLGA com cardanol incorporado para potencial aplicação na terapia do câncer de bexiga (T24) e glioblastoma (M059J). Condições experimentais foram investigadas para a extração do cardanol a partir do LCC. O método Box-Behnken foi utilizado para otimizar o rendimento de cardanol como função das variáveis pressão, temperatura e vazão de solvente. Experimentos de equilíbrio líquido-vapor (ELV) foram conduzidos para determinar a solubilidade do cardanol em CO<sub>2</sub>. Os dados experimentais do ELV foram modelados usando PR-EOS acoplada à regra de mistura de van der Waals (vdW2) e o processo de EFS foi simulado utilizando um modelo proposto por Sovová (2005). Os extratos foram caracterizados por FTIR, RMN <sup>1</sup>H, CLAE, CG/EM e a atividade citotóxica foi avaliada para as células T24 e M059J. Filmes de PLGA com cardanol foram preparados com a técnica de evaporação de solvente e caracterizados; ensaios de liberação foram realizados e a modelagem matemática da cinética determinada. Como resultados, destaca-se a obtenção de extratos com 94% de cardanol com atividade frente às células T24 e M059J (IC<sub>50</sub> de 21,5 e 86,6 µg/mL, respectivamente). Pelo método Box-Behnken, foi constatada a maior influência da pressão no rendimento do cardanol. Na condição de 50 °C/150 bar, a solubilidade foi calculada como 0,087g<sub>card.</sub>/kg<sub>CO<sub>2</sub></sub>. Neste estudo, a EFS mostrou-se tecnicamente viável para a obtenção de cardanol a partir do LCC e filmes de PLGA com cardanol apresentaram propriedades adequadas com potencial para serem aplicados no tratamento de câncer de bexiga e glioblastoma. Palavras-Chave: cardanol, extração supercrítica, modelagem matemática, solubilidade do cardanol em CO<sub>2</sub>, atividade citotóxica

## ABSTRACT

LORENSKI FERREIRA, CRISTINA. **Supercritical Extraction of Cardanol from Cashew Nut Shell Liquid and its Incorporation into PLGA matrix: Mathematical Modeling and Evaluation of Cytotoxic Activity.** Porto Alegre. 2022. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Cashew nut shell liquid (CNSL) is an agroindustrial by-product that has peculiar characteristics due to its rich composition of alkylphenols. Among its phenolic constituents, cardanol stands out, which has attracted attention for having an antiproliferative effect on cancer cells. The objective of this work is to study the supercritical CO<sub>2</sub> extraction (SFE) process of cardanol from the technical CNSL and to produce biodegradable PLGA films with incorporated cardanol for potential application in the therapy of bladder cancer (T24) and glioblastoma (M059J). Experimental conditions were investigated for the extraction of cardanol from CNSL. The Box-Behnken method was used to optimize cardanol yield as a function of pressure, temperature and solvent flow variables. Vapor-liquid equilibria experiments (VLE) were conducted to determine the solubility of cardanol in CO<sub>2</sub>. The VLE experimental data were modeled using the PR-EOS coupled to the van der Waals mixing rule (vdW2) and the SFE process was simulated using a model proposed by Sovová (2005). The extracts were characterized by FTIR, <sup>1</sup>H NMR, HPLC, GC/MS and the cytotoxic activity was evaluated for T24 and M059J cells. PLGA films with cardanol were prepared with the solvent evaporation method and characterized; release assays were performed and mathematical modeling of the kinetics determined. As a result, extracts with 94% of cardanol with activity against T24 and M059J cells (IC<sub>50</sub> of 21.5 and 86.6 µg/mL, respectively) stand out. By the Box-Behnken method, the greatest influence of pressure on cardanol yield was observed. In the condition of 50 °C/150 bar, the solubility was calculated as 0.087g<sub>card.</sub>/kgCO<sub>2</sub>. In this study, SFE proved to be technically viable for obtaining cardanol from CNSL and PLGA films with cardanol showed adequate properties with potential to be applied in the treatment of bladder cancer and glioblastoma.

Key-words: cardanol, supercritical extraction, mathematical modeling, solubility of the cardanol in CO<sub>2</sub>, cytotoxic activity

## 1. INTRODUÇÃO

Muitos esforços têm sido dispendidos na utilização de recursos naturais renováveis devido às crescentes preocupações ambientais. Nesse âmbito, o líquido da casca da castanha de caju (LCC), um resíduo obtido como um subproduto da indústria do caju, tem despertado interesse em diversos segmentos, como na obtenção de resinas e tintas e em aplicações biológicas (Khan et al., 2018; Balgude et al., 2017). Dentre os constituintes fenólicos extraídos do LCC, destaca-se o cardanol. O cardanol é um líquido amarelo pálido que consiste em uma mistura de quatro meta-alquilfenóis diferindo pelo grau de insaturação da cadeia alifática: 3-*n*-pentadecilfenol, 3-(*n*-pentadeca-8-enil) fenol, 3-(*n*-pentadeca-8,11-dienil) fenol e 3-(*n*-pentadeca-8,11,14-trienil) fenol (Caillol, 2018).

A fim de potencializar as propriedades dos compostos fenólicos constituintes do LCC, estudos são realizados com intuito de separá-los. Diante disso, tem sido utilizada a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico como uma técnica limpa e eficaz de fracionamento desses compostos fenólicos (Melo et al., 2014; Lochab et al., 2014; Patel et al., 2011; Setianto et al., 2009; Patel et al., 2006; Smith Jr. et al., 2003). A extração supercrítica com CO<sub>2</sub> apresenta viabilidade econômica e ambiental, além de eliminar a presença de solventes orgânicos nos produtos finais, o que representa vantagem em relação aos processos tradicionais de extração que utilizam solventes orgânicos (Yuliana et al., 2012; Patel et al., 2011; Philip et al., 2008; Cassel et al., 2008). Na literatura, destaca-se o trabalho de Patel et al. (2011) que estudaram o uso de CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico para a extração seletiva do cardanol a partir do LCC. Patel et al. (2011) utilizaram um fluxo de massa de 1,2 kg h<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> supercrítico por 3 h. Diferentes condições de temperatura e pressão foram investigadas, visando estabelecer a condição que apresenta a maior solubilidade e seletividade do composto cardanol em meio supercrítico. Em condições de temperatura e pressão de, respectivamente, 60 °C e 200 bar, foi obtido extrato com 51% de cardanol. Mantendo

a temperatura em 60 °C e aumentando a pressão para 300 bar, foi obtido extrato com 86% de cardanol. Esses resultados revelam a influência das variáveis pressão e temperatura na extração seletiva do cardanol a partir do LCC.

O cardanol é um dos derivados do LCC que tem atraído muita atenção por ser considerado uma matéria-prima versátil e valiosa para a síntese de polímeros (Caillol, 2018; Wazarkar et al., 2017; Balgude et al., 2017; Puchot et al., 2016; Khan et al., 2016; Natarajan e Murugavel, 2013; Pathak e Rao, 2006) e na produção de materiais para diversas aplicações, como: adesivos (Shukla et al., 2015), surfactantes (Caillol, 2018; Wang et al., 2015) e filmes de revestimento termicamente estáveis e quimicamente resistentes (Khan et al., 2018). Além disso, há estudos que revelam a eficácia do cardanol em atividades biológicas contra a doença de Alzheimer (Paula et al., 2009). Dentre as diversas aplicações do cardanol, destaca-se seu comprovado efeito antitumoral frente a linhagens celulares de hepatocarcinoma (Massaro et al., 2015) e melanoma (Su et al., 2017), o que pode ajudar seus derivados a evoluírem como alternativas terapêuticas para o tratamento anticâncer (Anand e Nair, 2017). Ainda no cenário do tratamento do câncer, destacam-se estudos que utilizam polímeros biocompatíveis e biodegradáveis para a fabricação de *scaffolds* (suportes) como dispositivos para a liberação de fármacos. Diversos trabalhos relatam a eficiência de dispositivos de PLGA com fármacos incorporados que tem ação contra o câncer (Hamedani et al., 2020; Almajhdi et al., 2014; Xie et al., 2008).

Neste trabalho, a extração com fluido supercrítico foi utilizada para a obtenção de extratos ricos em cardanol a partir do LCC e sua composição química e atividade em células de câncer foram avaliadas. Ensaios de viabilidade celular foram realizados com extratos obtidos por extração supercrítica indicando ação antiproliferativa de células de câncer de bexiga e glioblastoma. Condições operacionais adequadas foram investigadas e, posteriormente, a otimização da extração de cardanol foi realizada utilizando o método Box-Behnken. Experimentos de equilíbrio de fases de cardanol/CO<sub>2</sub> foram conduzidos com o objetivo de determinar a solubilidade do extrato em dióxido de carbono, mediante o uso da Peng-Robinson EOS (PR-EOS) em conjunto com a regra de mistura de van der Waals com dois parâmetros de interação binários (vdW2). Com a solubilidade predita pelo modelo termodinâmico, o modelo de transferência de massa, proposto por Sovová (2005), foi utilizado para estimar o

coeficiente de transferência de massa. Com vistas a uma estratégia de liberação controlada de cardanol, filmes de PLGA puros e filmes com quantidades determinadas de extrato rico em cardanol incorporadas foram preparados. Os filmes foram caracterizados a fim de verificar suas propriedades para potencial uso na terapia do câncer. Ensaio de liberação foram realizados e a modelagem matemática da cinética foi determinada.



## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o estudo do processo de extração supercrítica com CO<sub>2</sub> do cardanol a partir do líquido da casca da castanha de caju (LCC) técnico comercial e a produção de filmes biodegradáveis de PLGA com cardanol incorporado para potencial aplicação na terapia do câncer de bexiga e glioblastoma.

### 2.1. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- obter extrato rico em cardanol a partir do LCC por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico.
- investigar a condição adequada de temperatura e pressão que resulte em extratos com maior concentração de cardanol através da análise dos mesmos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a fim de delinear os limites para o planejamento experimental.
- identificar a condição ótima de temperatura, pressão e vazão de CO<sub>2</sub> no processo extrativo e otimizar a extração por meio do método de superfície de resposta com planejamento Box-Behnken.
- realizar a modelagem matemática do processo extrativo incorporando os dados de solubilidade gerados a partir do uso de EOS.
- identificar e quantificar os compostos presentes no extrato por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

e Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ).

- avaliar a atividade citotóxica dos extratos em células de câncer de bexiga (T24) e glioblastoma (M059J) utilizando o protocolo MTT e comparar com as células saudáveis (Vero).
- preparar e caracterizar filmes biodegradáveis de PLGA com quantidades determinadas de extrato através da metodologia de evaporação de solvente.
- avaliar o perfil de liberação do cardanol a partir da matriz polimérica de PLGA por espectrofotometria e realizar a modelagem matemática da cinética de liberação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Líquido da casca da castanha de caju

O cajueiro, de nome científico *Anacardium occidentale* L. (Figura 3.1A), é uma árvore nativa do Brasil, sendo a Índia o maior produtor e processador mundial de caju (Figura 3.1B). A castanha de caju compreende a casca (Figura 3.1C) e o miolo. Enquanto a amêndoa é nutricionalmente valiosa, a casca tem sido considerada como resíduo da produção de castanha de caju, o que pode ser um problema ambiental se não for manuseada adequadamente (Caillol, 2018; Lochab et al., 2014; Yuliana et al., 2012; Patel et al., 2011).



Figura 3.1. (A) Cajueiro, *Anacardium occidentale* L.; (B) Caju; (C) Cascas da castanha de caju (Kumar et al., 2018).

Durante o processamento da castanha de caju, as cascas se rompem e liberam um subproduto, que corresponde a um líquido cáustico, viscoso, inflamável, marrom escuro com um cheiro persistente chamado de líquido da casca da castanha de caju (LCC) que constitui aproximadamente 25% do peso total da castanha de caju (Caillol, 2018; Lochab et al., 2014; Yuliana et al., 2012; Andrade et al., 2011; Setianto et al., 2009).

O LCC é uma fonte natural de compostos fenólicos ligados a uma longa cadeia alifática de quinze carbonos, na posição meta, que pode ser saturada ( $C_{15}H_{31}$ , 5-8%) e/ou insaturada com uma ( $C_{15}H_{29}$ , 48-49%), duas ( $C_{15}H_{27}$ , 16-17%) e três ( $C_{15}H_{25}$ , 29-30%) insaturações. Quatro são os componentes majoritários que compõem o LCC: ácido anacárdico (ácido 3-*n*-pentadecilsalicílico), cardanol (3-*n*-pentadecilfenol), cardol (5-*n*-pentadecilresorcinol) e 2-metilcardol (2-metil-5-*n*-pentadecilresorcinol) (Sharma et al., 2020; Caillol, 2018; Ladmiral et al., 2017; Voirin et al., 2014). No total, o LCC corresponde a uma mistura de 16 destes componentes fenólicos com porcentagens variadas (Lochab et al., 2014).

As estruturas químicas dos componentes do LCC estão ilustradas na Figura 3.2.

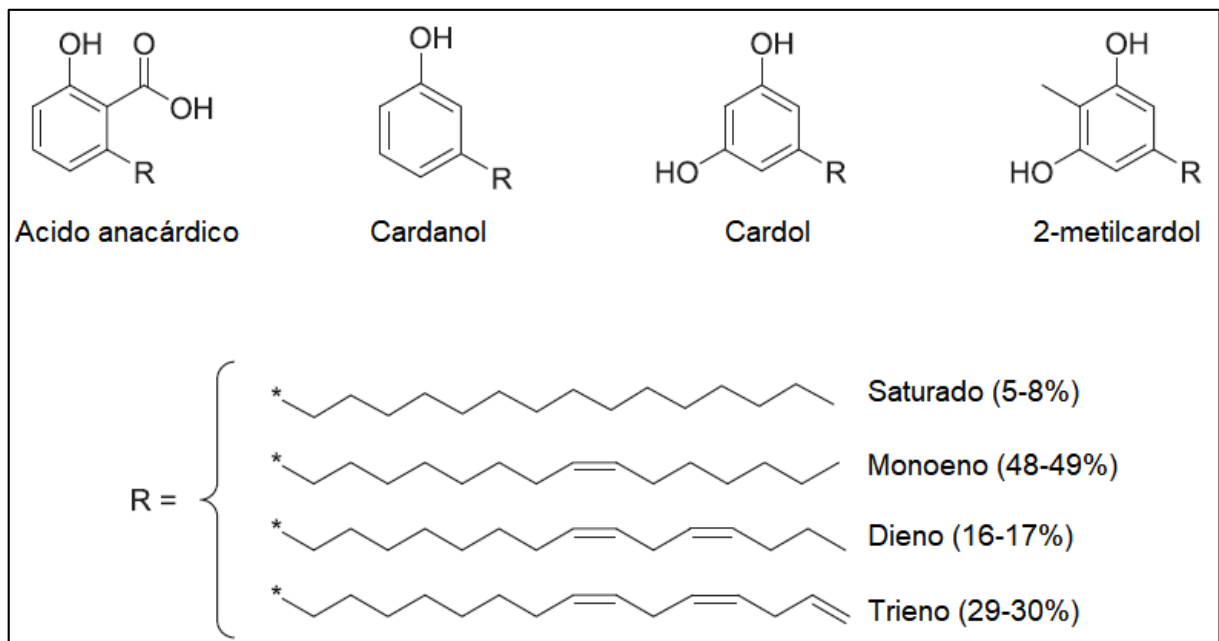


Figura 3.2. Estruturas químicas dos constituintes do LCC (Caillol, 2018).

Para a extração do LCC a partir da casca da castanha de caju, empregam-se métodos mecânicos, térmicos, de extração química por solventes e métodos de pirólise (Kumar et al., 2018).

De acordo com o modo de extração, o LCC é classificado em dois tipos: LCC natural e LCC técnico (Kumar et al., 2018; Chatterjee et al., 2017). O LCC natural é obtido por extração a frio empregando: extração mecânica (Kumar et al., 2018),

extração química com solventes como hexano, éter dietílico (Chatterjee et al., 2017) e pentano (Kumar et al., 2018) ou por meio de técnicas de extração com dióxido de carbono supercrítico (Sharma et al., 2020; Kumar et al., 2018).

O método de extração térmica, no entanto, produz um líquido conhecido como LCC técnico (Kumar et al., 2018; Chatterjee et al., 2017). Os métodos térmicos mais comumente utilizados são a torrefação e o banho de óleo quente (Kumar et al., 2018; Gedam et al., 1986). Na torrefação, usualmente, as cascas são torradas em um tambor a temperatura de 180 °C a 185 °C (Kumar et al., 2018), no entanto, há descrito na literatura, a aplicação deste método utilizando uma condição de temperatura mais alta, 400 °C a 700 °C, na qual ocorre a carbonização das cascas, o que produz o seu rompimento ocasionando, portanto, a liberação do líquido (Chatterjee et al., 2017; Gedam et al., 1986). No método que utiliza banho de óleo quente (principal método industrial), as cascas são colocadas em um cilindro e o calor é fornecido por vapor a uma temperatura de 200 °C a 250 °C (Kumar et al., 2018).

O tratamento térmico do LCC, seguido de uma destilação, leva à descarboxilação do ácido anacárdico (Figura 3.3), que produz um grau industrial de cardanol (cerca de 90% de pureza), com uma pequena quantidade de cardol e metilcardol (Sharma et al., 2020; Caillol, 2018; Yuliana et al., 2012; Andrade et al., 2011).

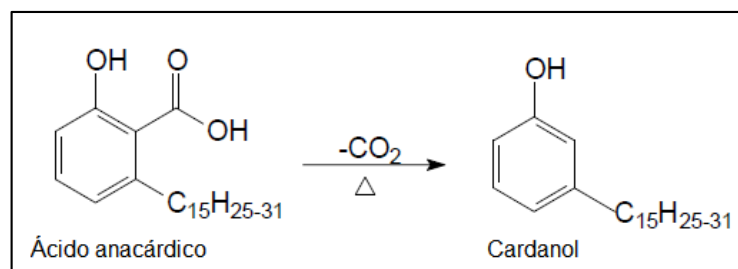


Figura 3.3. Reação de descarboxilação do ácido anacárdico  
(Adaptada de Mazzeto e Lomonaco, 2009).

A composição química do LCC técnico depende das condições nas quais o tratamento térmico é realizado e sua quantificação varia conforme a técnica analítica

aplicada para determiná-la (Andrade et al., 2011), como pode ser observado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição química do LCC técnico (Costa et al., 2019).

<b>Componentes fenólicos</b>	<b>LCC-t (%)</b>
Ácido anacárdico	1,09 – 1,75
Cardanol	67,82 – 94,60
Cardol	3,80 – 18,86
2-metilcardol	1,20 – 4,10
Componentes minoritário	3,05 – 3,98
Material polimérico	0,34 – 21,63

A Tabela 3.1 apresenta os percentuais dos componentes fenólicos que descrevem os limites inferior e superior obtidos a partir da utilização de diferentes técnicas analíticas: cromatografia em coluna, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa. Para determiná-los, foram analisadas três amostras diferentes de LCC técnico: amostra nova (“*new sample*”), amostra destilada (*distilled sample*) e amostra envelhecida (“*old sample*”). A amostra nova foi disponibilizada pela 3M Company (Saint Paul, MN, EUA); a amostra destilada refere-se ao LCC resultante da destilação a vácuo da amostra nova, também disponibilizada pela 3M Company (Saint Paul, MN, EUA) e a amostra velha foi também obtida a partir da amostra nova, porém mantida por cinco anos lacrada, no escuro e a 0 °C (Costa et al., 2019; Lomonaco e Mazzeto, 2009; Gedam e Sampathkumaran, 1986; Tyman et al., 1981).

A produção global de LCC se aproxima de um milhão de toneladas anuais. O LCC, portanto, se tornou uma fonte importante de fenóis que ocorrem naturalmente com impacto econômico no projeto de processos (Caillol, 2018). Porém, é importante mencionar que o efluente gerado como subproduto durante o processamento térmico da castanha de caju apresenta alta concentração de LCC técnico e representa, portanto, um risco para o meio ambiente, devido à elevada toxicidade dos compostos que constituem este efluente industrial. Pimentel et al. (2009) avaliaram a toxicidade dos dois principais componentes, cardol e cardanol, presentes no efluente - coletado em uma indústria localizada em Fortaleza (Ceará, Brasil). A toxicidade foi avaliada utilizando o teste de toxicidade aguda com *Artemia* sp. A concentração letal média (CL<sub>50</sub>) do cardol e do cardanol foram de 0,41 mg/L e 0,42 mg/L, respectivamente, após

48 h de exposição. Os resultados deste estudo sugerem que o efluente desta indústria seja altamente tóxico, pois, conforme Newman e Unger (2003), uma concentração de compostos fenólicos de 1 µg/mL é prejudicial à vida aquática.

Diante à toxicidade do LCC frente ao meio ambiente, o reaproveitamento deste subproduto da indústria do caju se faz necessário, já que esta é considerada uma fonte renovável aromática que representa uma alternativa natural promissora aos fenóis derivados do petróleo (Caillol, 2018). Trata-se de um produto com disponibilidade abundante e de pouco valor comercial, mas com alto potencial tecnológico devido à sua composição fenólica (Morais et al., 2017; Yuliana et al., 2012; Andrade et al., 2011).

A versatilidade do LCC é devido à, principalmente, sua composição química que apresenta diversos grupos funcionais no anel aromático e múltiplas insaturações na cadeia acíclica. Apresenta diversas aplicações industriais como produção de polímeros, tintas, vernizes, inseticida natural, compensados e isolantes térmicos. No setor de polímeros, destacam-se o uso em tintas anticorrosivas, materiais a prova de água, retardantes de chama, em revestimento de superfícies e na modificação de borrachas (Balgude e Sabnis, 2014).

O LCC apresenta diversas propriedades biológicas, como fungicida, antibacteriana, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante e larvicida (Morais et al., 2017; Yuliana et al., 2012; Andrade et al., 2011). Em relação às propriedades antibacterianas, destaca-se a ação do ácido anacárdico contra a bactéria *Streptococcus mutans* (predominante na cárie dentária), *Propionibacterium acnés* (causadora de acne) e *Staphylococcus aureus* (geradora de doenças graves, como pneumonia e meningite) (Kubo et al., 1993).

Oliveira et al. (2011) avaliaram a ação antioxidante dos compostos constituintes do LCC, a partir da aplicação do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), e constataram que o cardanol revelou-se o mais ativo, seguido pelo cardol e ácido anacárdico. A fim de comparação, também foi avaliada a atividade antioxidante do orcinol (composto análogo ao cardol que difere no comprimento de sua cadeia lateral, possuindo apenas um átomo de carbono - grupo metil), sendo que este apresentou a

maior atividade antioxidante comparada a determinada para cada composto avaliado. Diante do fato de que o orcinol exibiu a maior atividade antioxidante, os autores concluem que a cadeia lateral de 15 átomos de carbono não contribui para essa atividade. Os autores também investigaram a atividade larvicida contra *Aedes aegypti* dos constituintes do LCC. O ácido anacárdico, o cardol e o cardanol apresentaram  $IC_{50}$  de  $12,40 \pm 0,10$  ppm;  $5,55 \pm 0,07$  ppm e  $8,20 \pm 0,05$  ppm, respectivamente. O cardol foi, portanto, o mais ativo larvicida, seguido do cardanol e do ácido anacárdico. Embora o cardol tenha sido proposto como um novo larvicida verde contra *Aedes aegypti* (Lomonaco et al., 2009), este composto causou dermatite de contato em trabalhadores de castanha de caju. O cardanol, no entanto, apresentou atividade semelhante ao cardol e não demonstrou dermatite de contato, sendo apontado como o melhor constituinte do LCC para potencial larvicida.

Além destas propriedades biológicas mencionadas, o LCC também demonstra grande potencial terapêutico para tratar uma série de doenças como câncer (Anand e Nair, 2017; Neto et al., 2014; Al-Hazzani et al., 2012), diabetes, infecções de pele, rachaduras na planta dos pés, hipersensibilidade dentária, feridas e verrugas (Sharma et al., 2020).

A fim de potencializar o uso das propriedades dos derivados do LCC, é necessário isolar seus componentes. O processo de purificação do LCC foi estudado pela primeira vez por Tyman et al. (1989), o qual foi realizado em duas etapas: reação de Mannich e extração líquido-líquido (éter de petróleo-metanol). O extrato obtido apresentou 25% de cardanol, aproximadamente, não sendo considerado satisfatório. Além disso, trata-se de uma técnica que apresenta desvantagens como a utilização de reagentes caros e solventes altamente inflamáveis.

Em 2002, Kumar et al. (2002), realizaram adaptações nas técnicas utilizadas para a obtenção de cardanol proposta por Tyman et al. (1989): empregaram apenas extração líquido-líquido, resultando em um extrato com 45% de cardanol, porém com traços de cardol e 2-metilcardol.

Melhores resultados foram obtidos com a utilização do método de cromatografia em coluna com fase fixa de sílica gel. Destacam-se alguns trabalhos:



Yuliana et al. (2014) obtiveram um extrato com 80% de cardanol utilizando uma fase móvel de metanol e clorofórmio; Gonçalves et al. (2016) obtiveram 85% de cardanol, na composição do extrato, empregando uma mistura de clorofórmio e acetato de etila como fase móvel.

Além destes processos tradicionais de purificação, tem sido estudada uma tecnologia limpa e promissora para a extração dos constituintes fenólicos do LCC. Trata-se do processo de fracionamento por extração supercrítica com CO<sub>2</sub> (Melo et al., 2014; Lochab et al., 2014; Patel et al., 2011; Setianto et al., 2009; Patel et al., 2006; Smith Jr. et al., 2003).

### **3.2. Extração supercrítica com CO<sub>2</sub>**

A extração com fluido supercrítico é uma tecnologia para a extração de compostos a partir de matrizes vegetais sólidas e líquidas. Em relação aos processos tradicionais de extração que utilizam solventes orgânicos, a extração supercrítica apresenta vantagens, pois apresenta viabilidade econômica e ambiental, além de eliminar a presença de solventes orgânicos nos produtos finais. Essa técnica corresponde à solubilização de compostos de uma matriz sólida ou líquida em um solvente nas condições supercríticas (Yuliana et al., 2012; Patel et al., 2011; Philip et al., 2008; Cassel et al., 2008).

Um fluido supercrítico pode ser qualquer substância que se encontrar acima de sua pressão e temperatura crítica, isto é, acima do seu ponto crítico. Nessa condição, o fluido supercrítico apresenta propriedades das fases líquida e gasosa, como alta densidade característica da fase líquida e baixa viscosidade, baixa compressibilidade e alta difusividade associadas à fase gasosa (Cassel et al., 2008). A densidade do solvente influencia a solubilidade do soluto, já que esta depende das forças intermoleculares soluto/solvente. Temperatura e pressão são variáveis que modificam a densidade de um fluido na condição supercrítica, principalmente quando se aproximam do ponto crítico (Brun et al., 2012).

No processo de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, o solvente é comprimido e liquefeito em uma bomba de alta pressão, seguindo com seu aquecimento até as

condições supercríticas. Nessas condições, o fluido é introduzido no vaso de extração e percola o leito do material vegetal dissolvendo os compostos presentes. Após a realização da extração, o solvente juntamente com os compostos dissolvidos, passam por uma válvula de expansão. Ao ocorrer a rápida expansão, os compostos precipitam quando o solvente passar do estado supercrítico para o estado gasoso sendo totalmente eliminado (Cassel et al., 2008). O fluxograma do equipamento utilizado está representado na Figura 3.4.

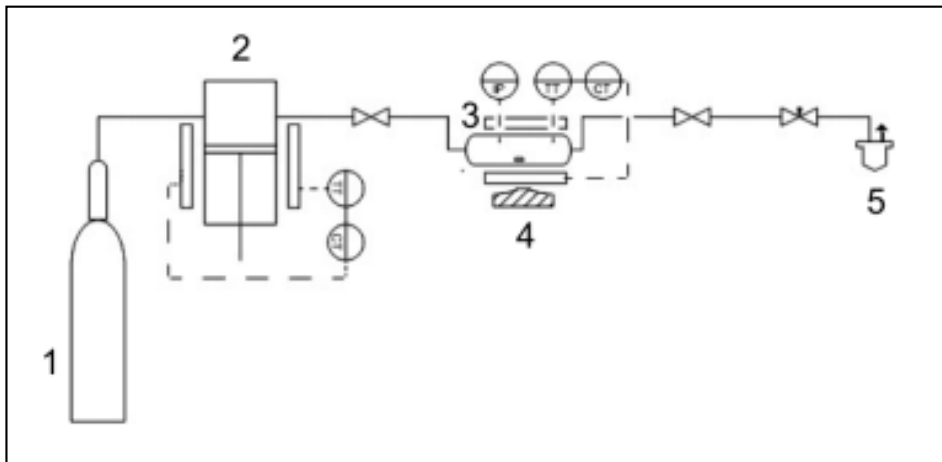


Figura 3.4. Representação esquemática do processo de extração por fluido supercrítico: 1- Cilindro de CO<sub>2</sub>, 2- Bomba de alta pressão, 3- Vaso de extração, 4- Agitador magnético, 5- Vaso separador. (Adaptada de Cassel et al., 2008).

O CO<sub>2</sub> tem sido muito utilizado como solvente na extração supercrítica nas indústrias farmacêuticas e de alimentos e fragrâncias (Oliveira et al., 2017; Melo et al., 2014; Patel et al., 2011). Esse solvente é, portanto, o mais utilizado como fluido supercrítico para a extração de produtos naturais, devido às suas propriedades como baixas temperatura e pressão críticas, 31 °C e 72 bar, respectivamente; além de ser inerte, atóxico, barato, facilmente disponível, inodoro, não inflamável e estar no estado gasoso na condição de pressão e temperatura ambiente e, por isso, não há risco de haver resíduo de solvente no extrato (Oliveira et al., 2017; Melo et al., 2014; Patel et al., 2011; Cassel et al., 2008). O notável interesse da comunidade científica nesta tecnologia tem sido impulsionado pela grande versatilidade do dióxido de carbono, cujas propriedades podem ser ajustadas para fornecer extratos com composições desejáveis, com base no processo de seletividade (Melo et al., 2014; Patel et al., 2011).

A extração com fluido supercrítico é tradicionalmente definida como uma tecnologia de alta pressão e esta variável é de fato de suprema importância para muitos aspectos técnicos e econômicos deste processo, sendo a densidade uma propriedade muito afetada pela variação da pressão (Melo et al., 2014).

Shobha e Ravindranath (1991) estudaram a extração do LCC a partir da casca da castanha de caju utilizando dióxido de carbono supercrítico em pressão e temperatura de, respectivamente, 250 bar e 40 °C e com vazão de CO<sub>2</sub> de 4 – 5 kg/h por 17,5 h. Os autores relatam a obtenção de um rendimento de extração de 18,7% em massa de compostos fenólicos, sendo este extrato composto por 69,7%, 14,5% e 3,46% em massa de ácido anacárdico, cardol e cardanol, respectivamente.

Patel et al. (2006) também investigaram a extração do LCC a partir da casca da castanha de caju utilizando dióxido de carbono supercrítico. Efeitos de parâmetros de processo como pressão de extração, temperatura e vazão de CO<sub>2</sub> foram investigados. O rendimento da extração aumentou com o aumento da pressão, temperatura e vazão mássica de CO<sub>2</sub>, sendo a pressão considerada o parâmetro de maior influência.

Além desses autores, cita-se Setianto et al. (2009) que avaliaram a influência da temperatura e da pressão na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico do LCC a partir da casca da castanha de caju. Na condição de 300 bar e 60 °C, foi obtido um extrato contendo 52,2 mol% de ácido anacárdico, 28,5 mol% de cardol e 19,3 mol% de cardanol. Os autores relatam que a temperatura tem efeitos diferentes na solubilidade dos compostos fenólicos, dependendo da pressão. Em baixas pressões (inferiores a cerca de 12 MPa), o aumento da temperatura resulta na diminuição da solubilidade do LCC em CO<sub>2</sub>. No entanto, em pressões superiores a 20 MPa, o aumento da temperatura resulta em um aumento da solubilidade do LCC em CO<sub>2</sub>. Os autores indicam que as condições que resultaram em maiores solubilidades de LCC em CO<sub>2</sub> resultaram em altos rendimentos de extração.

Destaca-se também o trabalho de Yuliana et al. (2012) que empregaram diferentes métodos para separar o LCC da casca da castanha de caju. Dentre eles,

destacam-se a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (40 °C, 300 bar, 4 h) e com Soxhlet (ponto de ebulição do solvente, pressão atmosférica, 30 h). Na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, o efeito da temperatura na quantidade total de LCC extraído a pressão constante pode ser desprezado. No entanto, a qualquer temperatura fixa, a quantidade de LCC extraída aumenta rapidamente com o aumento da pressão. Conforme já discutido, isto é devido ao fato de que a capacidade de extração do solvente sob estado supercrítico é dependente da densidade, sendo que a maior densidade de CO<sub>2</sub> resultará em maior capacidade de extração. No entanto, em condição isocórica, a densidade permanece quase constante à medida que a temperatura muda, então o rendimento da extração muda pouco (Lochab et al., 2014; Yuliana et al., 2012; Patel et al., 2011; Philip et al., 2008).

Ainda sobre o estudo de Yuliana et al. (2012) acrescenta-se que os autores relataram que a quantidade de LCC obtida por extração com Soxhlet é maior do que a obtida por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico. Isso, provavelmente, é causado pelo tempo de extração muito mais longo ao utilizar o Soxhlet (30 h) em comparação com a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (4 h). Ambos os métodos investigados apresentaram maior seletividade em relação ao ácido anacárdico monoinsaturado, sendo obtidos extratos com 52,24% de ácido anacárdico a partir da extração com CO<sub>2</sub> supercrítico e com 27,90% para a extração com Soxhlet. Esse resultado está de acordo com o trabalho anterior relatado por Setianto et al. (2009), que afirmou que o CO<sub>2</sub> tem maior seletividade para o ácido anacárdico em relação ao cardanol.

### 3.3. Cardanol

Dentre os constituintes fenólicos extraídos do LCC, destaca-se o cardanol. O cardanol é um líquido amarelo pálido que consiste em uma mistura de quatro meta-alquilfenóis diferindo pelo grau de insaturação da cadeia alifática (Figura 3.5): 8,4% de cadeias saturadas, 3-*n*-pentadecilfenol; 48,5% de cadeias com uma insaturação, 3-(*n*-pentadeca-8-enil) fenol; 16,8% de cadeias com duas insaturações, 3-(*n*-pentadeca-8,11-dienil) fenol e 29,33% de cadeias com três insaturações, 3-(*n*-pentadeca-8,11,14-trienil) fenol (Caillol, 2018; Ladmiral et al., 2017).

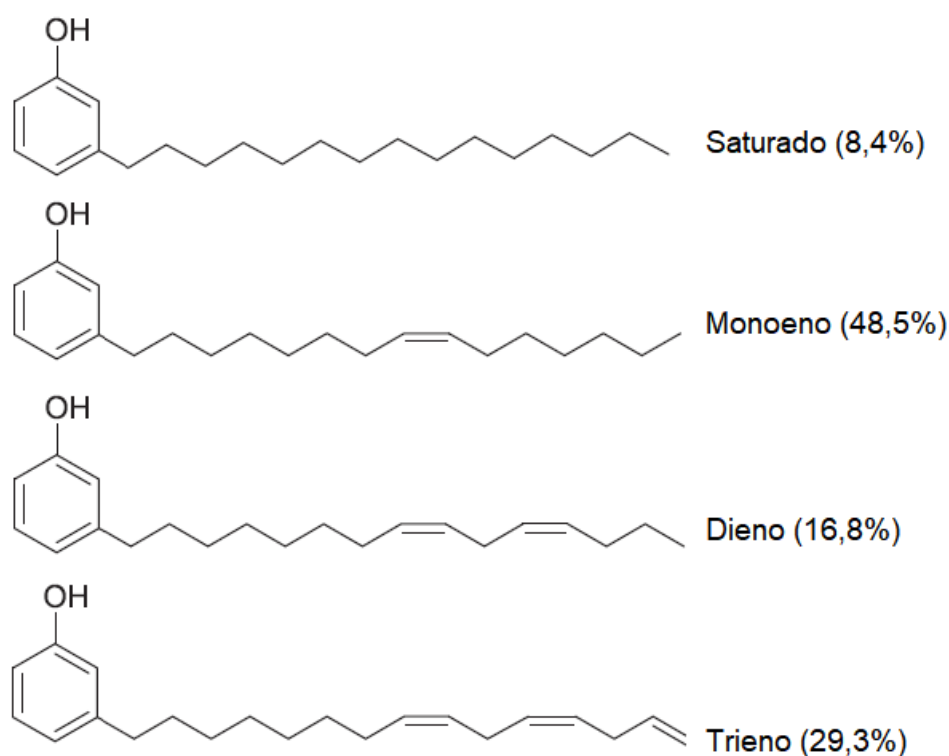


Figura 3.5. Estruturas químicas do cardanol diferindo pelo grau de instauração da cadeia alifática (Fonte: autora).

Os sítios reacionais da molécula, como posições das ligações duplas e os usuais do anel fenólico, fornecem ao cardanol estabilidade térmica em altas temperaturas, carácter lipídico e permitem a funcionalização de sua molécula (Lochab et al., 2014). O cardanol tem atraído considerável atenção por proporcionar maior potencial para aplicações tecnológicas devido à boa processabilidade, alta solubilidade em solventes orgânicos e biodegradabilidade (Moreira et al., 2018; Kanehashi et al., 2013). Além disso, o cardanol pode ser considerado como uma matéria-prima versátil e valiosa para a produção de oligômeros/polímeros, como epóxidos (Caillol, 2018; Balgude et al., 2017), fenalcaminas (Pathak e Rao, 2006), polióis (Balgude et al., 2017), poliuretanos (Khan et al., 2016), poliureias (Wazarkar et al., 2017), benzoxazinas (Puchot et al., 2016), novolac (Natarajan e Murugavel, 2013) e outros.

Além do uso difundido do cardanol na síntese de polímeros, tem sido relatada a produção de nanomateriais. Gonçalves et al. (2016) relatam a utilização do cardanol na síntese de nanofibras de polianilina semicondutora (PAni) com elevada área

superficial utilizada na fabricação de dispositivos elétricos em dimensões nanométricas. Ainda neste cenário, John e Vemula (2006), empregaram o cardanol como matéria-prima para a síntese de nanotubos de aril glicolípídeos sendo estes utilizados como veículos para entrega de fármacos.

O cardanol também tem sido empregado para a produção de materiais para diversas aplicações, como adesivos (Shukla et al., 2015), plastificantes (Caillol, 2018; Greco et al., 2017), surfactantes (Caillol, 2018; Wang et al., 2015), revestimentos antibiofilme (Zafar et al., 2016), espumas fenólicas (Shukla et al., 2015), antioxidantes (Feng et al., 2017) e em sistemas de entrega de fármacos (Lalitha et al., 2015).

Estudos pertinentes relacionados às aplicações do cardanol estão voltados para a terapia do câncer (Massaro et al., 2015; Neto et al., 2014; Al-Hazzani et al., 2012). Este tema será abordado na seção 3.6.

### **3.4. Extração de Cardanol com CO<sub>2</sub> supercrítico**

Patel et al. (2011) estudaram o uso de CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico para a extração seletiva do cardanol a partir do LCC. Este, por sua vez, foi obtido através da pirólise das cascas da castanha de caju previamente moídas em um reator de leito fixo mantido a 500 °C e 720 mmHg. O rendimento em relação ao extrato foi de 28%. Este extrato foi misturado com serragem (1:1 em peso), material inerte que serviu de suporte, e então foi colocado no vaso extrator. Este extrato foi empregado para a obtenção do cardanol utilizando extração por fluido supercrítico por 3 h com fluxo de massa de 1,2 kg/h de CO<sub>2</sub> supercrítico. Diferentes condições de temperatura e pressão foram investigadas, visando estabelecer a condição que apresenta a maior solubilidade e seletividade do composto cardanol em meio supercrítico. Em condições de temperatura e pressão de, respectivamente, 60 °C e 200 bar, foi obtido extrato contendo 51% de cardanol em sua composição. Mantendo a temperatura em 60 °C e aumentando a pressão para 300 bar, foi obtido rendimento de extração de cerca de 63%, sendo 86% da composição referente ao cardanol. Os resultados revelam melhores rendimentos com o aumento da pressão, sendo estes atribuídos ao aumento da densidade do CO<sub>2</sub>, aumentando assim o seu poder solvente e conseqüentemente

umentando a solubilidade do LCC. Esses resultados corroboram os obtidos por Philip et al. (2008).

Patel et al. (2011) também investigaram a influência da temperatura na solubilidade dos compostos do LCC em CO<sub>2</sub> e observaram que, na condição de pressão e temperatura de 300 bar e 40 °C, respectivamente, é obtido valor inferior de rendimento de extração, comparado ao alcançado a 300 bar e 60 °C. Diante deste resultado, os autores constataram, portanto, que o rendimento aumenta com o aumento da temperatura para uma mesma pressão. Segundo Philip et al. (2008), para pressões abaixo de 220 bar (pressões abaixo da região de transição), o aumento da temperatura diminui a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico e, conseqüentemente, menor poder de solvente do solvente. Acima dessa região, condição utilizada por Patel et al. (2011), o aumento da solubilidade do LCC pode ser atribuído ao aumento da pressão de vapor de alguns dos componentes do LCC.

Além das variáveis temperatura e pressão, o fluxo de CO<sub>2</sub> também influencia na solubilidade dos compostos do LCC, sendo que esta diminui com o aumento do fluxo de CO<sub>2</sub> (Philip et al., 2008). Os melhores resultados obtidos por Philip et al. (2008) com o menor fluxo de CO<sub>2</sub> (5 g min<sup>-1</sup>) podem ser explicados em termos do tempo de permanência do fluido no vaso de extração: quanto menor o fluxo de CO<sub>2</sub>, maior o tempo de permanência no vaso de extração, resultando em melhor transferência de massa do LCC para o CO<sub>2</sub> supercrítico.

### **3.5. Modelagem matemática**

A modelagem termodinâmica e de transferência de massa correspondem a etapas essenciais no projeto de processos industriais que envolvem extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (EFS). Para EFS, a solubilidade do composto de interesse em dióxido de carbono é um dos principais parâmetros para a otimização, sendo que esta propriedade pode ser calculada a partir de modelos termodinâmicos. A partir do ponto de vista termodinâmico, a solubilidade pode ser calculada através da definição teórica do equilíbrio de fases, utilizando modelos que necessitam de dados experimentais ou modelos preditivos que empregam somente dados de propriedades dos compostos puros. Uma classe de equações que calcula a solubilidade são as equações de estado

(EOS) cúbicas. Um dos fatores limitantes para o uso deste equacionamento é a necessidade de dados experimentais de equilíbrio de fases de misturas binárias para estimar parâmetros associados a desvios mais pronunciados da idealidade da mistura (Silva, 2013).

### 3.5.1. Equilíbrio líquido-vapor (ELV)

O equilíbrio líquido-vapor a altas pressões de misturas contendo CO<sub>2</sub> e compostos presentes em espécies vegetais é de importante aplicação para os cálculos de solubilidade associados aos processos extrativos que utilizam CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente. O equilíbrio líquido-vapor requer como condição necessária a igualdade das fugacidades das fases a temperatura e pressão constantes para todos os componentes presentes na mistura. As equações de estado cúbicas (EOS) são amplamente aplicadas para o cálculo dos coeficientes de fugacidade utilizados no equacionamento da isofugacidade do ELV para alta pressão, condição em que a fase líquida é compressível. A equação de estado cúbica de Peng-Rosinson (PR-EOS) é uma equação de estado clássica, Equação 3.1 (Silva, 2013).

$$P = \frac{RT}{v - b} - \frac{a}{v(v + b) + b(v - b)} \quad (3.1)$$

Onde,  $v$  é o volume molar,  $R$  refere-se à constante dos gases,  $T$  corresponde à temperatura absoluta,  $a$  e  $b$  são parâmetros da PR-EOS, Equações 3.2 e 3.3, respectivamente.

$$a = \frac{0,45724R^2 \cdot T_c^2}{P_c} \quad (3.2)$$

$$b = \frac{0,07780R \cdot T_c}{P_c} \quad (3.3)$$



### 3.5.2. Modelagem matemática da transferência de massa

A modelagem matemática dos processos de extração com fluido supercrítico é uma ferramenta útil que possibilita a previsão do comportamento do sistema de extração tendo como objetivo a determinação de parâmetros do processo, sendo importante na otimização e *scale-up* da extração a partir de informações em escala laboratorial ou piloto (Cassel et al., 2008; Reverchon, 1997).

Diante disso, uma ampla variedade de modelos é relatada na literatura. Pode-se apresentar, de um modo geral, a existência de modelos empíricos, modelos baseados na transferência de massa em uma única fase do processo (fase fluida ou partícula sólida), além disso, há os modelos que consideram a transferência em ambas as fases, acrescentam-se ainda os modelos estabelecidos por analogia ao transporte de calor e, por fim, a combinação entre eles. É importante destacar que cada modelo considera diferentes características de um determinado processo. Assim, não há um modelo que possa ser aplicável a qualquer fenômeno de transferência de massa, já que a curva de extração pode variar conforme as condições operacionais, bem como, com o tipo de produto obtido, o solvente utilizado, o tipo de matéria-prima, a estrutura vegetal do material utilizado, além da forma geométrica do extrator e das partículas (Cassel et al., 2008).

Os modelos empíricos são considerados, por muitas vezes, um pouco mais que uma interpolação de resultados experimentais e podem ser úteis quando faltam informações sobre os mecanismos de transferência de massa e sobre as relações de equilíbrio do processo de extração (Reverchon, 1997).

Um modelo empírico foi utilizado por Barton et al. (1992). Os autores trataram a extração supercrítica com CO<sub>2</sub> da oleorresina de baunilha como uma reação química, sendo que, ao invés das relações de transferência de massa e equilíbrio, uma constante cinética foi utilizada. A taxa de extração foi assumida como proporcional à concentração de oleorresina deixada na partícula vegetal ( $q_{rs}$ ) e a seguinte equação diferencial foi proposta (Equação 3.4):

$$\frac{dq_{rs}}{dt} = -kq_{rs} \quad (3.4)$$

Onde,  $k$  é a constante cinética.

Ao integrar esta equação com a condição inicial que em  $t = 0$ ,  $q_{rs} = q_{rs0}$ , obtém-se a Equação 3.5.

$$q_{rs} = q_{rs0} \exp(-kt) \quad (3.5)$$

Segundo esses autores, se a difusão interna é a etapa de controle, é possível definir  $k = DA/Vz$ , onde  $A/V$  é a razão superfície-volume da partícula e  $z$  é a distância de difusão. Dessa forma, aplicando este modelo a dados experimentais do processo extrativo, foi encontrado um melhor valor de ajuste para a difusividade interna  $D$ .

Um outro grupo de modelos é o baseado na analogia de transferência de calor, em que o processo de extração com  $\text{CO}_2$  supercrítico é tratado como um fenômeno de transferência de calor; cada partícula vegetal é considerada como uma esfera quente resfriando em um meio uniforme. Nesse caso, assume-se que os componentes a serem extraídos estão distribuídos uniformemente dentro da partícula e, aplicando a segunda lei de difusão de Fick em coordenada esférica, a analogia da transferência de calor e as transformadas de Fourier, a equação diferencial pode ser resolvida analiticamente e a concentração do soluto na partícula é calculada através da Equação 3.6 (Reverchon, 1997).

$$\frac{q}{q_0} = \left[ \frac{6}{\pi^2} \right] \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left[ -\frac{n^2 \pi^2 D t}{r^2} \right] \quad (3.6)$$

Onde,  $n$  é um número inteiro,  $r$  é a variável radial (m),  $D$  é o coeficiente de difusão do soluto na esfera ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $t$  é o tempo de extração (s),  $q$  é a concentração do soluto restante na esfera ( $\text{kg m}^{-3}$ ) e  $q_0$  é a concentração inicial do material extraível ( $\text{kg m}^{-3}$ ).

Este modelo foi aplicado por Reverchon et al. (1993) para descrever as curvas de rendimento de óleos essenciais isolados por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico do manjeriço. Obteve-se uma concordância satisfatória entre o modelo e os dados de rendimento a partir da utilização de três tamanhos diferentes de partículas de manjeriço.

Destacam-se também os modelos baseados em balanço de massa diferencial que têm sido amplamente utilizados para descrever o comportamento de leitos fixos durante operações sólido-líquido como adsorção/dessorção. Ao aplicar esses modelos, supõem-se que a dispersão axial é desprezível, bem como que a densidade do solvente e a sua vazão são constantes ao longo do leito, e que o óleo essencial pode ser modelado como um único composto. Com base nestas hipóteses, dois balanços de massa independentes (Equações 3.7 e 3.8) podem ser escritos sobre um elemento do extrator de altura  $dh$  (Reverchon, 1997).

$$uV \frac{\partial c}{\partial h} + \epsilon V \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \epsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad (3.7)$$

$$(1 - \epsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = -A_p K (q - q^*) \quad (3.8)$$

Onde,  $\epsilon$  é a porosidade do leito,  $V$  é o volume do extrator (m<sup>3</sup>),  $c$  é a concentração do extrato na fase fluida (kg m<sup>-3</sup>),  $q$  é a concentração do extrato na fase sólida (kg m<sup>-3</sup>),  $u$  é a velocidade superficial do solvente (m s<sup>-1</sup>),  $A_p$  é a superfície total das partículas (m<sup>2</sup>),  $q^*$  é a concentração na interface fluido-sólido que se supõe estar em equilíbrio com a fase fluida (kg m<sup>-3</sup>),  $h$  é a coordenada espacial ao longo do leito (m),  $t$  é o tempo de extração (s),  $q_0$  é a concentração inicial na fase sólida (kg m<sup>-3</sup>) e  $K$  (m s<sup>-1</sup>) é o coeficiente de transferência de massa interna. As modelagens matemáticas das extrações supercríticas de óleo de sálvia (Reverchon, 1996), óleo de semente da rosa mosqueta (Reverchon et al., 2000), vimblastina (alcalóide obtido a partir da planta *Catharanthus roseus*) (Falcão et al., 2017) e óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera*) (Vargas et al., 2006) foram realizadas com sucesso a partir do uso deste modelo.

Este balanço de massa diferencial foi aplicado por Sovová et al. (1994) no processo de extração supercrítica do óleo essencial de sementes de alcarávia. Esses autores propuseram uma representação física das partículas da semente como sendo compostas de células quebradas durante a moagem e de células ainda intactas. Eles levantaram a hipótese da existência de duas resistências à transferência de massa durante a extração supercrítica: a primeira está localizada na mistura supercrítica e controla o processo de extração até que todo o óleo essencial das células quebradas seja esgotado; a segunda está nas paredes das células não destruídas e controla a parte restante do processo. Essas hipóteses foram transferidas para o modelo matemático introduzindo dois balanços de massa para a fase sólida. Um foi escrito para o óleo essencial de fácil acesso e o outro foi escrito para o óleo essencial protegido pelas paredes das células fechadas. As proporções relativas dessas contribuições foram determinadas pela eficiência de moagem. Um terceiro balanço de massa diferencial foi proposto para a fase fluida. O sistema de três EDPs constituído pelas equações de balanço de massa com simplificação foi solucionado analiticamente. Cinco parâmetros ajustáveis foram determinados usando o método dos mínimos quadrados. Os resultados experimentais foram propostos em diferentes condições de extração e os experimentos foram realizados em condições de fluxo ascendente e descendente. O efeito da canalização foi observado na operação de fluxo ascendente. No entanto, para validar modelos com um grande número de parâmetros ajustáveis, os autores afirmam que um número adequado de conjuntos de dados experimentais deve ser utilizado.

Destaca-se também o trabalho de Patel et al. (2006) que investigaram a extração do líquido da casca da castanha de caju (LCC) utilizando dióxido de carbono supercrítico. Os resultados experimentais foram representados pelo modelo de transferência de massa baseado em difusão no qual supõe-se que o óleo essencial esteja distribuído uniformemente na matriz celular e que as partículas sólidas apresentam estrutura uniforme. A dispersão axial é desprezada. A vazão do fluido supercrítico, a temperatura e a pressão do sistema são constantes e a velocidade do fluido supercrítico através do extrator é insignificante. Se  $C$  é a fração mássica do soluto no fluido supercrítico durante um determinado período de tempo,  $C_{inf}$  é a quantidade total de soluto presente no sólido. Este modelo cinético é expresso pela Equação 3.9.

$$C = C_{inf} - C_{inf} \exp(-Kt) \quad (3.9)$$

Onde,  $K$  é a constante de velocidade.

Através de estudos experimentais, observou-se que a constante de velocidade,  $K$ , depende da pressão, temperatura e vazão mássica do solvente (Equação 3.10).

$$K = K_0 + K_P P + K_F F + K_T T \quad (3.10)$$

Onde,  $P$ ,  $F$  e  $T$  são pressão (bar), vazão mássica de solvente (kg/h) e temperatura (K), respectivamente.

Segundo os autores, os valores positivos encontrados para  $K_P$  e  $K_F$  indicam que, com o aumento da pressão e da vazão mássica do solvente, a constante cinética e, portanto, o rendimento aumenta. O valor negativo encontrado para o coeficiente de temperatura na Equação 3.10 sugere que, com o aumento da temperatura, o rendimento do LCC diminui; no entanto, apresenta baixa sensibilidade no rendimento do LCC.

Os modelos utilizados nesta tese, para a extração supercrítica do cardanol a partir do LCC, foram definidos a partir da análise do comportamento experimental e são apresentados na seção 4.5.

### 3.6. Terapias no tratamento do Câncer

Câncer é a segunda principal causa de morte depois das doenças cardiovasculares, que correspondem à principal causa de morte no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) projetou que mais de 13,1 milhões de mortes relacionadas ao câncer ocorrerão até 2030, época em que o câncer, provavelmente, ultrapassará as doenças cardiovasculares como a principal causa de morte em humanos (Jusu et al., 2020).

A pesquisa relacionada ao câncer envolve intensos esforços científicos para identificar suas causas e desenvolver estratégias para sua prevenção, diagnóstico, tratamento e cura. Na terapia anticâncer, os medicamentos são administrados por via intravenosa e/ou oral usando formulações convencionais, incluindo injeções, comprimidos e cápsulas. A distribuição controlada e direcionada de um agente anticâncer no local de ação é necessária para maximizar o efeito de morte celular durante a fase de crescimento do tumor e para evitar a exposição do fármaco a células saudáveis, reduzindo assim a toxicidade do fármaco. Além disso, destaca-se a importância de manter uma taxa constante de entrega do fármaco para maximizar a exposição às células em divisão, resultando na regressão do tumor (Dinarvand et al., 2011).

A quimioterapia intravenosa é o tratamento mais comuns para o câncer. No entanto, os tecidos e órgãos normais sofrem danos devido aos efeitos colaterais indesejáveis causados pela distribuição não específica de fármacos quimioterápicos e a falta de especificidade para reconhecimento de células tumorais (Shen et al., 2020; Ahmad et al., 2019).

Uma abordagem promissora neste contexto é a utilização de matrizes poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis para a liberação controlada de fármacos. Esses sistemas são capazes de manter as concentrações do fármaco dentro das faixas terapêuticas ao longo dos dias. Conseqüentemente, podem diminuir os efeitos colaterais causados por altas concentrações e administrações repetidas e, assim, melhorar a adesão do paciente em comparação com os tratamentos convencionais (Milosevic et al., 2020; Pereira et al., 2016).

Na medicina moderna, têm sido utilizados polímeros biocompatíveis e biodegradáveis para a fabricação de *scaffolds* (suportes) (Milosevic et al., 2020; Hamedani et al., 2020; Sahoo et al., 2005). Esse tipo de sistema de liberação de fármacos pode ser usado para várias aplicações médicas, como na cicatrização de feridas e na terapia do câncer (Milosevic et al., 2020).

*Scaffolds* nanofibrosos carregados com fármaco podem ser implantados na área desejada do corpo para fornecer uma fonte do mesmo e distribuição local do

agente terapêutico. No caso de tratamento do câncer, os implantes carregados de fármacos não apenas fornecem uma entrega local e eficiente, mas também minimizam a toxicidade sistêmica (Hamedani et al., 2020).

Dentre as vantagens do uso de polímeros biodegradáveis na preparação de *scaffolds* para a liberação de fármacos, destacam-se: biocompatibilidade, degradabilidade, reabsorção e a dispensável necessidade de uma segunda cirurgia para remoção do *scaffold*, uma vez que o fármaco tiver sido liberado (Milosevic et al., 2020).

### 3.6.1. Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)

O PLGA está em uso clínico seguro desde sua aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1969 (Ahmad et al., 2019). Em todas as categorias de biomateriais biodegradáveis, o PLGA é uma escolha popular como transportador para a entrega de medicamentos, proteínas e macromoléculas (DNA, RNA, peptídeos) e como *scaffolds* para engenharia de tecidos (Ahmad et al., 2019; Makadia e Siegel, 2011).

O PLGA é um copolímero sintético, pertencente à classe dos poliésteres, composto por unidades monoméricas de poli(ácido glicólico) (PGA) e poli(ácido láctico) (PLA) (Figura 3.6) (Ahmad et al., 2019; Makadia e Siegel, 2011). O PLA apresenta um carbono assimétrico referido como D ou L; sendo as formas enantioméricas PDLA e PLLA. PLGA é um acrônimo geral para ácido poli(D, L-láctico-co-glicólico); as formas de ácido D- e L-láctico estando em igual proporção (Ahmad et al., 2019).

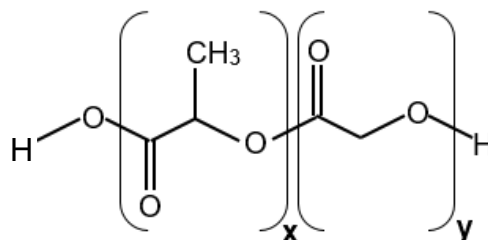


Figura 3.6. Estrutura do PLGA: x é o número de unidades de ácido láctico e y, o número de unidades de ácido glicólico (Fonte: autora).

O PLGA pode ser obtido com diferentes razões de PLA:PGA. Por exemplo, PLGA 75:25 significa que o copolímero apresenta 75% de PLA e 25% de PGA (Ahmad et al., 2019). A proporção entre PLA e PGA, a massa molar, a topologia da superfície e a temperatura de armazenamento influenciam as propriedades físicas do copolímero (Makadia e Siegel, 2011).

O PLGA é um polímero bioabsorvível, biocompatível e biodegradável em subprodutos não tóxicos (ácido glicólico, ácido láctico, dióxido de carbono e água) apresentando baixa resposta inflamatória. Trata-se de um polímero relativamente hidrofóbico com boa resistência mecânica (Zhao et al., 2016; Makadia e Siegel, 2011).

Além disso, o PLGA apresenta características de liberação controlada ou sustentada, propriedades de degradação favoráveis e métodos de preparação bem documentados para formulações utilizando uma ampla variedade de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas (Ahmad et al., 2019). Como moléculas hidrofílicas, citam-se: Atenolol, medicamento utilizado no tratamento da hipertensão (Chourasiya et al., 2016) e Carboplatin, fármaco empregado na terapia do câncer (Singh et al., 2011). Como moléculas hidrofóbicas destacam-se: Paclitaxel (Huang et al., 2013), Honokiol (Hamedani et al., 2020) e Docetaxel (Manoochehri et al., 2013), utilizadas como medicamentos na terapia do câncer.

Os copolímeros de PLGA são amplamente amorfos e exibem uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) na faixa de 40 °C a 60 °C (Ahmad et al., 2019), portanto, apresentam comportamento vítreo na temperatura fisiológica de 37 °C, apresentando, assim, a estrutura da cadeia bastante rígida (Ahmad et al., 2019; Makadia e Siegel, 2011).

Polímeros PLGA comercialmente disponíveis são, geralmente, caracterizados por sua viscosidade intrínseca, que está diretamente relacionada ao seu peso molecular (Ahmad et al., 2019; Makadia e Siegel, 2011). Esses polímeros são disponíveis com propriedades físico-químicas muito diferentes entre si. Diante disso, o perfil de liberação do fármaco pode ser adaptado selecionando o PLGA com as propriedades apropriadas para a aplicação desejada como, por exemplo: massa molar e razão entre PLA e PGA (Fredenberg et al., 2011). Em relação à massa molar,



observa-se que os copolímeros de PLGA com elevadas massas molares, por apresentarem cadeias mais longas, requerem mais tempo para degradarem-se do que os copolímeros de cadeias poliméricas curtas (Erbetta et al., 2012; Makadia et al., 2011). Quanto à razão entre PLA e PGA, constata-se que copolímeros de PLGA ricos em PLA são menos hidrofílicos – já que a presença de grupos metila no PLA torna-o mais hidrofóbico em relação ao PGA – logo, esses copolímeros absorvem menos água e, conseqüentemente, degradam-se mais lentamente (Zhao et al., 2016; Erbetta et al., 2012; Makadia et al., 2011; Lu, L. et al., 2000).

Entre as diferentes formas de sistemas de liberação de fármacos baseados em PLGA, as microesferas ou micropartículas são as mais comuns. Outros tipos incluem nanopartículas, filmes, cilindros, *scaffolds* e espumas. Os implantes de PLGA podem ser inseridos cirurgicamente no local desejado, fornecendo a vantagem de administração local do fármaco (Fredenberg et al., 2011).

#### 3.6.1.1. Mecanismos de liberação de fármacos baseados em PLGA

Os dois principais mecanismos de liberação de fármacos baseados em PLGA são difusão do fármaco através da matriz polimérica e degradação/erosão da matriz polimérica (Ahmad et al., 2019; Fredenberg et al., 2011; Dinarvand et al., 2011). Muitos processos influenciam a taxa de difusão do fármaco e a cinética de degradação, por exemplo, interações polímero-fármaco, interações fármaco-fármaco e absorção de água. A liberação do fármaco é frequentemente precedida por uma cadeia de processos como absorção de água, hidrólise e erosão (Fredenberg et al., 2011).

A taxa de liberação é frequentemente controlada inicialmente por difusão e, no estágio final, por degradação/erosão que é determinado pela taxa de hidrólise via clivagem das ligações éster em oligômeros e posteriormente em monômeros (Figura 3.7) (Ahmad et al., 2019; Fredenberg et al., 2011; Dinarvand et al., 2011). Nesse processo, a penetração de água na matriz é maior do que a taxa de degradação do polímero (Ahmad et al., 2019; Makadia e Siegel, 2011).

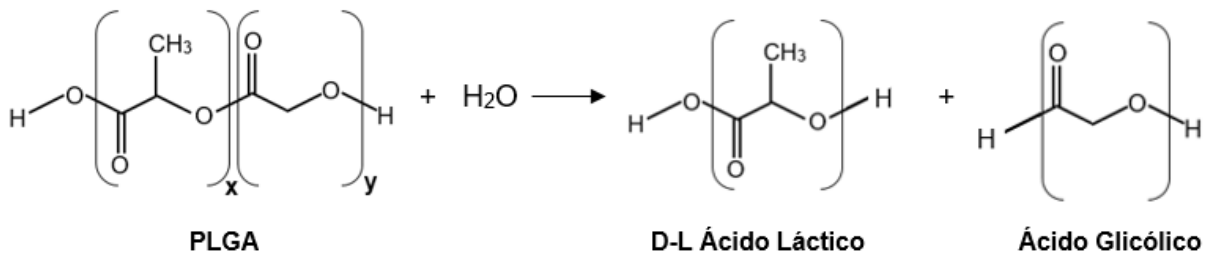


Figura 3.7. Reação de hidrólise do PLGA (Fonte: autora).

Embora os copolímeros de PLGA possam sofrer erosão superficial em algumas condições, a erosão em massa é a principal via de degradação. Isso ocorre por cisão aleatória de ligações éster na estrutura do polímero ocorrendo homoganeamente em todo o dispositivo (Dinarvand et al., 2011).

A Figura 3.8 apresenta as curvas para liberação de fármaco como resultado da degradação dos copolímeros de PLGA com diferentes proporções entre PLA e PGA (Makadia e Siegel, 2011).

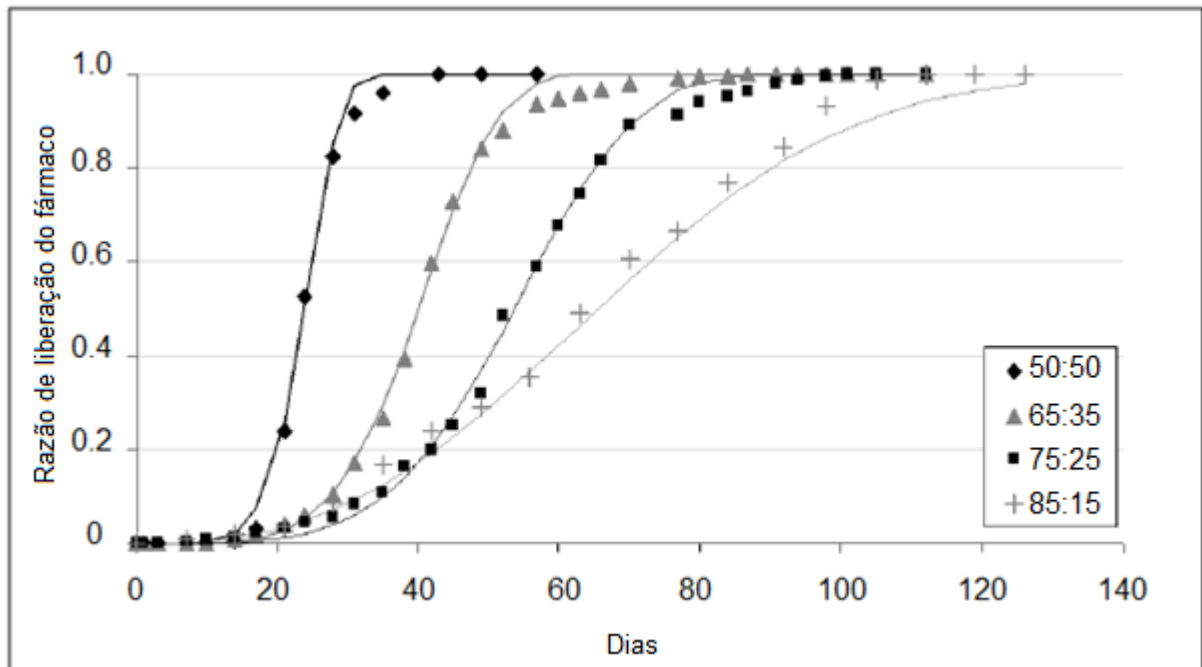


Figura 3.8. Curvas de liberação de fármaco, *in vivo*, para PLGA 50:50, 65:35, 75:25 e 85:15. PLGA 65:35 significa 65% de ácido láctico e 35% de ácido glicólico (Makadia e Siegel, 2011).

As curvas mostram que a taxa de liberação diminui com o aumento da concentração do PLA. Observa-se este comportamento, devido à presença dos

grupos metila no PLA que o tornam mais hidrofóbico comparado ao PGA. Por serem menos hidrofílicos, copolímeros de PLGA ricos em PLA degradam-se mais lentamente, pois absorvem menos água (Ahmad et al., 2019; Zhao et al., 2016; Makadia e Siegel, 2011). As faixas de tempo de degradação podem ser de 1 a 2 meses, de 4 a 5 meses e de 5 a 6 meses, para razões de copolímero de PLGA de 50:50, 75:25 e 85:15, respectivamente (Ozdil e Aydin, 2014).

### 3.6.1.2 *Scaffold* de PLGA: aplicação na terapia do Câncer

Copolímeros de PLGA têm sido amplamente utilizados em sistemas de liberação de fármacos como alternativa para melhorar formulações convencionais (Milosevic et al., 2020; Pereira et al., 2016), sendo que *scaffolds* fibrosos de PLGA carregados de fármacos têm ampla aplicação em curativos e tratamento de câncer (Zhao et al., 2016).

Almajhdi et al. (2014) avaliaram a atividade anticâncer de *scaffolds* de nanofibras de PLGA com nanopartículas de prata incorporadas contra linhagem de células de câncer de fígado. O estudo revelou que as nanofibras de PLGA contendo 7% de prata são adequadas como sistemas de liberação de fármacos anticâncer sem efeito de citotoxicidade nas células normais.

Acrescenta-se ainda o estudo de Xie et al. (2008). Os autores prepararam filmes biodegradáveis de PLGA com paclitaxel encapsulado para aplicações de liberação sustentada do fármaco que apresenta ação anticâncer. Os filmes desenvolvidos neste estudo, preparados utilizando uma combinação de técnicas de deposição por eletrospray, têm potencial para serem usados como dispositivos de entrega sustentada de paclitaxel ao local do tumor após implantação para quimioterapia.

Hamedani et al. (2020) prepararam *scaffolds* de PLGA, utilizando a técnica de eletrofiação, com Honokiol incorporado, um composto natural com potentes efeitos anticâncer. A partir da avaliação do perfil de liberação, foi constatado que 24% do Honokiol foi liberado em 24 horas sugerindo que a entrega sustentada do fármaco é viável. Além disso, foi demonstrado que o Honokiol administrado por meio de *scaffolds*

baseados em PLGA é eficaz na inibição do crescimento de células cancerígenas renais.

### **3.6.2. Propriedades anticâncer do LCC e do Cardanol**

Quimioterápicos derivados de plantas são tradicionalmente utilizados na terapia do câncer. Vários componentes de ocorrência natural, como curcumina, alicina, licopeno, capsaicina, limoneno e betacaroteno, foram usados e pesquisados com eficácia para a terapia anticâncer (Bhanot et al., 2011). Mais recentemente, as propriedades anticâncer do LCC foram exploradas para fins terapêuticos (Anand e Nair, 2017). Dentre os componentes fenólicos do LCC, o cardanol tem comprovado efeito antiproliferativo em algumas linhagens de células cancerosas, como, por exemplo, hepatocarcinoma, HepG2 (Massaro et al., 2015) e melanoma humano, M14 (Su et al., 2017), o que pode ajudar seus derivados a evoluírem como alternativas terapêuticas para o tratamento anticâncer.

Massaro et al. (2015) exploraram nanotubos de haloisita como carreadores de fármacos como o cardanol, que é considerado uma espécie ativa anticâncer natural promissora para o tratamento do câncer de fígado (hepatocarcinoma – HepG2). Os nanotubos de haloisita foram modificados com sais de triazólio hidrofóbicos a fim de resolver o problema de baixa solubilidade do cardanol em meios fisiológicos. O cardanol liberado a partir dos nanotubos de haloisita modificados apresentou alta citotoxicidade frente às linhagens celulares de hepatocarcinoma.

Su et al. (2017) estudaram a ação do cardanol nas células de melanoma humano (M14) e constataram que o cardanol pode inibir a proliferação de células de melanoma humano de maneira dependente da dose e dependente do tempo, sendo determinados os valores de  $IC_{50}$  de  $23,15 \pm 2,42 \mu\text{M}$  e  $12,30 \pm 1,67 \mu\text{M}$  após 24 h e 48 h de tratamento, respectivamente. Os autores afirmam que o cardanol apresenta potencial para ser aplicado em dispositivos para terapia de câncer de pele (melanoma).

Destaca-se também o estudo de Neto et al. (2014), que avaliaram a citotoxicidade do LCC no carcinoma de células escamosas oral (OSCC-3). As células

foram tratadas com os compostos a 25 ng/ $\mu$ L por 24, 48 e 72 h. Este estudo investigou a citotoxicidade do LCC, cuja composição química não foi informada, o que resultou em classificá-lo como potencial agente quimioterápico.

Outro estudo foi o de Al-Hazzani et al. (2012), que avaliou uma nanoemulsão à base de LCC, do qual a composição química não foi revelada, como um potente inibidor da proliferação de células do câncer de mama humano (MCF-7). Os objetivos do estudo foram avaliar o potencial das nanoemulsões para aumentar a solubilidade de fármacos e investigar a citotoxicidade *in vitro* contra células de câncer de mama humano. Células de câncer de mama humano tratadas com a nanoemulsão apresentaram perda de viabilidade e morte por apoptose e necrose sendo determinados o valor de IC<sub>50</sub> de  $88 \pm 14,2$   $\mu$ L/mL após 48 h de tratamento.

Acrescenta-se ainda o trabalho de Ashraf e Rathinasamy (2018) que avaliaram a atividade anticâncer do LCC técnico nas células de câncer do colo do útero humano (HeLa) em comparação com as células fibroblásticas (L929). Os autores relatam que células HeLa tratadas com LCC técnico em todas as concentrações apresentaram alteração morfológica após 24 h de tratamento, sendo observada a inibição da proliferação de células HeLa com IC<sub>50</sub> de 0,004%(v/v). Nas células de fibroblastos L929, o tratamento com o LCC técnico não induziu a qualquer alteração na morfologia mesmo na concentração mais alta utilizada. Isso indica, claramente, que as células normais podem tolerar concentrações mais altas de LCC técnico, enquanto as células cancerosas são altamente suscetíveis à ação dos constituintes fenólicos do LCC.

Ola et al. (2008) isolaram o ácido anacárdico e o cardanol a partir do LCC e avaliaram a atividade citotóxica desses compostos, bem como a do LCC, em linhagens de células cancerígenas HeLa *in vitro*. A partir dos resultados do teste de citotoxicidade, verificou-se que o LCC, o ácido anacárdico e o cardanol têm um forte efeito citotóxico com intensidades variadas. O LCC tem o maior potencial, onde na dose de 0,0312 mg/mL pode causar morte celular de 65,73%. O ácido anacárdico passou a causar morte celular na dose de 0,500 mg/mL com percentual de morte celular de 11,27%, enquanto para o cardanol o efeito citotóxico foi observado na concentração de 0,13 mg/mL com morte celular de 6,93%. Dessa forma, os autores

concluem que o LCC, bem como o ácido anacárdico e o cardanol podem ser desenvolvidos como agentes anticancerígenos.

Na literatura, não têm sido relatados estudos sobre a utilização do cardanol incorporado a uma matriz biodegradável de PLGA com o objetivo de aplicação da terapia do câncer. Diante disso, a proposta desta tese mostra-se promissora no que se refere à busca de alternativas aos tratamentos convencionais destinados ao tratamento do câncer.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, será abordada a metodologia utilizada para realizar a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico do cardanol a partir do LCC e a metodologia empregada para determinar a solubilidade do cardanol em CO<sub>2</sub>, com base em experimentos de equilíbrio líquido-vapor. Será relatada a modelagem matemática do processo extrativo incorporando os dados de solubilidade gerados a partir do uso de EOS. Também serão apresentadas as metodologias utilizadas para avaliar a estrutura química do LCC e do extrato obtido, a composição química do extrato, bem como a citotoxicidade do mesmo frente às células de câncer de bexiga (T24) e glioblastoma (M059J) em comparação com as células saudáveis (Vero). Além disso, será apresentada a metodologia utilizada para preparar filmes de PLGA com cardanol incorporado, bem como as metodologias empregadas para caracterizá-los e para realizar o ensaio de liberação do cardanol a partir dos filmes. Um esquema representativo das etapas do trabalho é mostrado na Figura 4.1.

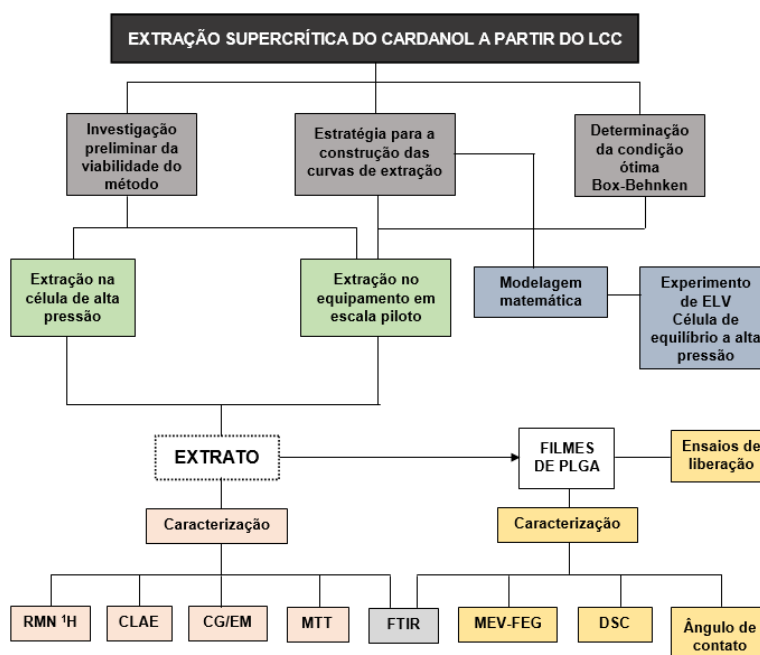


Figura 4.1. Esquema representativo das etapas do trabalho.

## 4.1. Materiais

Na Tabela 4.1, são apresentados os dados sobre os materiais utilizados nos procedimentos experimentais.

Tabela 4.1. Lista de materiais utilizados.

<b>Materiais</b>	<b>Procedência</b>	<b>Grau de Pureza (%)</b>
Acetonitrila (CH <sub>3</sub> CN)	Merck	99,99
Ácido acético glacial (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Merck	100,0
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT)	Sigma-Aldrich	-
Clorofórmio (CHCl <sub>3</sub> )	Anidrol	99,80
Clorofórmio deuterado (CDCl <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich	99,80
Dimetilsulfóxido (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> SO)	Merck	99,90
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Life Technologies	-
DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)	Life Technologies	-
Fungizona	Life Technologies	-
Hélio	Air Products	99,90
Penicilina-Estreptomicina	Life Technologies	-
Poli(ácido L-láctico-co-ácido glicólico) - (PLGA Comercial)	PURAC (PLG8523; 85:15 L-Láctico:glicólico)	99,39
Solução tampão fostato salino (PBS)	Sigma-Aldrich	-
Soro Fetal Bovino (SFB)	Life Technologies	-
Sulfato de sódio anidro (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Synth	99,00
Tripsina com EDTA 0,5%	Life Technologies	-
Tween-20 (C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>10</sub> )	Synth	99,90
<b>Linhagens celulares</b>		
M059J (Células de glioma)	ATCC (American Type Culture Collection)	-
T24 (Carcinoma de células transicionais de bexiga humana)		
Vero (Células renais de macaco verde africano)		

O LCC técnico (densidade de 0,946 g/mL) foi doado pela empresa Vernisul (Canoas/RS). O cardanol padrão (pureza de 86% e densidade de 0,948 g/mL) foi adquirido na Resibras Cashol (Fortaleza/CE) e o dióxido de carbono, na Air Products (pureza de 99,9%).



O PLGA foi fornecido pela empresa Corbion Purac (Gorinchem, Holanda) na forma de *pellets*, sendo armazenado sob argônio e refrigeração (-15 °C). O copolímero PLGA utilizado nesse trabalho contém maior quantidade de unidades monoméricas de PLA em relação às de PGA, contendo 85% de PLA e 15% de PGA. Além disso, apresenta viscosidade inerente (em clorofórmio) de 2,3 dL/g e massa molar ( $M_w$ ) de 363.000 g/mol.

#### 4.2. Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico no vaso de alta pressão

A extração do cardanol a partir do LCC com CO<sub>2</sub> supercrítico, inicialmente, foi realizada em um vaso de alta pressão com o objetivo de avaliar a viabilidade do método de extração. Dessa forma, diversas condições de temperatura e pressão foram investigadas, visando estabelecer a condição que apresenta a maior solubilidade e seletividade do cardanol em meio supercrítico.

O sistema consiste em uma bomba de CO<sub>2</sub> de alta pressão (ISCO 260-D), uma célula de aço inox (Waters) de alta pressão, uma resistência (Resistec) que controla a temperatura do ar no entorno do vaso, uma placa de agitação magnética (Fisatom) e um transdutor de pressão (Smar). O esquema da montagem é mostrado na Figura 4.2 e uma foto do equipamento é mostrada na Figura 4.3.

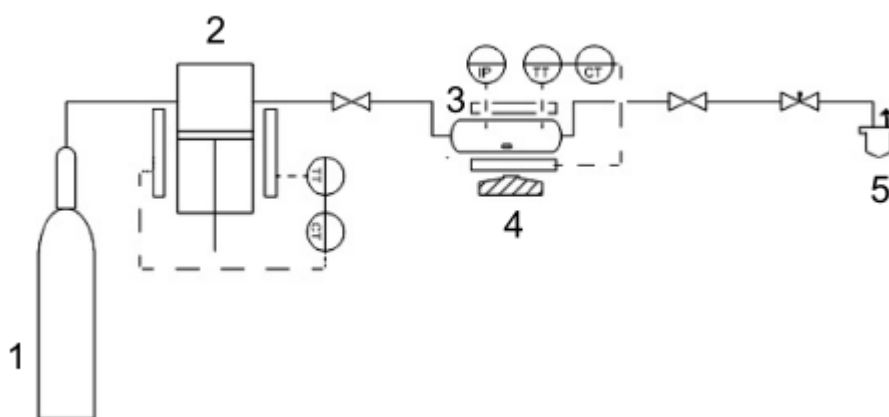


Figura 4.2. Fluxograma da célula de alta pressão. 1- Cilindro de CO<sub>2</sub>; 2- Bomba termostática; 3- Vaso de alta pressão; 4- Agitador magnético; 5- Vaso de expansão; TT- Transmissor de temperatura; CT- Controlador de temperatura; IP- indicador de pressão.

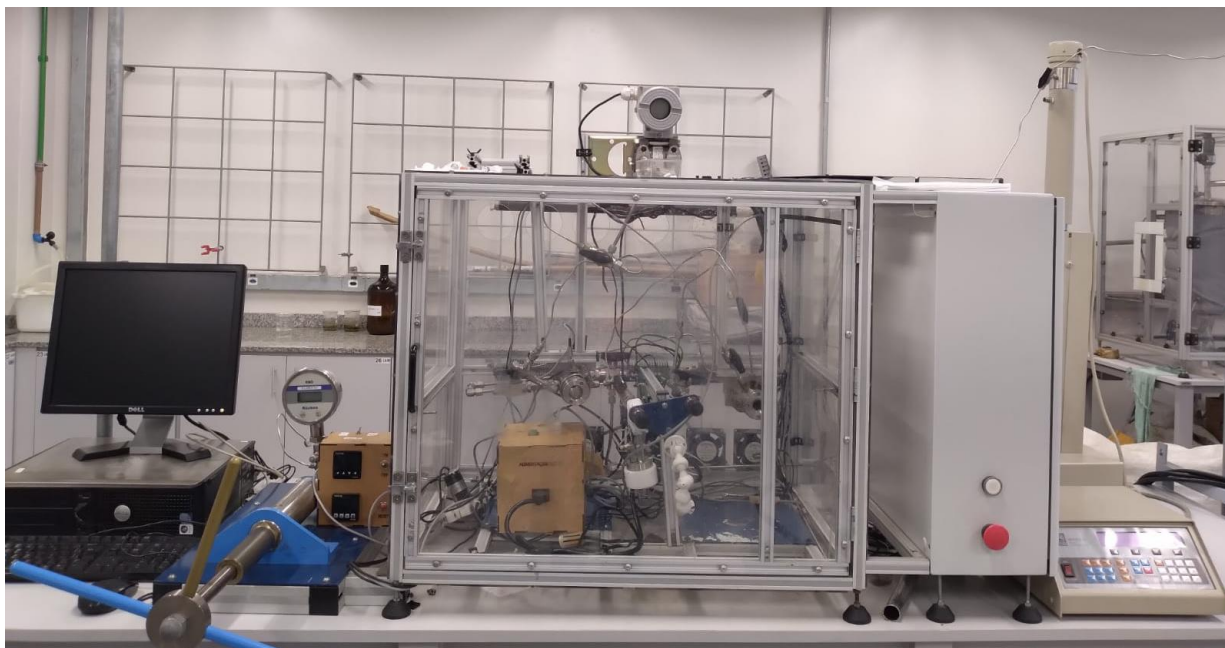


Figura 4.3. Célula de alta pressão.

A massa de LCC utilizada nas extrações foi na faixa de 0,3 a 0,7 g. Foram avaliadas seis condições de extração: em temperaturas de 35 °C e 55 °C a 80 bar, a 120 bar e a 200 bar. A amostra de LCC foi carregada no vaso de alta pressão com uma pipeta Pasteur e a quantidade de substância dentro do vaso foi considerada como a diferença entre a massa total da pipeta Pasteur+amostra antes e após a adição da mesma dentro do vaso; para este procedimento, foi utilizada uma balança de alta precisão (METTLER TOLEDO com precisão de 0,001 g). Em seguida, o CO<sub>2</sub> foi injetado no vaso de alta pressão até atingir a condição de temperatura e pressão desejada dentro do vaso. As extrações foram finalizadas a partir do instante em que não foi mais observado o aumento da massa de extrato obtido após três medições consecutivas de massa. Neste momento, efetuou-se a despressurização lenta do sistema.

A determinação da concentração de cardanol nos extratos (pureza dos extratos em relação ao cardanol) foi realizada a partir da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) cuja metodologia será relatada na seção 4.6.1.

### 4.3. Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico no equipamento em escala piloto

Em um equipamento de extração supercrítica em escala piloto, foram obtidos extratos a partir do LCC e foi dada continuidade à investigação da condição ótima de extração.

O equipamento de extração supercrítica consiste em dois cilindros de armazenagem de CO<sub>2</sub>, um condensador, duas bombas de alta pressão, uma bomba de co-solvente, dois pré-aquecedores, três vasos de extração de 1.000 mL, 500 mL e 100 mL, dois sistemas de coleta de extratos, um sistema de medição de vazão mássica, dois *softwares* de monitoramento e um sistema de controle automatizado. Nas extrações realizadas, o vaso utilizado foi o de 100 mL.

Conforme o fluxograma apresentado na Figura 4.4, o CO<sub>2</sub> armazenado no tanque (C1), no estado líquido, percorre a tubulação passando através do condensador (HE1), evitando que o diferencial de temperatura entre o ambiente e o interior da tubulação vaporize o CO<sub>2</sub>. O fluido é pressurizado por uma bomba de alta pressão Maximator G35 (P1) e aquecido em um pré-aquecedor (HE2). Nesta etapa, o fluido passa de líquido pressurizado para fluido supercrítico. O fluido supercrítico ingressa, então, no vaso de extração Waters (EV1) que contém a matéria-prima onde se encontra o extrato desejado. O solvente (CO<sub>2</sub> supercrítico) solubiliza o soluto (extrato) e a mistura (solvente+solute) deixa o vaso expandindo-se através da válvula micrométrica Hoke-Micromite 1600 (MV1). Ao se expandir, o CO<sub>2</sub> passa, automaticamente, para o estado gasoso e o extrato, para o estado líquido, dispensando uma possível etapa de separação, se utilizado outro método de extração. O extrato é coletado no vaso de separação (VS1 ou VS2) e os fluxos de solvente, no estado gasoso, seguem em direção ao sensor de medição de vazão (MFT). A pressão no extrator foi monitorada com um sistema transdutor digital, Novus 8800021600, adquirido da Novus Produtos Eletrônicos (Brasil) com precisão de  $\pm 1,0$  bar. O controlador de temperatura foi conectado a termopares (PT-100) com precisão de  $<0,5$ .

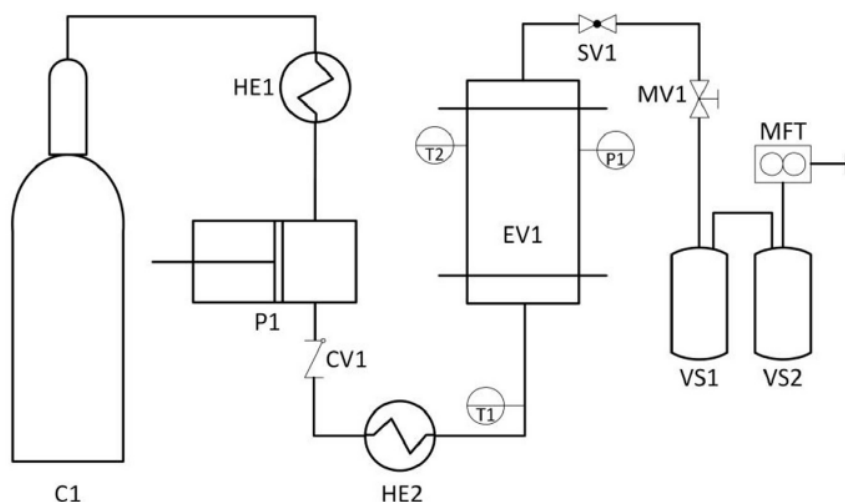


Figura 4.4. Diagrama simplificado do processo de extração supercrítica.

As extrações foram realizadas visando estabelecer a condição de temperatura e pressão que resulte em maiores rendimentos de extração, bem como em extratos com maior concentração de cardanol. O processo foi realizado em três etapas, que serão descritas nas seções 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3.

Para a realização de todas as extrações no equipamento em escala piloto, foi utilizado papel filtro como suporte para o LCC. Desta forma, dentro do vaso de extração, foi colocada uma quantidade determinada de papel filtro de 0,014 cm de espessura recortados em quadrados de cerca de 1 cm de comprimento. O papel filtro, previamente seco e pesado, foi coberto com uma fina camada de LCC. Na sequência, o papel coberto com LCC foi seco a temperatura de 60 °C e mantido em estufa (TECNAL TE-394/2) por 1,5 h. Após a secagem do papel, foi realizada a determinação da massa de LCC aderida ao papel por diferença em balança (METTLER TOLEDO, precisão 0,001 g).

Os extratos obtidos a partir de cada extração supercrítica no equipamento em escala piloto foram pesados em uma balança analítica (METTLER TOLEDO, precisão 0,001 g) para o cálculo do rendimento de extração e analisados por CLAE e CG/EM para a verificação da concentração de cardanol no extrato, conforme descrito nas seções 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente.

#### **4.3.1. Etapa 1: Varredura de pressão e varredura de temperatura**

Inicialmente, foi realizada uma varredura de pressão na temperatura de 55 °C, definida com base no experimento anterior no vaso de alta pressão. As pressões avaliadas foram de 80 bar, 120 bar, 150 bar e 200 bar, a massa de LCC utilizada foi de 5,060 g e a vazão de CO<sub>2</sub> empregada foi de 1000 g/h.

Posteriormente, sob pressão de 150 bar e vazão de CO<sub>2</sub> de 1000 g/h, foi conduzida a varredura de temperatura. As temperaturas investigadas foram de 50 °C, 60 °C e 70 °C, sendo a massa de LCC utilizada de 6,995 g.

Para as extrações que envolveram varredura de pressão e de temperatura, dentro do vaso de extração, foram colocados, aproximadamente, 8 g de papel filtro preparado conforme descrito na seção 4.3. As extrações foram finalizadas a partir do momento em que não foi mais observado o aumento da massa após três medições consecutivas.

#### **4.3.2. Etapa 2: Estratégia para a construção das curvas de extração**

A partir dos resultados (obtidos na Etapa 1) de rendimento das extrações e dos teores de pureza dos extratos em relação ao cardanol determinados por CLAE, a condição definida para dar sequência ao trabalho foi a correspondente à temperatura de 50 °C e à pressão de 150 bar, sendo mantida a vazão de CO<sub>2</sub> em 1000 g/h. Nesta condição, foi realizada a extração em triplicata com o objetivo de construir as curvas de extração.

Para o levantamento das curvas de extração, a massa de LCC utilizada para cada procedimento foi de 5,690 g e, aproximadamente, 8 g de papel filtro foi utilizado como suporte para o LCC, preparado conforme descrito na seção 4.3. As curvas foram construídas a partir da massa acumulada de extrato em função do tempo de extração, sendo esta massa determinada por meio da pesagem por diferença em balança analítica (METTLER TOLEDO, precisão 0,001 g) a cada 10 min em um total de 90 min de extração.

### 4.3.3. Etapa 3: Metodologia de superfície de resposta com planejamento Box-Behnken

O método de superfície de resposta com planejamento Box-Behnken foi empregado a fim de otimizar a extração com dióxido de carbono supercrítico do cardanol a partir do LCC.

O método desenvolvido por Box e Behnken (1960) direciona os experimentos para avaliar o efeito das variáveis no teor de cardanol extraído, através de três níveis de três variáveis. As variáveis pressão, temperatura e vazão de solvente foram investigadas. Os três níveis de pressão estudados foram 100 bar, 150 bar e 200 bar; os níveis de temperatura foram 40 °C, 50 °C e 60 °C e os níveis de vazão de solvente foram 500 g/h, 1000 g/h e 1500 g/h. O ponto central, correspondente à pressão, temperatura e vazão de solvente de, respectivamente, 150 bar, 50 °C e 1000 g/h foi definido com base nos resultados obtidos a partir da Etapa 1 (seção 4.3.1).

Os demais parâmetros da extração foram mantidos constantes: tempo de extração de 90 min, massa de LCC na faixa de 5 a 7 g e massa de papel no vaso de extração na faixa de 5 a 8 g. O procedimento de preparo do papel filtro está descrito na seção 4.3.

O número de experimentos é dado por  $N = 2k(k-1) + C_0$ , onde  $k$  é o número de variáveis e  $C_0$  o número de replicatas no ponto central; ambos equivalem a 3, totalizando 15 experimentos nas condições apresentadas na Tabela 4.2 com as variáveis independentes codificadas.

Para cada extração supercrítica, foi determinado o rendimento de cardanol ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ) a partir da multiplicação do teor de cardanol no extrato ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{extrato}}$ ) - obtido por CG/EM - por rendimento da extração ( $m_{\text{extrato}}/m_{\text{LCC}}$ ) (Equação 4.1).

$$\text{Rendimento de cardanol} = \frac{\text{massa de extrato}}{\text{massa de LCC}} \times \text{teor de cardanol no extrato} \quad (4.1)$$

Tabela 4.2. Planejamento experimental Box-Behnken para as variáveis independentes para a extração de cardanol do LCC por fluido supercrítico.

Exp.	Variáveis independentes descodificadas			Variáveis independentes codificadas		
	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Vazão de solvente (g/h)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	150	50	1000	0	0	0
2	100	60	1000	-1	1	0
3	200	40	1000	1	-1	0
4	100	40	1000	-1	-1	0
5	150	50	1000	0	0	0
6	150	60	500	0	1	-1
7	200	50	500	1	0	-1
8	100	50	500	-1	0	-1
9	100	50	1500	-1	0	1
10	200	60	1000	1	1	0
11	200	50	1500	1	0	1
12	150	40	1500	0	-1	1
13	150	40	500	0	-1	-1
14	150	50	1000	0	0	0
15	150	60	1500	0	1	1

X<sub>1</sub> é a pressão, X<sub>2</sub> é a temperatura e X<sub>3</sub> é a vazão de solvente.

Com os resultados obtidos a partir dos experimentos definidos pelo planejamento Box-Behnken, obteve-se uma equação polinomial de segunda ordem (Equação 4.2) que relaciona as variáveis independentes com o teor de cardanol no LCC, utilizando software Minitab®.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (4.2)$$

Onde, Y é a resposta predita; X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> são as variáveis independentes;  $\beta_0$  é uma constante;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  são os coeficientes lineares;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{33}$  são os coeficientes quadráticos e  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  são os coeficientes de interação entre os fatores.

Utilizando-se a Equação 4.2, é possível obter a condição otimizada para a extração de cardanol a partir do LCC.

#### **4.4. Cálculo da solubilidade do Cardanol em CO<sub>2</sub> supercrítico**

A solubilidade do soluto em dióxido de carbono é um dos principais parâmetros na representação matemática de extração supercrítica e vários autores têm utilizado diferentes metodologias para obter esses valores (Setianto et al., 2009; Chrastil, 1982). Neste trabalho, a solubilidade foi obtida experimentalmente e, posteriormente, calculada utilizando equações de estado cúbicas; este valor foi utilizado como entrada para o modelo de transferência de massa visando reduzir o número de parâmetros a serem estimados, aumentando assim sua precisão. O MATLAB 2015a foi utilizado para a estimação de parâmetros e simulação de processos.

##### **4.4.1. Equilíbrio de fases a alta pressão**

Os experimentos de equilíbrio líquido-vapor foram realizados com o objetivo de determinar a solubilidade do composto majoritário do LCC, o cardanol, em CO<sub>2</sub>. As medições do ponto de bolha foram realizadas pelo método sintético estático em uma célula de visualização de volume variável de alta pressão. O aparato experimental é apresentado na Figura 4.5.

O equipamento consiste em uma célula de visualização com três janelas de safira para observação visual, um transdutor de pressão absoluta (Smar LD 301) com incerteza de  $\pm 0,012$  MPa e uma bomba de seringa (ISCO, 260D) com vazão máxima de 107 mL/min e pressão máxima de 51,71 MPa. A bomba de seringa de CO<sub>2</sub> tem volume de 266 mL e temperatura controlada por banho termostático externo (TECNAL TE-2000). A célula de equilíbrio tem um volume interno máximo de 28 cm<sup>3</sup> e contém um pistão móvel, que permite o controle da pressão dentro da célula. As transições de fase são registradas visualmente variando a pressão atrás do pistão usando a bomba de seringa e CO<sub>2</sub> como fluido de pressurização. A célula é equipada com resistência elétrica e termopar (PT e 100, com precisão de 0,1 K), que está em contato direto com a mistura de fluidos no interior do corpo celular. Todos os



dispositivos eletrônicos são conectados a um controlador lógico programável (CLP) para aquisição de dados, o qual é integrado a um *software* supervisor. Todas as linhas são 1/800 de aço inoxidável ASTM A213. O controle da temperatura é feito através da interface do *software*. A pressão e a temperatura máximas da célula de equilíbrio são 27,50 MPa e 313,15 K, respectivamente. A determinação do ponto de bolha foi realizada a partir de observações visuais.

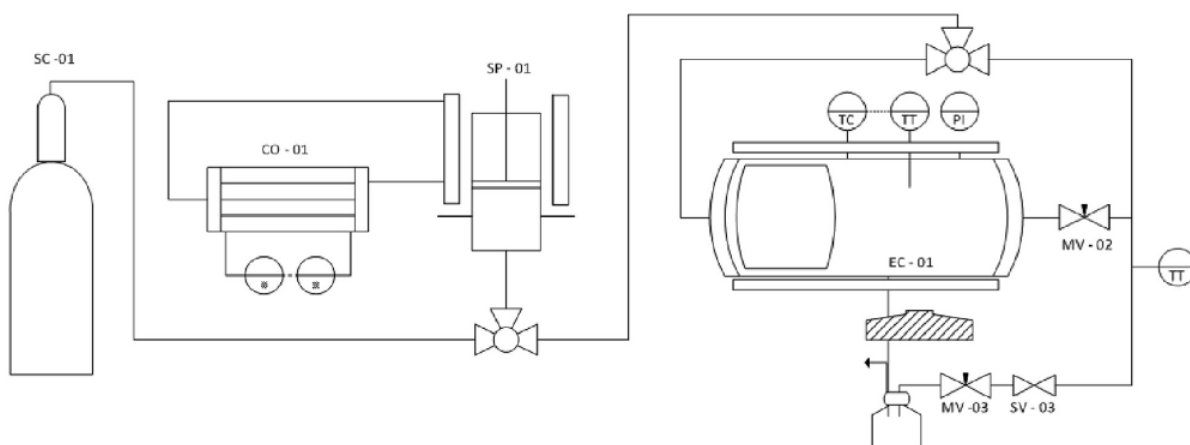


Figura 4.5. Fluxograma da célula de equilíbrio de fases de alta pressão. SC – Cilindro de CO<sub>2</sub>; CO – cooler; SP – bomba de seringa; EC – célula de equilíbrio; MV – válvula de agulha; SV – válvula de esfera; TT – transmissor de temperatura; TC – controlador de temperatura; PI – transmissor de pressão.

Uma massa definida de cardanol foi carregada na célula com uma pipeta Pasteur e a quantidade de substância dentro da célula foi considerada como a diferença entre a massa da pipeta Pasteur antes e após a adição da mesma dentro da célula, pesada em uma balança de alta precisão (METTLER TOLEDO com precisão de 0,001 g). Em seguida, uma quantidade pré-calculada de CO<sub>2</sub> foi injetada na parte frontal da célula de equilíbrio, até atingir a composição geral desejada dentro da célula. A injeção de CO<sub>2</sub> na parte frontal da célula ocorre em condições bem definidas, 10.000 kPa e 288,15 K, portanto a quantidade de solvente carregada é obtida pela variação do volume do vaso de transferência da bomba.

Os controles de temperatura, integrados ao *software* supervisor, são acionados para a condição em estudo. Após atingir a temperatura desejada, a pressão da célula foi aumentada aplicando-se pressão na parte posterior do pistão até a observação de uma única fase (fase líquida). Posteriormente, a pressão da

célula foi diminuindo lentamente até o aparecimento da primeira bolha. Para cada temperatura avaliada, 40 °C, 50 °C e 60 °C, foram realizados, respectivamente 13, 11 e 4 experimentos variando a pressão para obter a curva ELV. Após cada conjunto de experimentos em uma determinada temperatura, a célula foi estabilizada em uma nova temperatura e o procedimento experimental foi repetido.

Os equilíbrios de fase foram medidos para misturas de CO<sub>2</sub>/cardanol com frações molares de CO<sub>2</sub> na faixa de 0,06 a 0,7; sendo a massa de cardanol utilizada correspondendo a valores na faixa de 17 a 26 g.

#### 4.4.2. Modelagem termodinâmica do equilíbrio líquido-vapor

As condições de processo necessárias para executar a EFS envolvem importantes aspectos termodinâmicos, tais como as forças atrativas e repulsivas entre as moléculas de solvente e de soluto. Estas forças têm efeitos importantes no equilíbrio líquido-vapor da mistura e são, frequentemente, negligenciadas em equações de solubilidade empíricas e semi-empíricas (Chrastil, 1982). Além disso, modelos que estimam a solubilidade diretamente a partir de dados de EFS possuem um caráter dinâmico onde os critérios de isofugacidade de Gibbs não são atendidos. Para avaliar essas limitações, experimentos de Equilíbrio líquido-vapor (ELV) foram realizados e os parâmetros de interação binária estimados usando a equação de estado de Peng-Robinson (PR-EOS) acoplada a regra de mistura de van der Waals com dois parâmetros de interação binária (vdW2) (Peng e Robinson, 1976) (Equações 4.3 e 4.4).

$$a = \sum_i \sum_j z_i z_j \sqrt{a_i a_j} (1 - k_{ij}) \quad (4.3)$$

$$b = \sum_i \sum_j z_i z_j \frac{1}{2} (b_i + b_j) (1 - n_{ij}) \quad (4.4)$$

Considerando a alta concentração de cardanol presente no LCC, a solubilidade foi calculada considerando que o extrato é um supercomponente cujas propriedades físico-químicas podem ser descritas pelas propriedades puras do

cardanol. As propriedades dos compostos puros usados para a modelagem são mostradas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Dados do experimento de ELV para o CO<sub>2</sub> (1)/ Cardanol (2)

Componente	M <sub>w</sub> (g/gmol)	T <sub>b</sub> (K)	T <sub>c</sub> (K)	P <sub>c</sub> (kPa)	w
CO <sub>2</sub>	44,01 <sup>a</sup>	194,7 <sup>a</sup>	304,1 <sup>a</sup>	7380 <sup>a</sup>	0,239 <sup>a</sup>
Cardanol	304,5 <sup>b</sup>	787,2 <sup>b</sup>	980,6 <sup>b</sup>	1320 <sup>b</sup>	0,993 <sup>b</sup>

(a) Reid et al., 1987; (b) Setianto et al., (2009).

Para estimar os parâmetros binários a partir das regras de mistura, a Equação 4.5 foi utilizada como função objetivo a ser minimizada.

$$OF = \frac{100}{N_p} \sum \left( \frac{P_{calc} - P_{exp}}{P_{exp}} \right)^2 \quad (4.5)$$

Onde,  $P_{calc}$  é a pressão calculada,  $P_{exp}$  a pressão experimental e  $N_p$  o número de pontos experimentais.

#### 4.5. Transferência de massa

O modelo matemático proposto por Sovová (2005) foi utilizado com o objetivo de estimar os parâmetros de transferência de massa associados à EFS do cardanol. Este modelo é baseado no conceito de células quebradas e intactas e basicamente simula dois períodos de extração, sendo adequado para o caso de extração de óleo essencial, cuja característica é encontrar-se em pequenas quantidades na matriz vegetal, o que leva ao equilíbrio controlado pela interação soluto-matriz. A autora considera diferentes formas para o equilíbrio de fases, assumindo que a resistência à transferência de massa dentro do fluido é nula e a quantidade inicial de soluto livre não é suficiente para saturar o solvente. As seguintes equações modelam o fenômeno de transferência de massa (Equações 4.6 e 4.7):

$$e = q \frac{Kx_u}{1 + K(\gamma/r)} \quad \text{para} \quad 0 \leq q \leq q_c \quad (4.6)$$

$$e = x_u[1 - C_1 \exp(-C_2 q)] \quad \text{para} \quad q > q_c \quad (4.7)$$

Onde,  $e$  é o rendimento de extração (kg(extrato) kg(sólido insolúvel)<sup>-1</sup>),  $q$  a quantidade relativa do solvente (kg(solvente) kg(sólido insolúvel)<sup>-1</sup>),  $K$  o coeficiente de partição,  $x_u$  é a concentração nas partículas sólidas intactas (kg(soluto) kg(sólido insolúvel)<sup>-1</sup>),  $C_1$  e  $C_2$  são constantes do modelo,  $q_c$  é a quantidade relativa do solvente na transição (kg(solvente) kg(sólido insolúvel)<sup>-1</sup>),  $\gamma$  é a razão solvente-matriz do leito (kg(solvente) kg(sólido insolúvel)<sup>-1</sup>) (Equação 4.8) e  $r$  é a eficiência de disponibilidade do soluto (Equação 4.9).

$$\gamma = \rho_f \epsilon / [\rho_s (1 - \epsilon)] \quad (4.8)$$

Onde,  $\rho_f$  é a densidade do solvente (kg m<sup>-3</sup>),  $\rho_s$  é a densidade do sólido (kg(sólido insolúvel) m(fase sólida)<sup>-3</sup>) e  $\epsilon$  é a fração vazia do leito.

As estimativas de eficiência de disponibilidade do soluto e dos coeficientes de transferência de massa da fase sólida podem ser obtidas com a Equação 4.9 e a Equação 4.10, respectivamente. Onde  $\epsilon$  é a fração vazia do leito,  $Q$  a vazão do solvente (kg s<sup>-1</sup>),  $N_m$  a carga do sólido insolúvel (kg),  $a_s$  é a área específica entre as regiões de células intactas e quebradas (m<sup>-1</sup>) e  $k_s$  é o coeficiente de transferência de massa da fase sólida (m s<sup>-1</sup>).

$$r = 1 - C_1 \exp(-C_2 q_c) \quad (4.9)$$

$$k_s a_s = \frac{(1 - r)(1 - \epsilon) \dot{Q} C_2}{N_m [1 - ((1 - r) C_2 / K)]} \quad (4.10)$$

Para permitir a introdução dos valores de solubilidade calculados considerando os critérios de isofugacidade, o modelo de Sovová (2005) foi ligeiramente adaptado pela introdução de uma constante adimensional. Esta modificação visa compensar quaisquer desvios químicos, mecânicos e/ou térmicos que possam afetar o equilíbrio do processo. Essas mudanças são descritas nas Equações 4.11 e 4.12.

$$y_0 = y_s C_3 \quad (4.11)$$

$$K = \frac{y_s C_3 r}{(r x_u - y_s C_3 \gamma)} \quad (4.12)$$

## 4.6. Técnicas de caracterização dos extratos

### 4.6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos de cardanol obtidos a partir das extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Esta técnica foi utilizada a fim de confirmar a presença de cardanol no extrato com base nos tempos de retenção, bem como para determinar a quantidade relativa de cardanol presente no extrato mediante à determinação das áreas dos picos indicados nos cromatogramas.

O método de análise foi baseado na literatura (Paramashivappa et al., 2001). As análises foram realizadas em um sistema CLAE Agilent, modelo 1200 Series com detector UV e uma coluna C18 (Zorbax Eclipse XDB - Agilent, 4,6x250 mm, 5µm). A fase móvel foi composta por acetonitrila, água Milli-Q (Millipore) e ácido acético glacial na composição de 80:20:1, respectivamente, em uma vazão de 1 mL/min. A injeção de amostra foi de 10 µL e a absorbância foi monitorada em 280 nm.

### 4.6.2. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

A análise da composição química do extrato obtido a partir das extrações supercríticas foi realizada em um cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massa (CG/EM); equipamento Hewlett Packard - Agilent sistema CG/EM (GC/MS em inglês), CG modelo 7890A e EM modelo 5975C. Para isso, primeiramente, os extratos foram desidratados usando sulfato de sódio anidro e diluídos em ciclohexano na proporção de 1:100. A coluna capilar foi HP-5MS revestida com 5% de fenil metil silox com 30 m x 250 µm de diâmetro interno com espessura de filme de 0,25 µm.

O gás de arraste utilizado foi hélio ultra puro com fluxo de 1,7 mL/min, temperatura do injetor de 280 °C, volume de injeção de 1 µL, no modo split, razão de split 1:10. O método de análise inicia a uma temperatura de 60 °C, que se mantém durante 1 min, aumentando a 4 °C/min até 120 °C, mantendo esta temperatura por 2 min, aumentando a 20 °C/min até 300 °C e mantendo essa temperatura por 3 min. A voltagem de ionização por impacto de elétrons foi 70 eV e a faixa de massa analisada foi de 40 a 450 u. Essa metodologia foi proposta por Andrade et al. (2011).

Os compostos presentes foram identificados por comparação dos espectros de massa registrados com os fornecidos pelo banco de dados do espectrômetro (NIST, 2005), bem como comparando os índices de retenção e os espectros de massa com dados da literatura (Kumar et al., 2002). O teor relativo de constituintes do extrato foi determinado pelo método de normalização da área de pico e expresso em porcentagem.

#### **4.6.3. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)**

O extrato rico em cardanol, obtido a partir da extração supercrítica com CO<sub>2</sub>, bem como o cardanol padrão comercial foram analisados por RMN <sup>1</sup>H em espectrômetro (Ascend 400, Bruker) com frequência de 300 MHz, em clorofórmio deuterado. Os deslocamentos químicos foram expressos em relação ao sinal do TMS (tetrametilsilano), composto de referência (0,00 ppm). A análise por RMN <sup>1</sup>H foi realizada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LABMAG) localizado na Escola Politécnica/PUCRS.

#### **4.6.4. Ensaios *in Vitro***

O extrato obtido através da extração supercrítica foi analisado quanto à viabilidade celular (MTT). O ensaio foi realizado no Laboratório de Farmacologia Aplicada (LAFAP) da Escola de Ciências da Saúde e da Vida/PUCRS. São descritos, a seguir, o procedimento para a cultura e a manutenção celular, o procedimento do ensaio, bem como as análises estatísticas utilizadas no tratamento dos resultados.

#### 4.6.4.1. Cultura e manutenção das células

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram de carcinoma de células transicionais de bexiga humana (T24), células de glioma (M059J) e células renais de macaco verde africano (Vero), obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*).

O critério para defini-las foi baseado no grau de malignidade. O glioblastoma é um tumor cerebral maligno e frequente decorrente das células da glia, sendo que a célula de glioma apresenta notável capacidade de migração, que está associada ao rápido crescimento tumoral e invasividade (Nicoletti et al., 2017); a linhagem T24 de tumor de bexiga humana tem sido usada como modelo de tumor maligno-invasivo de bexiga, uma vez que as células T24 são derivadas de carcinoma de células transicionais com potencial metastático de grau III (Castiglioni et al., 2015) e a célula Vero tem sido utilizada como modelo não-tumoral, em estudos pré-clínicos, para verificar a toxicidade de compostos químicos frente às células saudáveis (Ammerman et al., 2008).

As células T24 e Vero foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e a linhagem M059J foi cultivada em meio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*), ambos os meios contendo 0,5 U/mL dos antibióticos penicilina/estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantida em temperatura de 37 °C, com umidade relativa do ar de 95% e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para a realização dos experimentos, as células foram tripsinizadas e plaqueadas conforme a necessidade.

#### 4.6.4.2. Preparação das amostras

O extrato escolhido para a realização deste estudo foi o obtido na temperatura e pressão de, respectivamente, 50 °C e 150 bar, já que, esta condição apresentou o maior rendimento de extração comparado àqueles adquiridos nas demais condições avaliadas, conforme descrito na seção 4.3.1. Foi realizada a dissolução deste extrato em DMSO e uma solução na concentração de 179.800 µg/mL foi preparada. Na sequência, foi realizada uma diluição dessa solução para a concentração de 40.000 µg/mL e, esta, por sua vez, foi diluída a uma

solução de 200 µg/mL. Finalmente, a partir desta solução, foram preparados os tratamentos a partir da realização de diluições em diferentes concentrações. A Figura 4.6 ilustra o esquema representativo do preparo das amostras.

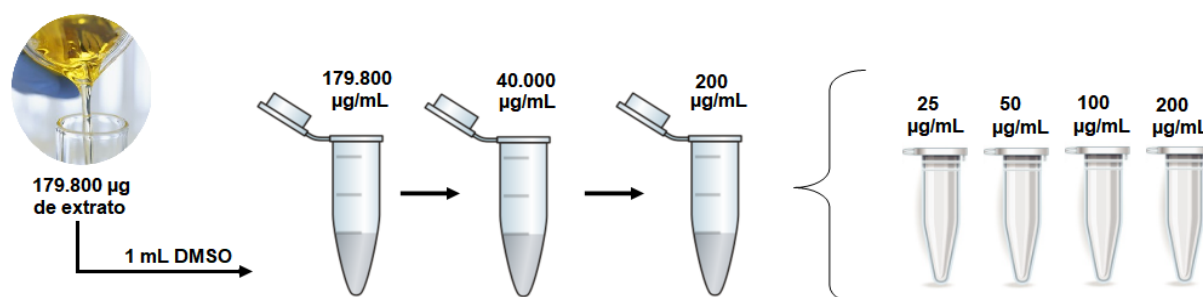


Figura 4.6. Esquema representativo do preparo das amostras.

#### 4.6.4.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi analisada por método colorimétrico que mede a atividade mitocondrial resultante da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), de coloração amarela, em Formazan, de coloração roxa (Figura 4.7).

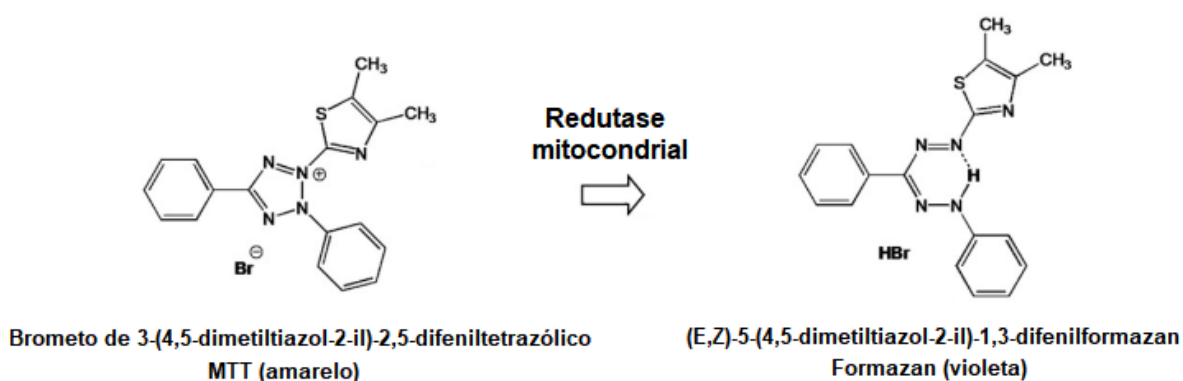


Figura 4.7. Reação de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) (Adaptada de Stockert et al., 2012).

Para a avaliação da viabilidade celular, as linhagens T24, M059J e Vero foram plaqueadas em uma densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços. Decorridas 24 h após o plaqueamento, as células foram expostas a concentrações crescentes de cardanol (25, 50, 100 e 200 µg/mL) por 24 h.



Após 24 h de incubação, as células foram lavadas com PBS. Na sequência, às células foram adicionados 100 µL de solução de MTT 0,5% por poço. Após 4 h de incubação, o MTT foi removido e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 24 h, para secagem. Posteriormente, os cristais de Formazan formados foram solubilizados em 100 µL de DMSO. A densidade óptica de coloração foi determinada por espectrofotômetro (VICTOR da PerkinElmer - USA) em um comprimento de onda  $\lambda=490$  nm. Os resultados foram determinados em percentual da absorbância dos tratados em relação ao grupo que não recebeu tratamento (controle).

#### 4.6.4.4. Determinação dos valores de IC<sub>50</sub>

A concentração necessária para inibir a viabilidade das células M059J, T24 e Vero em 50% (IC<sub>50</sub>) foi determinada em relação às células não tratadas (grupo controle). Os cálculos dos valores de IC<sub>50</sub> foram realizados a partir da plotagem do percentual de inibição em relação ao logaritmo das concentrações das soluções de cardanol.

#### 4.6.4.5. Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e as análises estatísticas foram realizadas através do teste t de *Student* por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo *poshoc* de Tukey. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados como indicativos de significância. O *software* utilizado foi o Graphprism 8.0.

### 4.7. Filmes biodegradáveis de PLGA

#### 4.7.1. Preparação dos filmes biodegradáveis de PLGA

Os filmes biodegradáveis foram preparados por meio da técnica de evaporação de solvente. Foram preparados filmes de PLGA com três quantidades diferentes de extrato: 710 µg, 1430 µg e 2860 µg, correspondendo a 0,354%, 0,710% e 1,410% da massa total do filme, respectivamente, além dos filmes de PLGA puros. Foram preparadas 6 amostras de cada filme.

O objetivo de preparar filmes com diferentes quantidades de extrato é comparar os perfis de liberação do extrato (cardanol) a partir da matriz polimérica, bem como avaliar as propriedades dos filmes determinadas com base nas técnicas de caracterização (MEV-FEG, FTIR, DSC e ângulo de contato).

Para o preparo dos filmes de PLGA puros, foram dispersos 0,2 g de PLGA em 7 mL de clorofórmio. A fim de promover a solubilização do PLGA, a mistura foi deixada por 4 h, em temperatura ambiente, em banho de ultrassom de 40 kHz (Eco-Sonics, modelo 5.9/40). Após, a dispersão final foi vertida em placa de vidro Petri (Ø 5 cm) e, em uma bancada de nível horizontal, o solvente foi evaporado por 48 h em temperatura ambiente. Na sequência, os filmes foram mantidos por 8 h sob vácuo (TECNAL, modelo TE-058) para a eliminação completa do solvente.

Usando a mesma metodologia, foram preparados os filmes de PLGA contendo cardanol incorporado. Para tanto, à dispersão de PLGA, após permanecer por 4 h em banho de ultrassom, foram introduzidas quantidades determinadas de cardanol a partir da adição de volumes definidos de uma solução de cardanol em DMSO na concentração de 10.000 µg/mL (solução A), conforme mostra a Tabela 4.4. A mistura foi mantida por mais 3 h em banho de ultrassom, em temperatura ambiente. Da mesma forma como foi conduzido para os filmes de PLGA puros, a dispersão final foi vertida em placa de vidro Petri (Ø 5 cm) e o solvente evaporado por 48 h em temperatura ambiente, em bancada de nível horizontal. Finalmente, foi realizada a secagem à vácuo, por 8 h, para a eliminação completa do solvente.

Tabela 4.4. Identificação dos filmes preparados.

<b>Identificação do filme</b>	<b>Volume da solução A (µL)</b>	<b>Massa de cardanol (µg)</b>	<b>Fração mássica (%) de cardanol no filme</b>
F_puro	-	-	0,000
F_710	71	710	0,354
F_1430	143	1430	0,710
F_2860	286	2860	1,410

#### 4.7.2. Ensaio de liberação do Cardanol a partir da matriz de PLGA

Os perfis de liberação de cardanol a partir dos filmes de PLGA com frações mássicas de cardanol de 0,354%, 0,710% e 1,410% foram estudados.

Os filmes foram incubados a 37 °C em 25 mL de PBS (pH 7,4) contendo 1,5% (m/m) de Tween-20 como surfactante, para aumentar a solubilidade do cardanol na solução, e agitados em uma cuba agitadora (Banho Maria com Agitação tipo Dubnoff; modelo SL – 157) a temperatura de 37 °C e 15 rpm. Em intervalos de tempo pré-determinados (1, 2, 3, 4, 5, 7, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53 e 55 h), 1,5 mL da solução foram coletados e 1,5 mL de solução de PBS (pH 7,4) fresca foram adicionados aos erlenmeyers. O experimento de liberação foi realizado em triplicata. A quantificação do cardanol liberado foi determinada por espectrofotometria. O comprimento de onda aplicado no experimento foi de  $\lambda=275$  nm, obtido experimentalmente, utilizando um espectrofotômetro com varredura para soluções de cardanol em PBS (pH 7,4) contendo 1,5% (m/m) de Tween-20.

Após a definição do comprimento de onda, foi construída a curva de calibração da concentração do cardanol versus absorvância, utilizando diferentes concentrações de soluções de cardanol em PBS (pH 7,4) contendo 1,5% (m/m) de Tween-20. A Figura 4.8 apresenta a curva de calibração gerada com um coeficiente de determinação de  $R^2 = 0,9991$ .

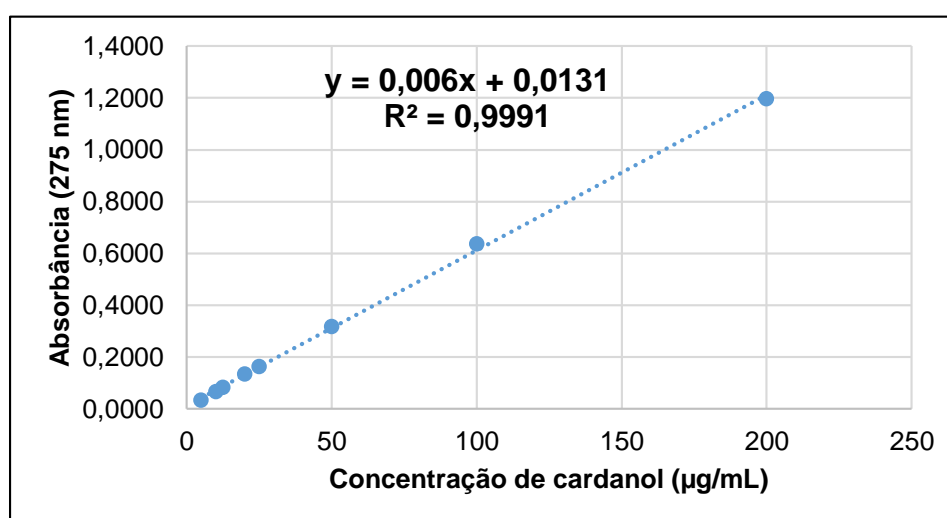


Figura 4.8. Curva padrão de cardanol.

#### 4.7.2.1. Cinética de liberação do Cardanol a partir da matriz de PLGA

Para análise do comportamento de liberação do cardanol foi utilizado o modelo teórico descrito por Peppas (1985) para liberação de fármacos de sistemas poliméricos. O equacionamento de Peppas (1985), como ficou conhecido, é um dos equacionamentos semi-empíricos mais utilizados para representar uma grande diversidade de situações. Gráficos de massa acumulada *versus* tempo foram levantados e ajustados à equação de Peppas (1985) (Equação 4.13).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4.13)$$

Onde,  $M_t$  é a massa acumulada em um determinado tempo,  $M_\infty$  é a massa no tempo infinito,  $t$  é o tempo,  $k$  é uma constante que incorpora efeitos estruturais e geométricos e  $n$  a ordem da cinética de entrega.

Os parâmetros ajustáveis,  $k$  e  $n$ , foram estimados pela minimização dos erros entre os valores experimentais através do método simplex de Nelder-Mead (Lagarias et al., 1998), calculado com o auxílio do *toolbox* de otimização do Matlab®.

A fim de relacionar a geometria do sistema com o mecanismo de liberação, valores para  $n$  foram apresentados por Siepmann e Siepmann (2008) (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Valores do expoente  $n$  para a equação de Peppas (1985) e o mecanismo de liberação para diferentes geometrias.

Expoente $n$			Mecanismo de liberação
Filme fino	Cilindro	Esfera	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte Anômalo
1	0,89	0,85	Intumescimento polimérico

Fonte: Adaptado de Siepmann e Siepmann, (2008).

### 4.7.3. Técnicas de caracterização dos filmes biodegradáveis de PLGA

#### 4.7.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)

As morfologias das superfícies dos filmes produzidos foram analisadas por MEV-FEG, no LabCEMM/PUCRS, em um microscópico modelo Inspect F50 (FEI Company). As amostras a serem caracterizadas foram fixadas com uma fita de carbono dupla face condutora sobre um suporte (stub) e, posteriormente, recobertas com ouro em um metalizador Quorum Q-150R/ES. As micrografias foram registradas no modo de elétrons secundários usando onda elétrica com 20 kV (tensão de aceleração). Os aumentos variaram de 100x até 5.000x para observação das características topográfica dos materiais analisados.

#### 4.7.3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de LCC técnico, de cardanol comercial e do extrato obtido na condição de 150 bar/50 °C, bem como os filmes biodegradáveis preparados, foram caracterizados estruturalmente por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR). Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer – Spectrum One, localizado na Escola Politécnica/PUCRS, na região de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.7.3.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e de fusão ( $T_f$ ) dos filmes foram determinadas usando um equipamento de DSC (modelo DSC Q2000, TA Instruments) localizado na Escola Politécnica/PUCRS. A faixa de temperatura utilizada foi de 10 a 250 °C com taxa de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min, sob atmosfera de gás nitrogênio. O ciclo de aquecimento foi executado duas vezes, sendo que o primeiro foi realizado com a finalidade de eliminar a história térmica do polímero e apenas o segundo aquecimento foi considerado.

#### 4.7.3.4. Determinação do ângulo de contato

As medidas do ângulo de contato estático da água foram realizadas usando um goniômetro (Phoenix 300, SEO - Surface Electro Optics Co., Ltd.) que está localizado na Escola Politécnica/PUCRS. Todas as imagens foram capturadas 5 s após as gotas de água tocarem a superfície da amostra, a fim de obter medições a partir de gotas de água sésseis inalteradas. Seis gotas de água deionizada foram aplicadas em diferentes pontos de cada filme para calcular o valor médio dos ângulos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico

#### 5.1.1. Rendimento das extrações e pureza dos extratos

Os extratos obtidos a partir da extração supercrítica no vaso de alta pressão e no equipamento em escala piloto foram pesados em uma balança analítica para o cálculo do rendimento de extração. A composição química dos extratos foi analisada por CLAE.

O cromatograma da literatura (Costa et al., 2019) foi utilizado como referência para a comparação dos perfis cromatográficos, sendo os picos de números 7, 10 e 11, correspondentes às formas pentadecatrienil, pentadecadienil e pentadecenil do cardanol, respectivamente (Figura 5.1).

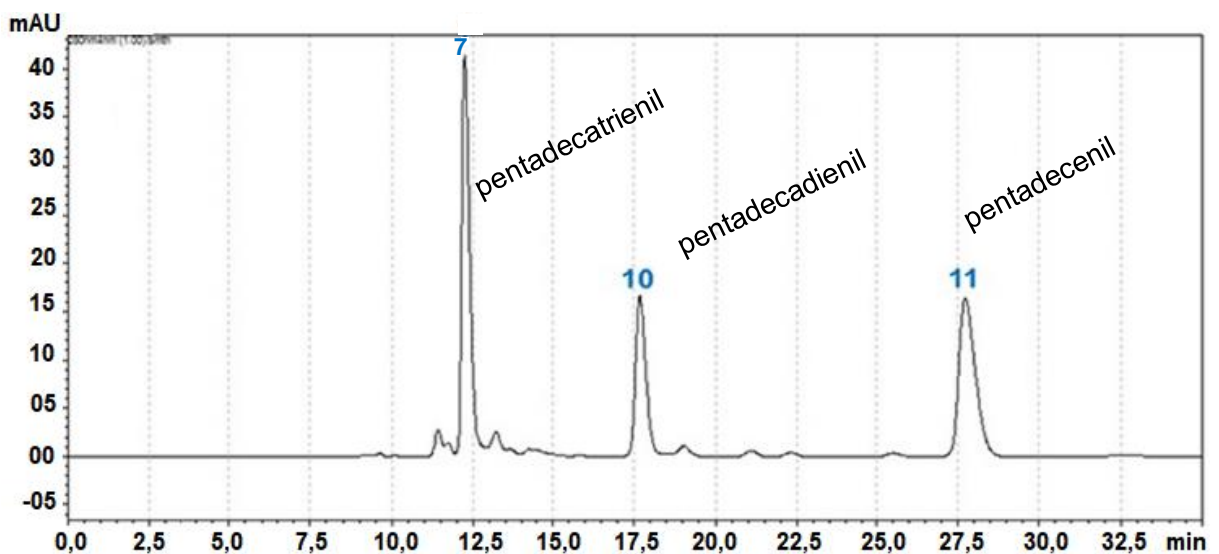


Figura 5.1. Cromatograma de CLAE da mistura de cardanóis isolados a partir do LCC técnico (Costa et al., 2019).

A partir do cromatograma de CLAE do LCC técnico obtido por Costa et al. (2019), foi realizada a análise do cromatograma do LCC técnico utilizado nesta tese. Constata-se a presença de três picos intensos com tempos de retenção de 12,002 min; 17,556 min e 28,135 min que correspondem às formas pentadecatrienil, pentadecadienil e pentadecenil do cardanol, respectivamente. Essas estruturas correspondem a 73% da composição original do LCC técnico utilizado nesta tese, como mostra o cromatograma de CLAE (Figura 5.2).

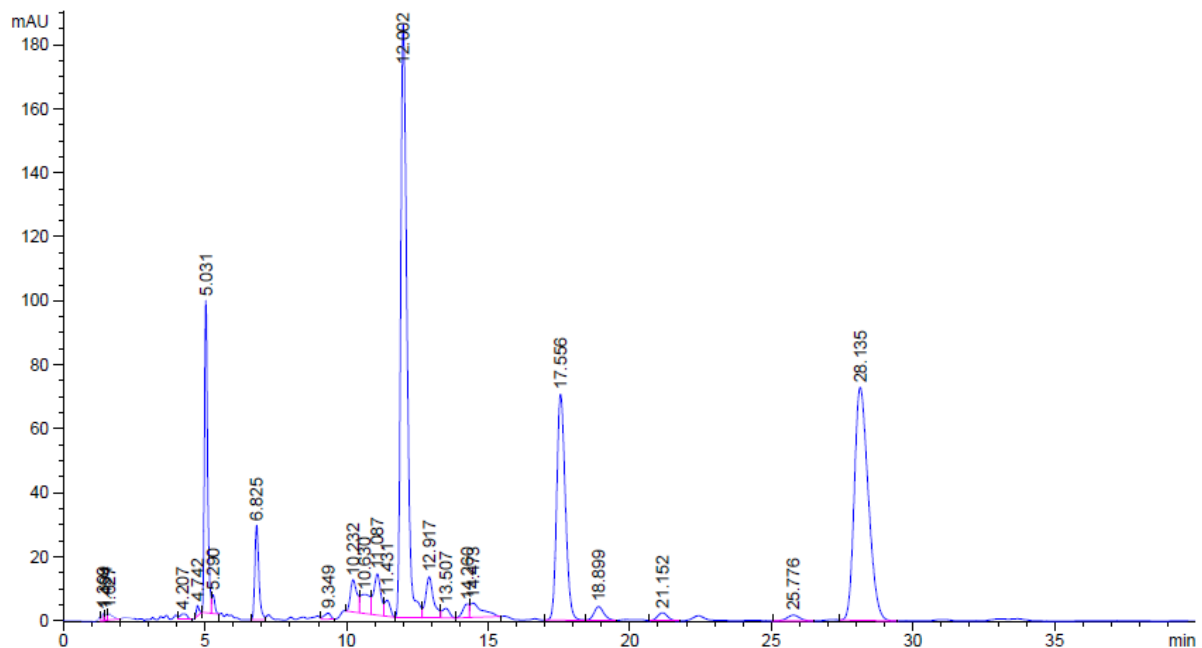


Figura 5.2. Cromatograma de CLAE do LCC técnico utilizado nesta tese.

#### 5.1.1.1. Extração no vaso de alta pressão

Para verificar a viabilidade do método de extração do cardanol a partir do LCC com CO<sub>2</sub> supercrítico, foram realizados seis experimentos no vaso de alta pressão. A Tabela 5.1 apresenta as condições experimentais juntamente com os respectivos rendimentos da extração e pureza do extrato em relação ao cardanol (concentração de cardanol).

A capacidade de extração do solvente sob estado supercrítico é dependente da densidade, sendo esta modificada pelas variáveis temperatura e pressão. A maior densidade de CO<sub>2</sub> resultará em maior capacidade de extração, já que a densidade do



solvente influencia a solubilidade do soluto (Lochab et al., 2014; Yuliana et al., 2012; Patel et al., 2011; Philip et al., 2008).

Tabela 5.1. Dados da extração supercrítica no vaso de alta pressão.

Experimento	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rendimento (%) ( $m_{\text{extrato}}/m_{\text{LCC}} \cdot 100$ )	Pureza em cardanol*
1	35	80	22	92
2	55	80	3	88
3	35	120	11	84
4	55	120	18	83
5	35	200	34	82
6	55	200	46	79

\*Os resultados são expressos em porcentagens de área de cada pico em relação à área total dos picos do cromatograma.

Com os resultados obtidos (Tabela 5.1), é possível afirmar que a condição experimental na qual foi obtido o maior rendimento de extração corresponde a de 55 °C/ 200 bar, indicando que, nesta condição, existe uma maior solubilidade dos compostos presentes no LCC em meio supercrítico. No entanto, nesta condição (55 °C/200 bar), a densidade do CO<sub>2</sub> corresponde a 0,755 g/mL, valor próximo, porém inferior, ao referente para a condição de 35 °C/200 bar (0,865 g/mL). Portanto, esperava-se que o maior rendimento de extração fosse obtido na condição de 35 °C/200 bar. Destaca-se, todavia, que os maiores rendimentos foram obtidos nas condições de temperatura e pressão referentes à maior densidade do CO<sub>2</sub>, sendo que, na condição de 35 °C/200 bar, foram removidos 38% do cardanol presente no LCC técnico inicialmente empregado; e na condição de 55 °C/200 bar, este percentual subiu para 50%.

Além disso, constata-se que o menor rendimento de extração (3%) foi obtido na condição de 55 °C/80 bar, sendo este resultado o esperado, já que, nesta condição, o CO<sub>2</sub> apresenta o menor valor de densidade (0,204 g/mL) comparado aos valores de densidade de CO<sub>2</sub> referentes às demais condições avaliadas.

Em relação à pureza dos extratos em cardanol (concentração de cardanol), observa-se que, embora na condição de 55 °C/200 bar tenha sido constatado o maior

rendimento de extração, nesta condição, o processo não foi seletivo para o cardanol, apresentando a menor pureza do extrato obtido nas condições investigadas. A melhor seletividade foi obtida na condição de 35 °C/ 80 bar, contendo 92% de cardanol na composição do extrato obtido, valor este superior ao encontrado na literatura quando submetido ao processo de fracionamento por coluna (Yuliana et al., 2014; Gonçalves et al., 2016).

A Figura 5.3 apresenta o cromatograma do extrato obtido na condição de 35 °C/80 bar, que resultou em 92% de cardanol. Foram observados três picos característicos com tempos de retenção de 11,979 min; 17,525 min e 28,081 min que correspondem às formas pentadecatrienil, pentadecadienil e pentadecenil do cardanol, respectivamente.

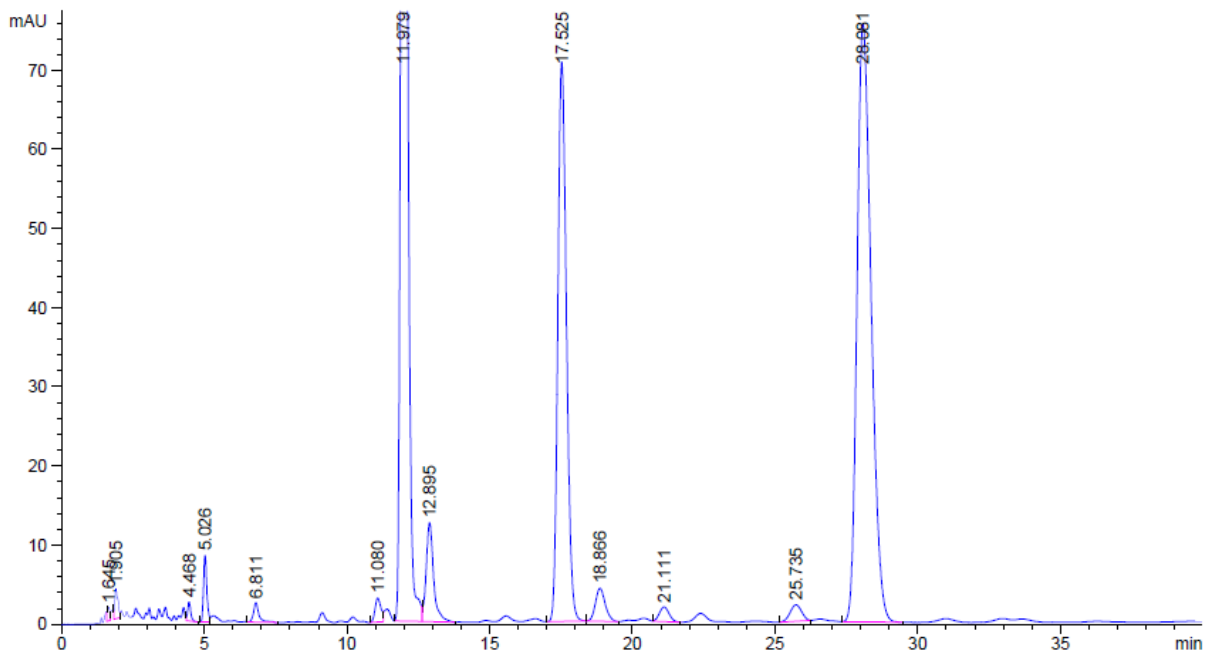


Figura 5.3. Cromatograma de CLAE do extrato obtido a 80 bar e 35 °C.

A comparação entre os cromatogramas das Figuras 5.2 e 5.3 permitiu constatar que o processo de extração do cardanol a partir do LCC com CO<sub>2</sub> supercrítico foi eficaz para a obtenção de cardanol com alto grau de pureza, representando uma tecnologia limpa e promissora para extração dos constituintes fenólicos do LCC.

### 5.1.1.2. Extração no equipamento em escala piloto

Diante da confirmação da viabilidade do método a partir dos resultados obtidos através da extração supercrítica no vaso de alta pressão, foi dado seguimento ao trabalho com a realização das extrações utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico no equipamento em escala piloto.

Inicialmente, foram realizadas extrações com o objetivo de investigar uma condição adequada de temperatura e pressão que promova maior rendimento, bem como que resulte em extratos com maior concentração de cardanol.

A Tabela 5.2 apresenta as condições experimentais juntamente com os respectivos rendimentos da extração e pureza do extrato em cardanol (concentração de cardanol) obtidos a partir da investigação da influência da pressão a temperatura constante de 55 °C.

Tabela 5.2. Dados da extração supercrítica no equipamento em escala piloto a temperatura constante de 55 °C e vazão de CO<sub>2</sub> de 1000 g/h.

Experimento	Pressão (bar)	Rendimento (%) ( $m_{\text{extrato}}/m_{\text{LCC}} \cdot 100$ )	Pureza em cardanol*
1	80	0,26	63
2	120	4,29	89
3	150	20,10	84
4	200	17,57	71

\*Os resultados são expressos em porcentagens de área de cada pico em relação à área total dos picos do cromatograma.

A partir dos resultados mostrados na Tabela 5.2, observa-se que, na temperatura de 55 °C, foram obtidos os maiores, e muito próximos, valores de rendimento de extração, nas condições de pressão de 150 bar (20,10%) e 200 bar (17,57%). Nestas condições, foram removidos, respectivamente, 23% e 17% do cardanol presente no LCC técnico inicialmente empregado. Este resultado era esperado, visto que, nestas condições, o CO<sub>2</sub> apresenta os maiores valores de densidade comparados aos referentes às demais condições, sendo de 0,655 g/mL para o CO<sub>2</sub> a 55 °C/150 bar e 0,755 g/mL para o CO<sub>2</sub> a 55 °C/200 bar.

Dentre as condições de pressão avaliadas, na temperatura de 55 °C, os menores valores de rendimento de extração, bem como de concentração de cardanol no extrato, foram obtidos na pressão de 80 bar. O resultado referente ao rendimento está coerente, visto que, nesta condição, a densidade do CO<sub>2</sub> corresponde a 0,204 g/mL, inferior aos valores de densidade do CO<sub>2</sub> nas demais condições avaliadas.

Acrescenta-se ainda que, em relação à concentração de cardanol (pureza em cardanol), observa-se que a maior concentração foi obtida na pressão de 120 bar, correspondendo a 89%, superior aos valores obtidos nas condições de maior pressão, 150 bar e 200 bar, referentes à 84% e 71%, respectivamente.

Ao comparar os cromatogramas de CLAE determinados para os extratos obtidos a 120 bar (Figura 5.4) e a 150 bar (Figura 5.5), observam-se três picos característicos com tempos de retenção de 11,984 min; 17,578 min; 28,111 min para 120 bar e 11,980 min; 17,589 min; 28,100 min para 150 bar. Esses picos, correspondem, respectivamente às formas pentadecatrienil, pentadecadienil e pentadecenil do cardanol, como mencionado anteriormente.

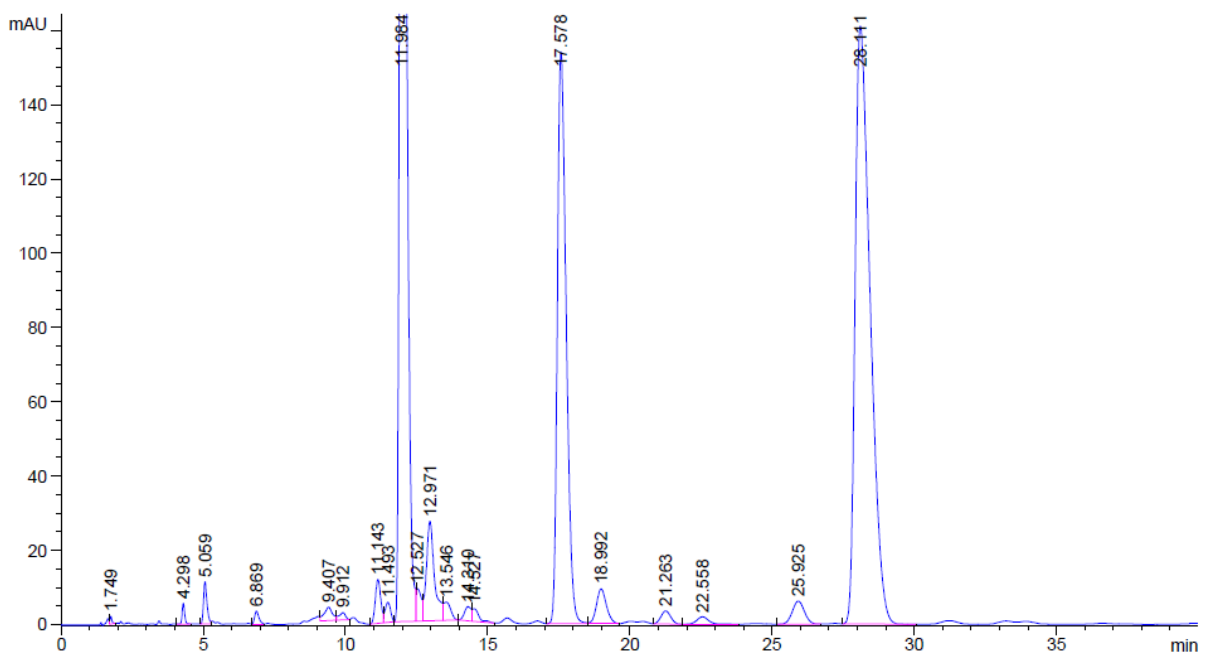


Figura 5.4. Cromatograma de CLAE do extrato obtido a 120 bar e 55 °C.

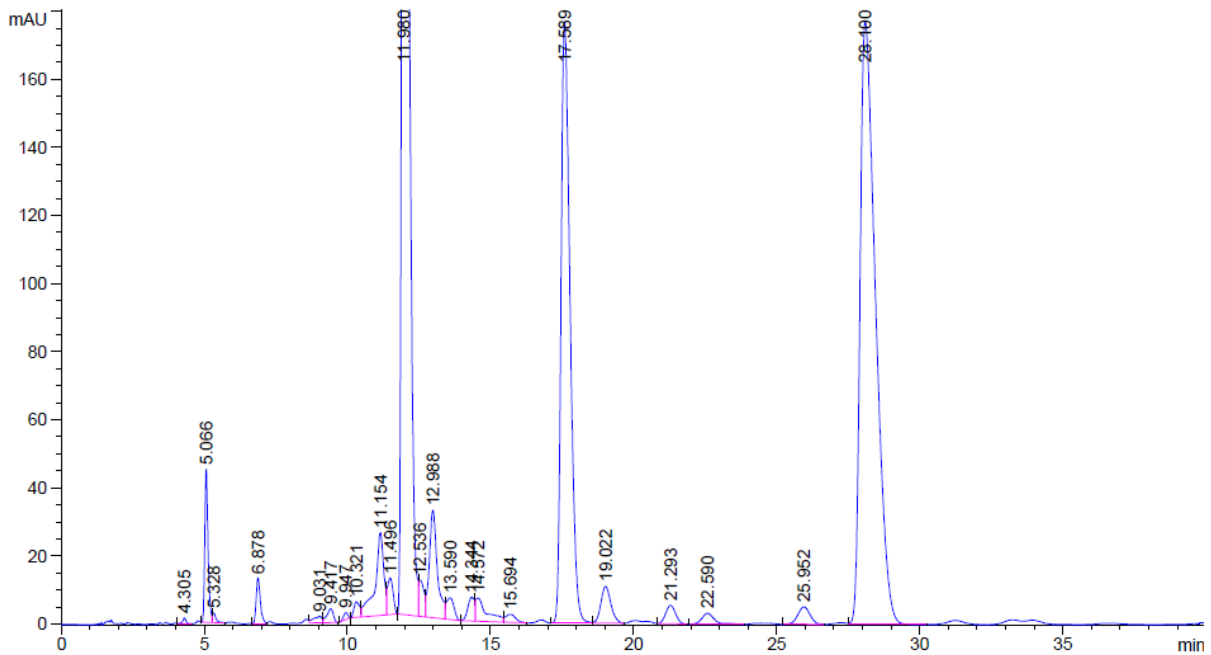


Figura 5.5. Cromatograma de CLAE do extrato obtido a 150 bar e 55 °C.

A partir da comparação entre os resultados de rendimento de extração e os de pureza do extrato em cardanol obtidos no vaso de alta pressão (Tabela 5.1) e no equipamento em escala piloto (Tabela 5.2) observam-se alterações significativas nos valores de rendimento dependendo da forma da condução da extração, enquanto que os valores de pureza são menos afetados pelo tipo de procedimento experimental adotado. Em relação aos valores de percentual de pureza de cardanol no extrato, observa-se que os resultados obtidos no equipamento em escala piloto foram inferiores aos determinados a partir das extrações no vaso de alta pressão nas condições de 55 °C/80 bar e de 55 °C/200 bar, sendo estes percentuais de redução de 28% e 10%, respectivamente. No entanto, na condição de 55 °C/120 bar, constatou-se um aumento de 7% no percentual de pureza de cardanol no extrato obtido no equipamento em escala piloto comparado ao obtido no vaso de alta pressão.

Considerando os resultados obtidos a partir das extrações no equipamento em escala piloto, na temperatura de 55 °C, observa-se que os maiores rendimentos de extração foram atingidos quando as extrações foram realizadas em maiores condições de pressão (150 bar e 200 bar). No entanto, ao aumentar a pressão para 200 bar, a concentração de cardanol no extrato obteve uma redução de 15%, comparada à

concentração de cardanol alcançada a 150 bar (Tabela 5.2). Diante disso, os experimentos seguintes foram realizados na pressão de 150 bar.

A Tabela 5.3 apresenta as condições experimentais juntamente com os respectivos rendimentos de extração e pureza do extrato em relação ao cardanol obtidos a partir da investigação da influência da temperatura a pressão constante de 150 bar.

Tabela 5.3. Dados da extração supercrítica no equipamento em escala piloto a pressão constante de 150 bar e vazão de CO<sub>2</sub> de 1000 g/h.

Experimento	Temperatura (°C)	Rendimento (%) ( $m_{\text{extrato}}/m_{\text{LCC}} \cdot 100$ )	Pureza em cardanol*
5	50	24,10	72
6	60	5,50	77
7	70	1,20	61

\*Os resultados são expressos em porcentagens de área de cada pico em relação à área total dos picos do cromatograma.

Os resultados relatados na Tabela 5.3 revelam que, a 150 bar, houve uma redução do rendimento de extração, com o aumento da temperatura. Este resultado está coerente com os valores de densidade do CO<sub>2</sub>, sendo correspondentes a 0,701 g/mL; 0,605 g/mL e 0,506 g/mL nas condições de 50 °C/150 bar, 60 °C/150 bar e 70 °C/150 bar, respectivamente. Conforme o esperado, com o aumento da densidade, observa-se um aumento no rendimento de extração.

No que se refere ao teor de pureza do extrato em cardanol, observa-se que o maior resultado foi obtido na condição de 60 °C/150 bar, correspondendo a 77%, valor próximo ao obtido na condição de 50 °C/150 bar (72%).

Considerando que o maior rendimento de extração foi obtido na condição de 50 °C/150 bar, a partir da qual foram removidos 24% do cardanol presente no LCC inicialmente empregado, esta foi a condição escolhida para a realização das extrações a fim de obter as curvas de extração. Os extratos obtidos nesta condição de extração, realizada em triplicata, foram reunidos e a análise por CLAE foi realizada, sendo o teor de cardanol no extrato correspondente a 85%. Conforme a Figura 5.6, o extrato

apresenta três picos intensos com tempos de retenção de 13,456 min; 19,987 min e 32,252 min que correspondem às formas pentadecatrienil pentadecadienil e pentadecenil do cardanol, respectivamente.

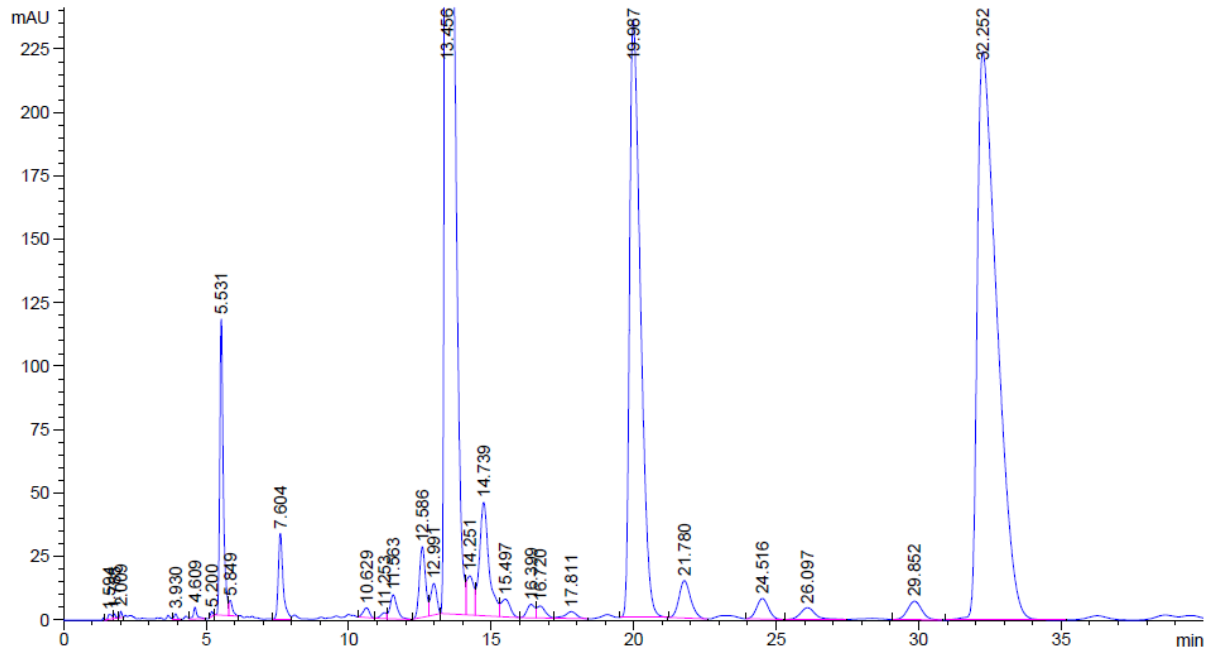


Figura 5.6. Cromatograma de CLAE do extrato obtido a 150 bar e 50 °C.

### 5.1.2. Metodologia de superfície de resposta com planejamento Box-Behnken

O método de superfície de resposta foi empregado a fim de encontrar a condição de processo que forneça a maior quantidade de cardanol por quantidade de LCC comercial investido, cujo componente majoritário refere-se ao cardanol (89%). As variáveis independentes consideradas foram pressão (100 a 200 bar), temperatura (40 a 60 °C) e vazão de solvente (500 a 1500 g/h). O ponto central, correspondente à pressão, temperatura e vazão de solvente de, respectivamente, 150 bar, 50 °C e 1000 g/h foi definido com base nos resultados descritos na seção 5.1.1.

Os resultados do teor de cardanol no LCC ( $\%m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ) para cada condição de extração supercrítica definida no planejamento experimental Box-Behnken são apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Resultados do planejamento de experimento por Box-Behnken no processo de extração de cardanol por fluido supercrítico do LCC.

Exp.	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Vazão de solvente (g/h)	Rendimento da extração (%)	Pureza (%)	Rendimento de cardanol (%)
				$m_{\text{extrato}}/m_{\text{LCC}}$	$m_{\text{cardanol}}/m_{\text{extrato}}$	$m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$
1	150	50	1000	44,26	90,05	39,86
2	100	60	1000	3,61	96,91	3,50
3	200	40	1000	67,79	86,61	58,71
4	100	40	1000	23,52	94,67	22,27
5	150	50	1000	50,27	86,97	43,72
6	150	60	500	16,62	95,29	15,84
7	200	50	500	53,50	89,99	48,15
8	100	50	500	10,32	90,23	9,31
9	100	50	1500	53,60	87,69	47,00
10	200	60	1000	59,63	86,34	51,49
11	200	50	1500	60,99	79,98	48,78
12	150	40	1500	60,48	67,84	41,03
13	150	40	500	39,10	80,50	31,47
14	150	50	1000	46,50	88,64	41,22
15	150	60	1500	37,00	91,22	33,75

Os dados da Tabela 5.4 foram inseridos no software estatístico Minitab<sup>®</sup>, com o qual foi realizada a análise da variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.5.

Conforme os dados da ANOVA, as variáveis pressão e vazão são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) considerando um nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ). O efeito quadrático dessas variáveis ( $P^*P$ ,  $T^*T$  e  $V^*V$ ), bem como as demais interações ( $P^*T$ ,  $P^*V$  e  $T^*V$ ) não são estatisticamente significativas.

Com os resultados experimentais obtidos nas extrações por fluido supercrítico do planejamento experimental Box-Behnken, foi ajustada uma equação polinomial de segunda ordem, utilizando o *software* Minitab<sup>®</sup> (Equação 5.1). A equação apresentada é referente aos valores codificados das variáveis independentes e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,929.



$$\begin{aligned}
 Y = & -1,88 + 0,00384 X_1 + 0,0580 X_2 + 0,000782 X_3 \\
 & + 0,000000 X_1^2 - 0,000770 X_2^2 - 0,000000 X_3^2 \\
 & + 0,000058 X_1X_2 - 0,000004 X_1X_3 + 0,000004 X_2X_3
 \end{aligned}
 \tag{5.1}$$

Onde, Y é o teor de cardanol no LCC ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ );  $X_1$  é a pressão,  $X_2$  é a temperatura e  $X_3$  é a vazão de solvente.

Tabela 5.5. Análise de variância para o teor de cardanol no LCC ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ).

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,343936	0,038215	7,25	0,021
Linear	3	0,279471	0,093157	17,68	0,004
P	1	0,195453	0,195453	37,09	0,002
T	1	0,029891	0,029891	5,67	0,063
V	1	0,054126	0,054126	10,27	0,024
Quadrado	3	0,025045	0,008348	1,58	0,304
P*P	1	0,000003	0,000003	0,00	0,982
T*T	1	0,021873	0,021873	4,15	0,097
V*V	1	0,004213	0,004213	0,80	0,412
Interação com 2 Fatores	3	0,039420	0,013140	2,49	0,175
P*T	1	0,003334	0,003334	0,63	0,462
P*V	1	0,034342	0,034342	6,52	0,051
T*V	1	0,001744	0,001744	0,33	0,590
Erro	5	0,026351	0,005270		
Falta de ajuste	3	0,025584	0,008528	22,24	0,043
Erro puro	2	0,000767	0,000384	*	*
Total	14	0,370287			

A partir da Equação 5.1, foram geradas superfícies de contorno (Figura 5.7) que relaciona a região entre os níveis máximo e mínimo de duas variáveis independentes com a terceira variável independente mantida no nível central.

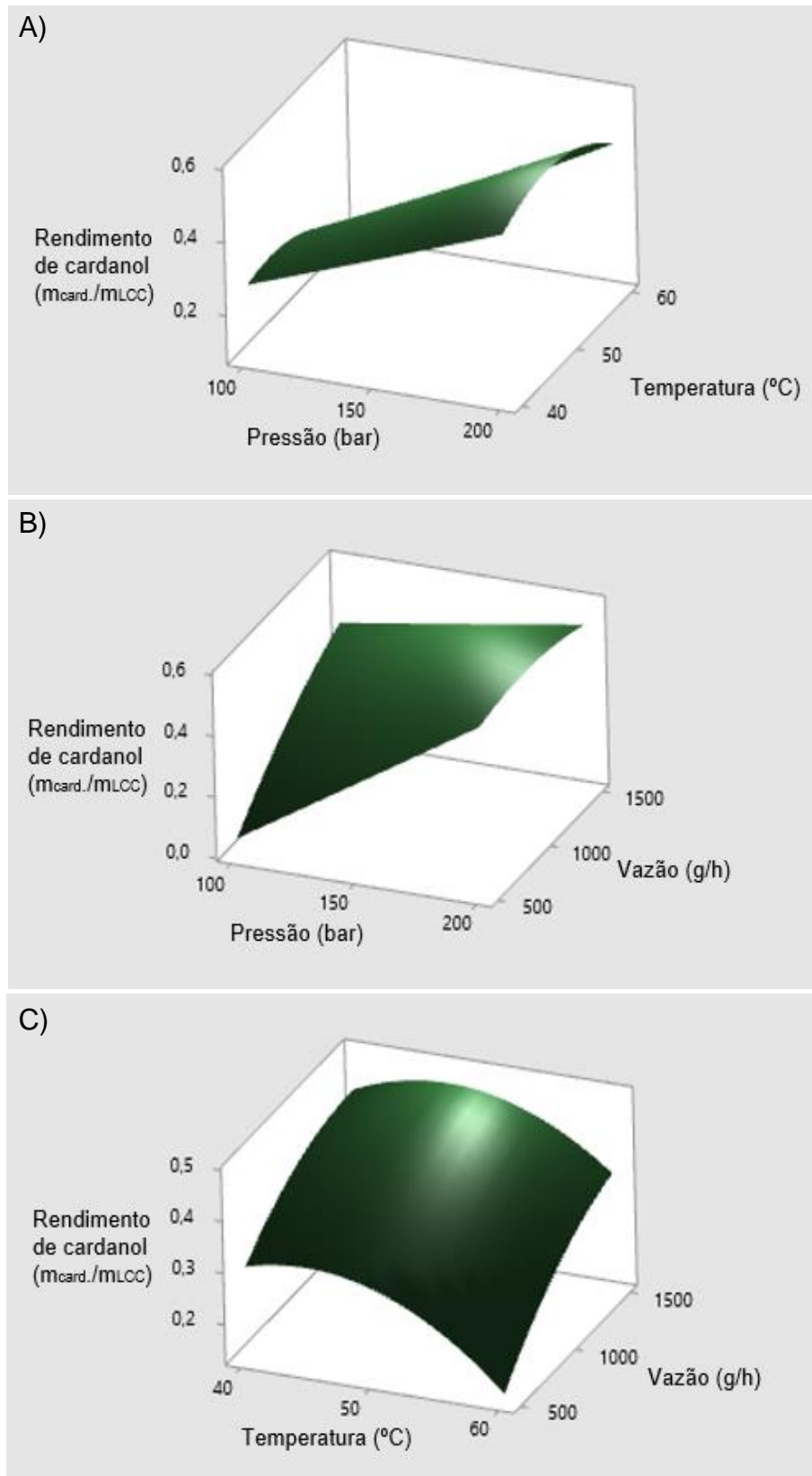


Figura 5.7. Superfície de resposta do teor de cardanol no LCC ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ): A) temperatura versus pressão, com vazão de solvente fixado no nível médio; B) vazão de solvente versus pressão, com temperatura fixada no nível médio; C) vazão de solvente versus temperatura, com pressão fixada no nível médio.

A partir da análise da Figura 5.7A é possível avaliar a influência das variáveis temperatura e pressão ao manter a vazão de solvente constante no nível central (1000 g/h). Verifica-se uma maior influência da pressão frente à temperatura, visto que o aumento da pressão resulta em um aumento do teor de cardanol extraído ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ). Por outro lado, a diminuição da pressão provoca a diminuição do teor de cardanol extraído ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ).

A Figura 5.7B apresenta o gráfico que mostra a influência das variáveis vazão de solvente e pressão ao manter a temperatura constante no nível central (50 °C). Da mesma forma como a análise anterior, é possível constatar uma maior influência da pressão frente à vazão de solvente, já que o aumento da pressão resulta em um aumento do teor de cardanol extraído ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ). Esses resultados, devem-se ao fato de que o aumento da pressão provoca o aumento da densidade do CO<sub>2</sub>, aumentando, assim, seu poder de solvente e, conseqüentemente, aumentando a solubilidade do CO<sub>2</sub> no LCC (Patel et al., 2011; Philip et al., 2008).

Por fim, a partir da Figura 5.7C, é possível avaliar a influência das variáveis vazão e temperatura ao manter a pressão constante no nível central (150 bar). Verifica-se que o aumento da vazão contribui para o aumento do teor de cardanol extraído ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ). Esse resultado corrobora o obtido por Patel et al. (2006) que obtiveram maiores rendimentos com o aumento da vazão de CO<sub>2</sub> ao estudar a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico do cardanol a partir do LCC. Quanto à temperatura, observa-se que a sua diminuição resulta em um aumento do teor de cardanol extraído ( $m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ). Segundo Philip et al. (2008), para pressões abaixo de 220 bar, caso do presente estudo, o aumento da temperatura diminui a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico e, conseqüentemente, menor poder em carregar o cardanol do material sólido.

Utilizando a Equação 5.1, é possível obter uma condição otimizada para a obtenção do cardanol a partir do LCC, sendo esta correspondente à pressão de 200 bar, à temperatura de 48 °C e à vazão de CO<sub>2</sub> de 884 g/h. Comenta-se que a condição de máximo está no limite dos intervalos de pressão investigados neste trabalho.

De posse do resultado da condição ótima de extração determinada a partir da metodologia empregada, ao substituir os valores das variáveis pressão, temperatura e vazão de solvente na Equação 5.1 por, respectivamente, 200 bar, 48 °C e 884 g/h, é possível estimar a quantidade de cardanol por quantidade de LCC comercial investido ( $\%m_{\text{cardanol}}/m_{\text{LCC}}$ ), sendo esta correspondente a 57,82%. Isso significa que é necessário empregar 100 g de LCC técnico, para ser obtido um extrato com 57,82 g de cardanol. Considerando que o LCC técnico comercial empregado nas extrações apresenta 89% de cardanol, constata-se que, na condição ótima, é possível extrair 65% do cardanol presente no LCC técnico comercial.

## 5.2. Equilíbrio de fases a alta pressão

Como mencionado anteriormente, devido às condições do processo de EFS, bem como as diferenças entre as estruturas químicas do soluto e do solvente, a mistura CO<sub>2</sub>/cardanol apresenta um comportamento altamente não ideal. Portanto, o ELV da mistura foi avaliado em diferentes condições isotérmicas (40 °C, 50 °C e 60 °C) e os parâmetros de interação binária estimados.

Para melhor explicar o volume de CO<sub>2</sub> utilizado e a massa de cardanol empregada, nos experimentos, as Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8 apresentam os dados experimentais, bem como os valores de pressão correspondentes aos pontos de bolha a 40 °C, 50 °C e 60 °C, respectivamente.

A fração molar de CO<sub>2</sub> na mistura CO<sub>2</sub>/cardanol foi determinada a partir da conversão do volume de CO<sub>2</sub> em massa e esta, por sua vez, em mol. A densidade do CO<sub>2</sub> na condição de alimentação (10.000 kPa e 15 °C) corresponde a 889,74 kg/m<sup>3</sup> e as massas molares de CO<sub>2</sub> e cardanol de, respectivamente, 44 g/mol e 304 g/mol foram utilizadas para o cálculo.

Tabela 5.6. Dados do experimento de equilíbrio líquido–vapor a 40 °C.

<b>Célula de equilíbrio Alimentação P(kPa)/T(°C)</b>	<b>x (CO<sub>2</sub>)</b>	<b>Volume de CO<sub>2</sub> (mL)</b>	<b>Massa de cardanol (g)</b>	<b>Pressão (kPa)</b>
10.000/15	0,062	0,28	25,941	550
	0,102	0,48	25,941	1060
	0,191	0,98	25,565	1720
	0,210	1,11	25,591	1790
	0,250	1,23	22,706	2720
	0,315	1,91	25,484	3330
	0,318	1,94	25,565	3470
	0,376	2,48	25,310	3670
	0,436	3,20	25,484	4080
	0,470	3,54	25,565	4760
	0,512	2,93	17,175	4490
	0,567	4,67	21,908	5170
	0,674	7,37	21,908	5940

Tabela 5.7. Dados do experimento de equilíbrio líquido–vapor a 50 °C.

<b>Célula de equilíbrio Alimentação P(kPa)/T(°C)</b>	<b>x (CO<sub>2</sub>)</b>	<b>Volume de CO<sub>2</sub> (mL)</b>	<b>Massa de cardanol (g)</b>	<b>Pressão (kPa)</b>
10.000/15	0,062	0,28	25,941	1060
	0,102	0,48	25,941	1330
	0,191	0,98	25,565	2170
	0,259	1,30	22,819	2720
	0,318	1,94	25,565	3720
	0,376	2,48	25,310	4110
	0,470	3,54	25,565	4970
	0,512	2,93	17,175	5200
	0,576	5,05	22,819	5590
	0,674	7,37	21,908	6010
	0,709	9,05	22,819	6500

Tabela 5.8. Dados do experimento de equilíbrio líquido–vapor a 60 °C.

Célula de equilíbrio Alimentação P(kPa)/T(°C)	x (CO <sub>2</sub> )	Volume de CO <sub>2</sub> (mL)	Massa de cardanol (g)	Pressão (bar)
10.000/15	0,062	0,28	25,941	1470
	0,102	0,48	25,941	1850
	0,376	2,48	25,310	4340
	0,674	7,37	21,908	6060

A Figura 5.8 apresenta o comportamento do ELV da mistura CO<sub>2</sub>/Cardanol e os resultados obtidos a partir do PR-EOS acoplado à regra de mistura vdW2 em diferentes condições de temperatura. A Tabela 5.9 mostra os parâmetros de interação binária combinados com o desvio absoluto médio das pressões (DAMP).

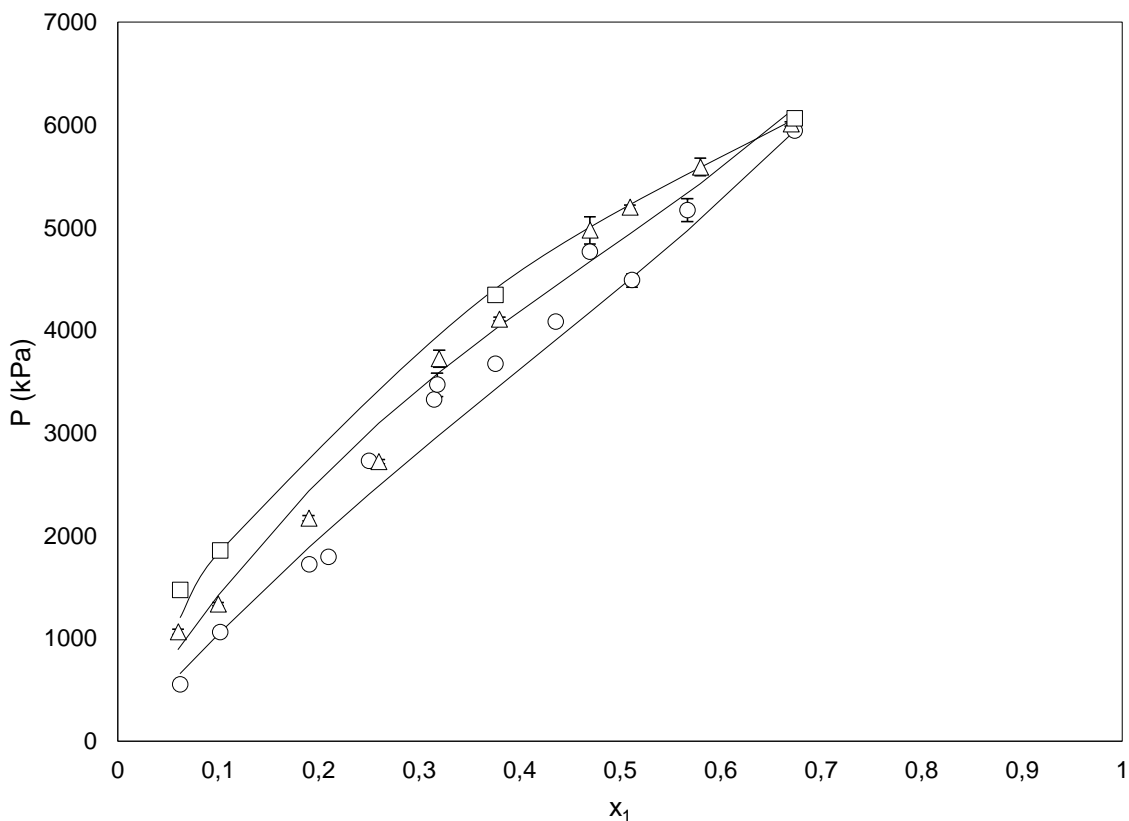


Figura 5.8. ELV isotérmico para o sistema CO<sub>2</sub> (1)/ Cardanol (2) a 40 °C (○), 50 °C (□) e 60 °C (△)  
Dados Experimentais; (-) Peng-Robinson EOS.

Tabela 5.9. Parâmetros de interação binária ( $k_{ij}$ ,  $n_{ij}$ ) à temperatura (T) e desvio absoluto médio das pressões (DAMP).

T (°C)	40	50	60
$k_{ij}$	0,004	-0,032	-0,079
$n_{ij}$	-0,019	-0,033	-0,047
DAMP(%)	10,90	7,43	4,93

Posteriormente, os parâmetros binários foram utilizados para estimar a solubilidade do cardanol nas condições de EFS. Neste caso, a 50 °C e 150 bar a solubilidade ( $y_r$ ) foi calculada pela equação de Peng-Robinson, acoplada a regra de mistura de van der Waals com dois parâmetros de interação binários, como 0,087 g<sub>Cardanol</sub>/kg<sub>CO2</sub>.

Este valor de 0,087g<sub>cardanol</sub>/kg<sub>CO2</sub>, correspondente à fração mássica de  $8,7 \cdot 10^{-5}$ , está de acordo com os valores encontrados na literatura para a solubilidade de compostos fenólicos em CO<sub>2</sub> supercrítico. Segundo Saldaña et al. (2007), a solubilidade do ácido ferúlico em CO<sub>2</sub> supercrítico corresponde à fração mássica de  $8,8 \cdot 10^{-5}$ , mesma ordem de grandeza determinada para a solubilidade do ácido vanílico (fração mássica,  $3 \cdot 10^{-5}$ ) em CO<sub>2</sub> supercrítico obtido por Su et al. (2011).

### 5.3. Modelagem matemática

A EFS foi modelada e os parâmetros de transferência de massa foram estimados pelo método proposto por Sovová (2005). Conforme mostra a Figura 5.9, cerca de 60% do rendimento total é obtido nos 20 min iniciais de extração. De acordo com o modelo, foi possível concluir que o soluto interage com a matriz a partir de  $t = 0$  min. Inicialmente, a extração é controlada tanto pela solubilidade do extrato em dióxido de carbono, quanto pela sua difusão através da matriz. Na segunda etapa da extração, que responde pelos 40% restantes de extrato na matriz, o processo foi regido, exclusivamente, pela interação soluto-matriz e difusão interna.

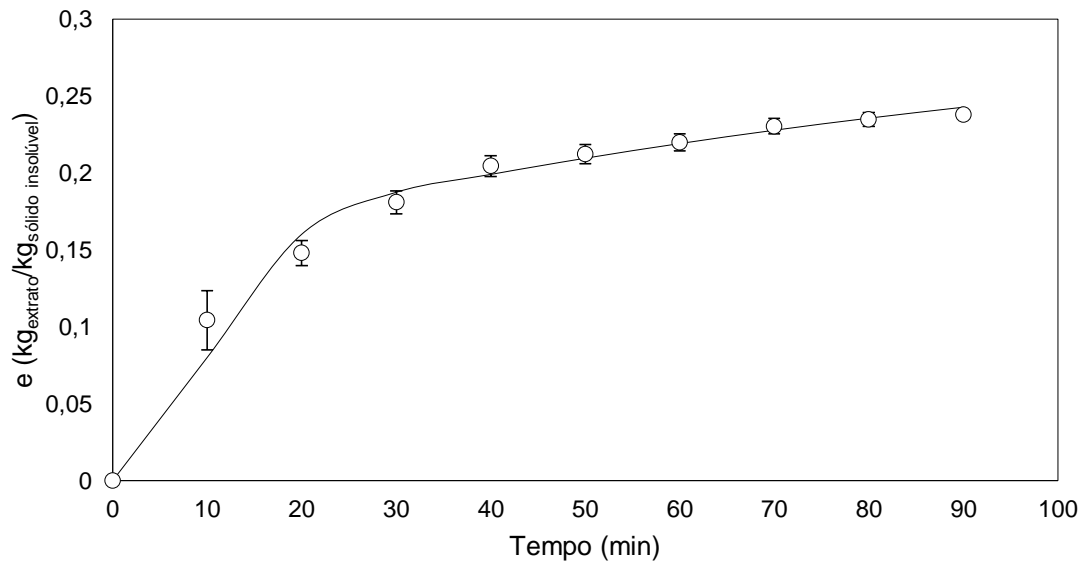


Figura 5.9. Curva de extração do cardanol a partir do LCC técnico a 50 °C e 150 bar. (o) dados experimentais; (-) modelo matemático.

Os parâmetros estimados podem ser observados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10. Parâmetros estimados e coeficientes de transferência de massa para EFS.

<b>K</b>	<b><math>x_t</math></b>	<b>r</b>	<b><math>k_s a_s</math> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
0,020	0,28	0,64	$1,02 \times 10^{-5}$	0,9855

O modelo proposto por Sovová (2005) foi utilizado por Rebolleda et al. (2013) no estudo da extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de alquilresorcinol a partir do farelo do trigo (*Triticum aestivum*, L.). As condições experimentais utilizadas, em seu trabalho, foram 400 bar de pressão e temperaturas de 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C com vazão de solvente de 1,5 g/min. Após modelagem de transferência de massa, foram obtidos valores de  $k_s a_s$  de  $1,1 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,0 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,9 \cdot 10^{-5}$  e  $5,7 \cdot 10^{-5}$  s<sup>-1</sup> para as temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C, respectivamente. Considerando a semelhança da molécula alquilresorcinol com o cardanol, é possível concluir que o valor de  $k_s a_s$  correspondente à  $2,58 \cdot 10^{-5}$  s<sup>-1</sup>, estimado nesta tese, são compatíveis com os dados previamente reportados na literatura para a extração de moléculas semelhantes.



## 5.4. Técnicas de caracterização dos extratos

### 5.4.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

A composição química do extrato também foi avaliada por CG/EM. Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, foram encontrados na literatura estudos que utilizaram esta técnica cromatográfica em fase gasosa para determinar e quantificar os constituintes fenólicos presentes no extrato obtido através da extração supercrítica do LCC (Andrade et al., 2011; Kumar et al., 2002). Por esta razão, esta técnica passou a ser adotada para determinar a composição química do extrato.

Considerando os resultados obtidos a partir da análise dos extratos por CLAE (apresentados na seção 5.1.1) que revelaram três picos intensos identificados como pentadecatrienil, pentadecadienil e pentadecenil do cardanol, esperava-se, a partir da análise por CG/EM, a confirmação e quantificação dessas três formas estruturais do cardanol. Ao analisar o cromatograma do extrato obtido na condição de 50 °C /150 bar (Figura 5.10A), observa-se a presença de dois picos não eluídos dentro do pico principal, sendo este com tempo de retenção de 26,537 min. No entanto, o método utilizado para a análise não permitiu a diferenciação das formas estruturais do cardanol (que se diferenciam apenas pelo grau de insaturação da cadeia alifática lateral), sendo que esses três picos foram identificados como cardanol saturado, conforme mostra a Figura 5.10B. Esse resultado corrobora os obtidos por Kumar et al. (2002).

A área do pico principal, correspondente a 26,537 min, foi de 94% em relação à área total dos picos. Tradicionalmente é aceito que a concentração em massa dos compostos presentes nos extratos seja proporcional à área do pico cromatográfico, portanto, pode-se afirmar que 94% do extrato refere-se ao cardanol.

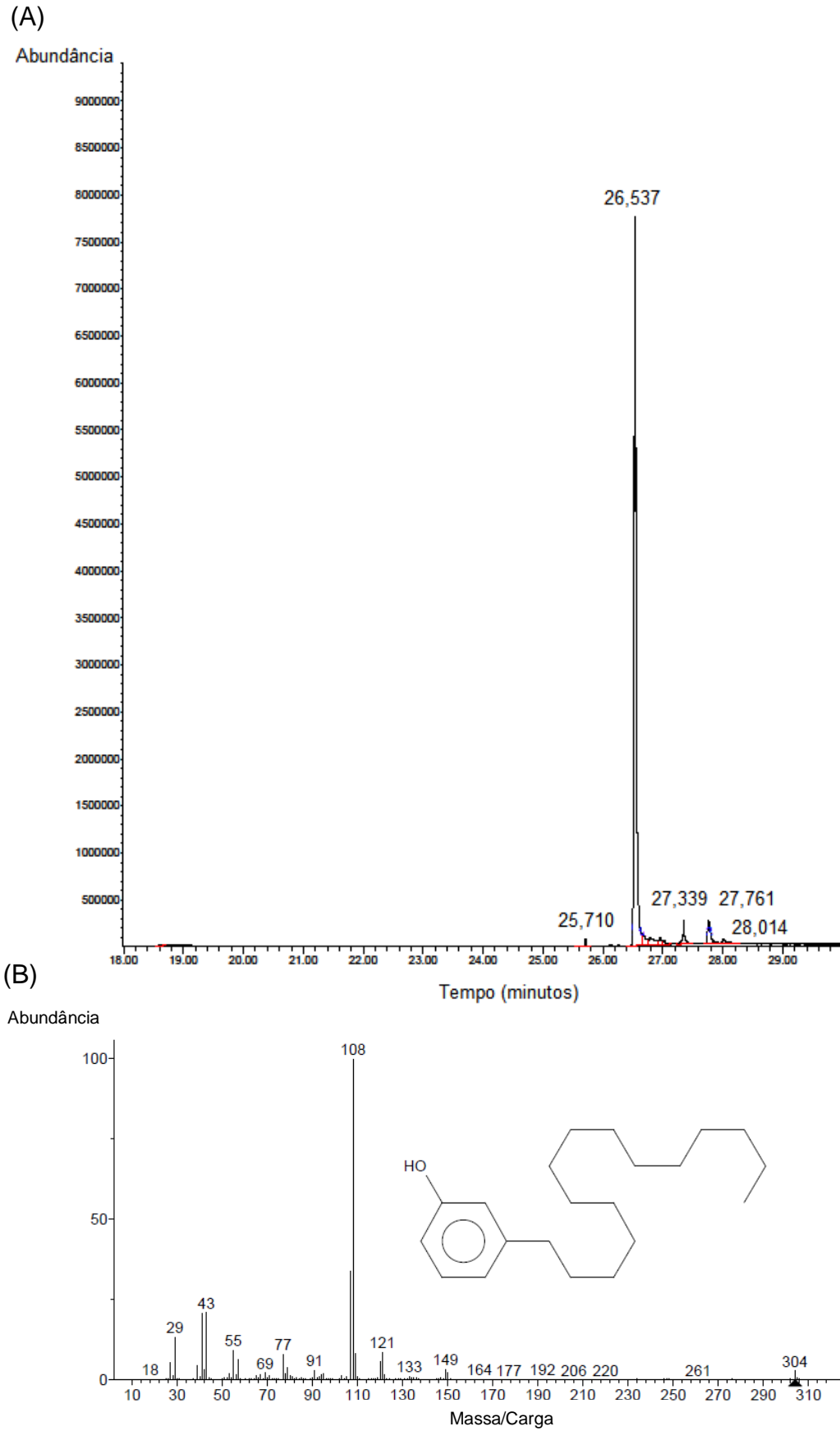


Figura 5.10. A) Cromatograma do extrato obtido na condição 50 °C /150 bar a uma razão massa/carga de 108. B) Espectro de massas correspondente ao pico cromatográfico do cardanol com tempo de retenção de 26,537 min.

A fim de verificar a eficiência do processo de extração supercrítica do cardanol a partir do LCC, também foi realizada a análise por CG/EM do LCC técnico comercial e do cardanol padrão comercial. Da mesma forma como foi observado no cromatograma do extrato (Figura 5.10A), os cromatogramas do LCC (Figura 5.11) e do cardanol padrão (Figura 5.12) revelaram o aparecimento de dois picos não eluídos dentro do pico principal; para o LCC, este pico apresentou tempo de retenção de 26,534 min e para o cardanol padrão, este pico exibiu tempo de retenção de 26,536 min. Em ambos os cromatogramas, os três picos foram identificados como cardanol saturado.

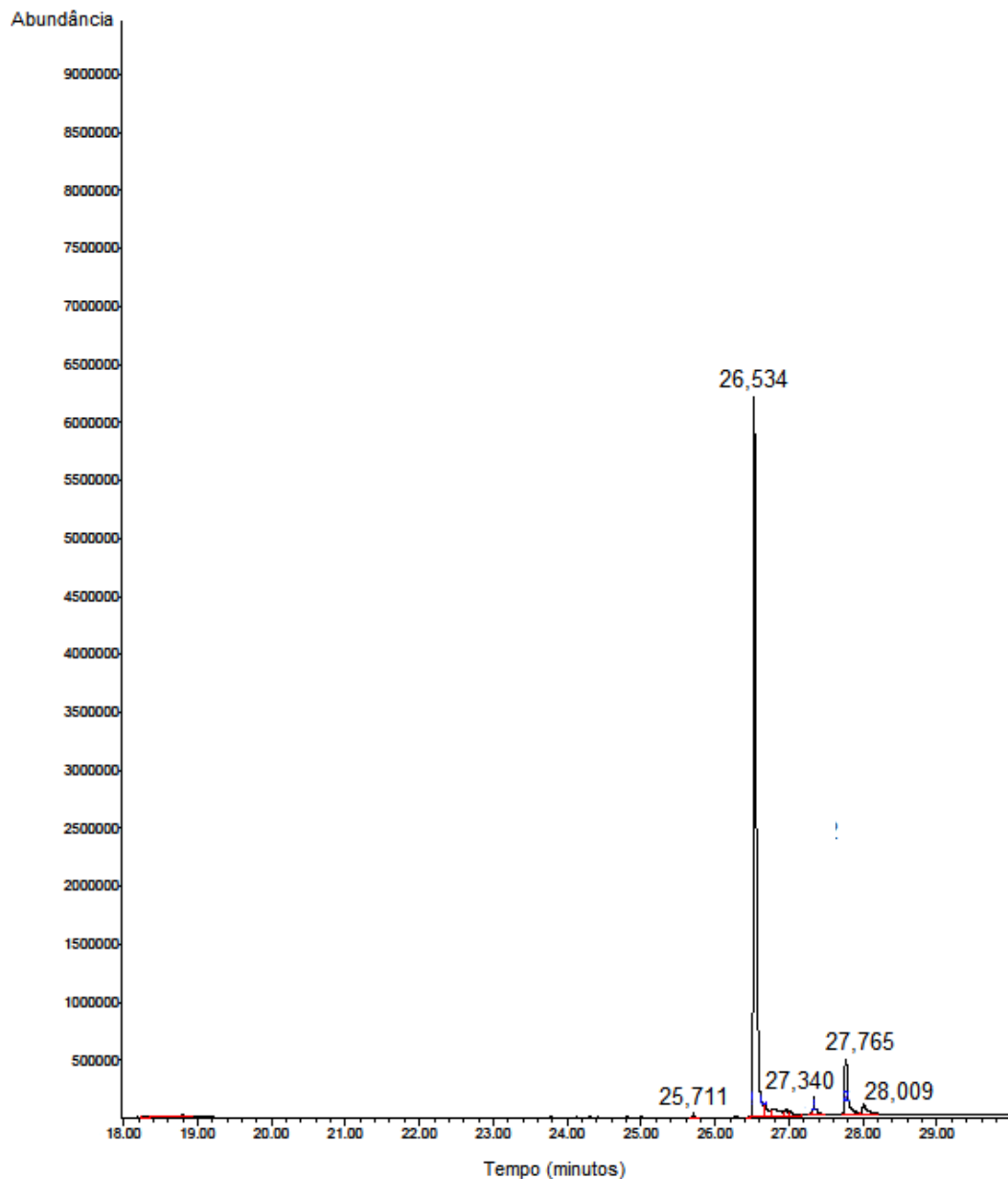


Figura 5.11. Cromatograma do LCC técnico comercial a uma razão massa/carga de 108.

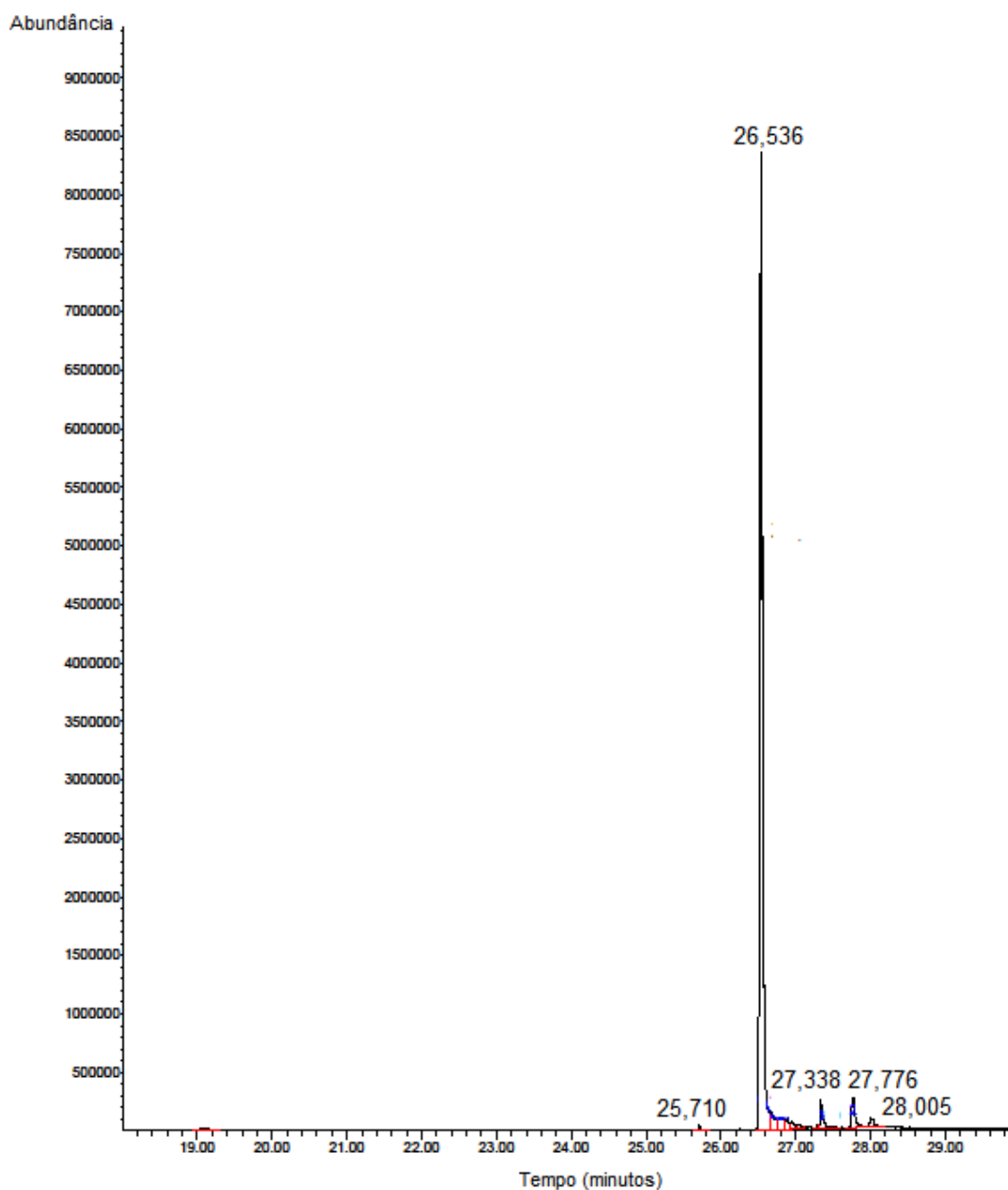


Figura 5.12. Cromatograma do cardanol padrão comercial a uma razão massa/carga de 108.

Para o LCC comercial, o valor da área do pico principal referente ao tempo de retenção específico para cardanol foi de 89% (Figura 5.11), enquanto que, para o cardanol padrão comercial, o valor subiu para 93% (Figura 5.12). Ambos os resultados inferiores ao determinado para o extrato obtido neste trabalho.

Esse resultado confirma a eficiência do método de extração do cardanol a partir do LCC utilizando  $\text{CO}_2$  supercrítico na condição de 50 °C/150 bar e indica a alta seletividade do  $\text{CO}_2$  supercrítico (50 °C e 150 bar).

#### 5.4.2. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ )

O extrato contendo 94% de cardanol, obtido a partir da extração com  $\text{CO}_2$  supercrítico a partir do LCC técnico na condição de 50 °C/150 bar, foi analisado por RMN  $^1\text{H}$ . A fim de comparação, o cardanol padrão comercial também foi analisado por esta técnica. As Figuras 5.13 e 5.14 apresentam os espectros de RMN  $^1\text{H}$ , da região dos aromáticos e dos alcenos, do extrato e do cardanol padrão comercial, respectivamente.

Os espectros do extrato (Figura 5.13) e do cardanol padrão comercial (Figura 5.14) são muito semelhantes. A partir de ambos os espectros, confirmou-se a presença da cadeia alifática lateral do cardanol, pois a região entre 0,90 e 2,90 ppm indica os hidrogênios metilênicos e os hidrogênios metílicos; e em 5,00 e 6,00 ppm são encontrados multipletos referentes a hidrogênios  $\text{CH}=\text{CH}$  (Rahmawati et al., 2019; Gonçalves et al., 2016). Acrescenta-se que o sinal identificado pelo número 1, em cerca de 5 ppm, refere-se ao hidrogênio do OH fenólico (Loureiro et al., 2018; Kanehashi et al., 2015). A região entre 6,50 e 7,40 ppm mostra o sinal dos dupletos e tripletos que são característicos dos grupos aromáticos de cardanol (Rahmawati et al., 2019; Gonçalves et al., 2016).

A partir da análise dos espectros, Figuras 5.13 e 5.14, observa-se que ambos apenas se diferem pela presença do sinal na região entre 3,5 e 4,0 ppm (indicado pela seta), observado no espectro do extrato (Figura 5.13). Este sinal, possivelmente, seja referente aos hidrogênios do etanol, já que os sinais referentes aos hidrogênios do etanol são verificados na região entre 3,5 e 4,0 ppm, bem como na região entre 1,0 e 1,5 ppm (Zuriarrain et al., 2015); este sinal, no entanto, foi encoberto pelos sinais dos hidrogênios do cardanol (Figura 5.13). O etanol, pode estar presente no extrato na forma de contaminante, pois utiliza-se etanol no equipamento de extração supercrítica no qual as extrações foram realizadas. Acrescenta-se ainda que a limpeza dos frascos utilizados para a coleta dos extratos, normalmente, é finalizada com etanol.

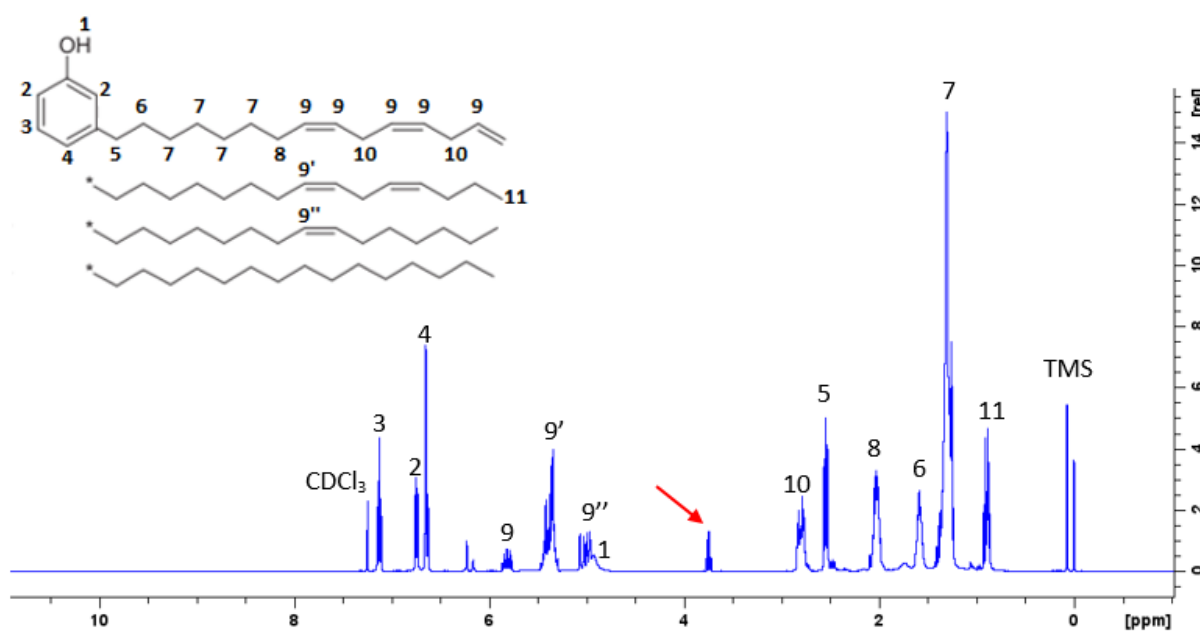


Figura 5.13. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da região dos aromáticos e dos alcenos do extrato rico em cardanol.

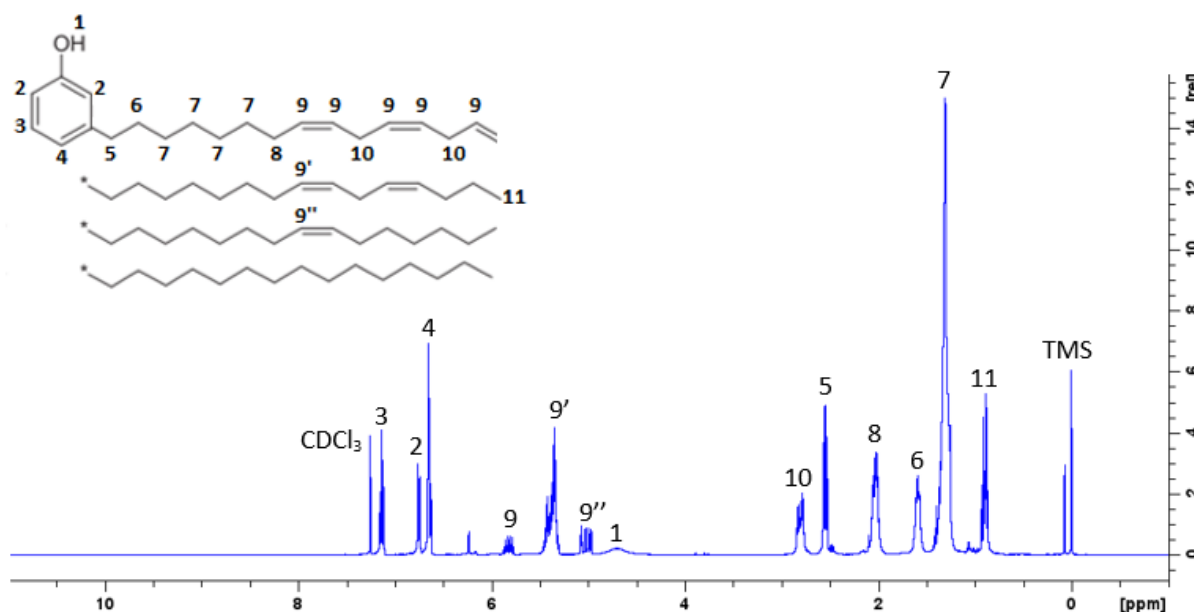


Figura 5.14. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da região dos aromáticos e dos alcenos do cardanol padrão comercial.

A análise por RMN  $^1\text{H}$  do extrato apresenta dados consistentes com a literatura (Rahmawati et al., 2019; Loureiro et al., 2018; Gonçalves et al., 2016; Kanehashi et al., 2015), cujo resultado corrobora o obtido para o cardanol padrão comercial.

Constata-se, portanto, que a semelhança entre os espectros, confirma a obtenção de cardanol e demonstra que a metodologia empregada foi eficiente para extrair o cardanol a partir do LCC técnico.

#### **5.4.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT)**

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade citotóxica dos extratos frente às células de câncer de bexiga (T24) e glioblastoma (M059J), utilizando o protocolo MTT, e comparar com as células saudáveis (Vero).

Os resultados da viabilidade celular por MTT do extrato rico em cardanol nas linhagens M059J, T24 e Vero são mostrados nas Figuras 5.15, 5.16 e 5.17, respectivamente. Nas Figuras 5.15A, 5.16A e 5.17A, o grupo controle, que corresponde ao meio de cultura, é identificado pela letra “C” e o grupo controle referente ao meio de cultura contendo 0,5% de DMSO é indicado por “C+”.

A partir da análise da Figura 5.15A, foi possível observar que o cardanol não promoveu nenhum efeito sobre a viabilidade celular da linhagem M059J nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, após 24 h. Por outro lado, o cardanol apresentou redução da viabilidade celular nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL, após 24 h.

Este resultado está em concordância com a diminuição da confluência celular provocada por altas concentrações de cardanol, como mostram as Figuras 5.15G e 5.15H em comparação à confluência celular observada para o grupo controle (Figura 5.15C). Em relação à confluência das células expostas a concentrações menores de cardanol (25 µg/mL e 50 µg/mL – Figuras 5.15E e 5.15F, respectivamente), não foi observada alteração ao compará-la ao grupo controle (Figura 5.15C).

Em relação às linhagens T24 e Vero, (Figuras 5.16 e 5.17, respectivamente), pode-se constatar que o cardanol promoveu a redução da viabilidade celular em todas as concentrações testadas (25, 50, 100 e 200 µg/mL), após 24 h. As Figuras 5.16 e 5.17 (E, F, G, H) mostram a diminuição da confluência celular das linhagens T24 e Vero comparadas ao grupo controle (5.16C e 5.17C), respectivamente.

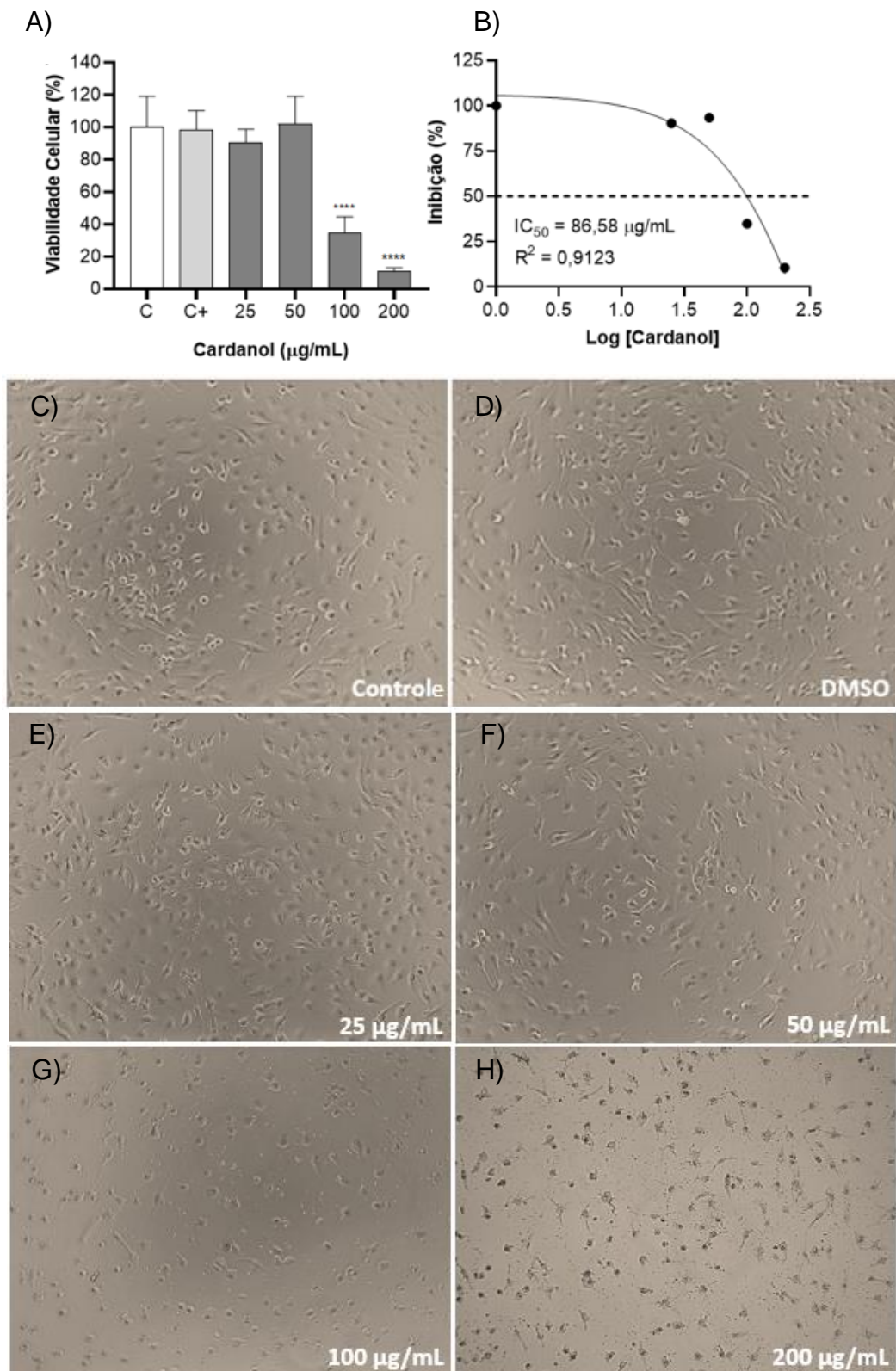


Figura 5.15 Resultados do ensaio para a linhagem M059J (glioblastoma): (A) Efeito do cardanol na viabilidade celular por meio do ensaio MTT, após 24h, \*\*\*  $p < 0,001$ ; (B)  $IC_{50}$  do cardanol, após 24h, na viabilidade celular; (C) Morfologia das células do grupo controle; (D) Morfologia das células em DMSO; (E, F, G, H) Morfologia das células tratadas com cardanol nas concentrações 25, 50, 100 e 200 µg/mL, respectivamente.



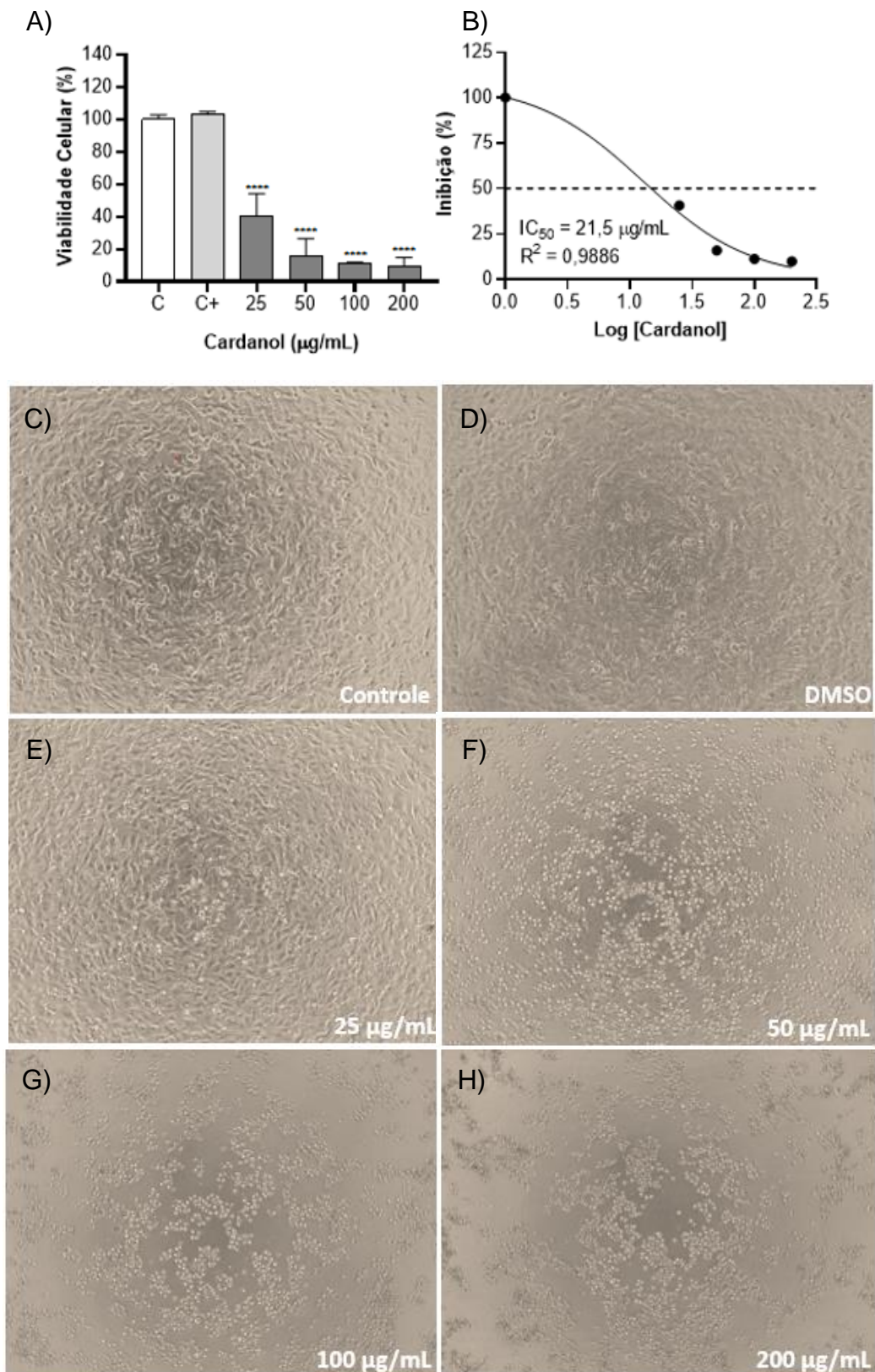


Figura 5.16. Resultados do ensaio para a linhagem T24 (células de câncer de bexiga): (A) Efeito do cardanol na viabilidade celular por meio do ensaio MTT, após 24h, \*\*\*  $p < 0,001$ ; (B) IC<sub>50</sub> do cardanol, após 24 h, na viabilidade celular; (C) Morfologia das células de controle; (D) Morfologia das células em DMSO; (E, F, G, H) Morfologia das células tratadas com cardanol nas concentrações 25, 50, 100 e 200 µg/mL, respectivamente.

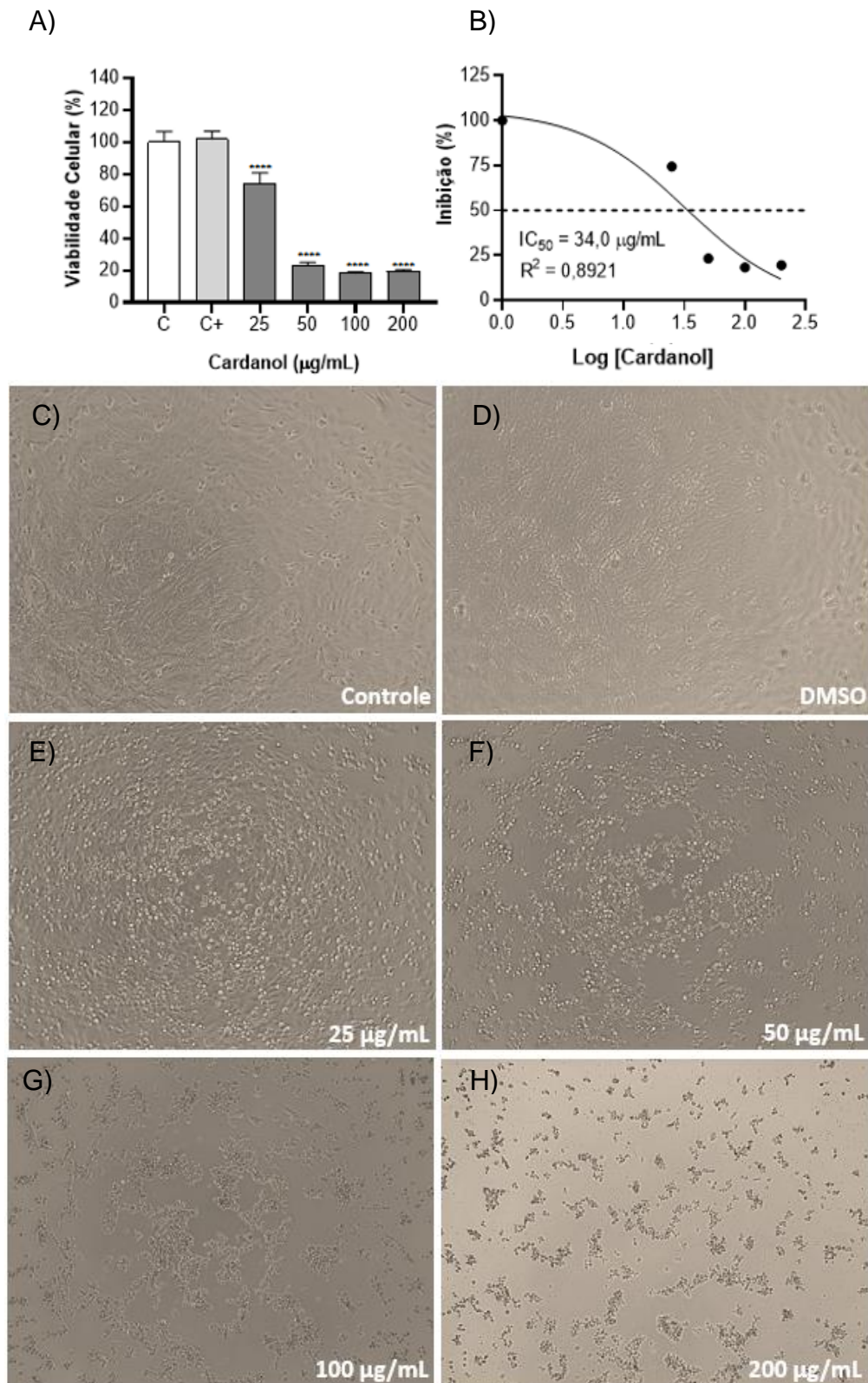


Figura 5.17. Resultados do ensaio para a linhagem Vero (células saudáveis): (A) Efeito do cardanol na viabilidade celular por meio do ensaio MTT, após 24h, \*\*\*  $p < 0,001$ ; (B)  $IC_{50}$  do cardanol, após 24 h, na viabilidade celular; (C) Morfologia das células de controle; (D) Morfologia das células em DMSO; (E, F, G, H) Morfologia das células tratadas com cardanol nas concentrações 25, 50, 100 e 200 µg/mL, respectivamente.

Como estratégia experimental, para a definição da atividade citotóxica apresentada pelo extrato, também foi determinada a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% ( $IC_{50}$ ), conforme mostram as Figuras 5.15B, 5.16B e 5.17B.

Dentre as linhagens estudadas, o extrato rico em cardanol apresentou a maior toxicidade frente às células T24, carcinoma de células transicionais de bexiga humana, ( $IC_{50}$  de 21,50  $\mu\text{g/mL}$  - Figura 5.16B), e menor toxicidade frente às células M059J, células de glioma, ( $IC_{50}$  de 86,58  $\mu\text{g/mL}$  - Figura 5.15B), sendo que as células Vero, células renais de macaco verde africano, apresentaram um valor de  $IC_{50}$  intermediário ( $IC_{50}$  de 34,00  $\mu\text{g/mL}$  - Figura 5.17B) em relação ao obtido para as demais linhagens de células avaliadas.

A Figura 5.18 mostra um mapa de toxicidade que informa o perfil de atoxicidade através do uso de círculos e o perfil de toxicidade a partir da utilização de triângulos, com base na ação do cardanol, em diferentes concentrações (0, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ), frente às linhagens estudadas. Nas cores vermelha, verde e azul são apresentadas as linhas correspondentes às linhagens M059J, Vero e T24, respectivamente, bem como os valores de  $IC_{50}$  do cardanol na viabilidade das linhagens, após 24 h.

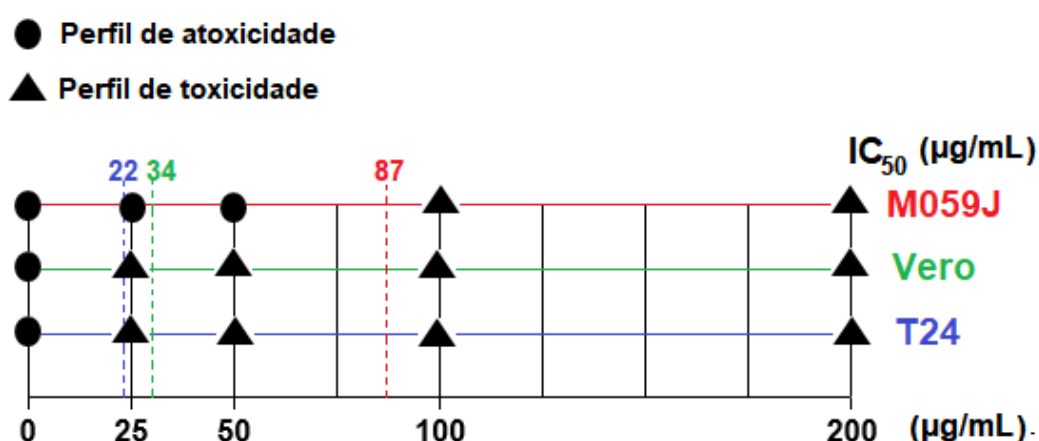


Figura 5.18. Mapa de toxicidade do cardanol frente às linhagens M059J, Vero e T24. O mapa apresenta o perfil de toxicidade frente às linhagens provocada por diferentes concentrações de cardanol e o  $IC_{50}$  do cardanol na viabilidade das linhagens, após 24 h.

A partir da análise do mapa, obtém-se maior clareza quanto ao efeito das concentrações de cardanol sobre as linhagens estudadas, tendo em vista a determinação de uma concentração que apresente maior eficácia para promover uma maior redução da viabilidade das células tumorais, preservando as células saudáveis.

Para biomateriais que se destinam a este tipo de aplicação, deseja-se que o mesmo apresente maior toxicidade contra as células tumorais, em relação às células saudáveis. Analisando o mapa de toxicidade (Figura 5.18), constata-se que, embora o cardanol tenha diminuído a viabilidade celular da linhagem T24 e Vero em todas as concentrações, o efeito citotóxico é maior para as células T24, já que o  $IC_{50}$  do cardanol na viabilidade da linhagem T24 é menor comparado ao  $IC_{50}$  do cardanol na viabilidade da linhagem Vero ( $21,5 \mu\text{g/mL} < 34,0 \mu\text{g/mL}$ ); portanto, é possível determinar uma concentração ideal de extrato que tenha a ação desejada frente às células T24, preservando as células Vero. No entanto, verifica-se que o extrato rico em cardanol apresenta maior toxicidade em relação às células Vero comparada às células de glioblastoma (M059J).

Diante deste resultado, constata-se que, nas concentrações estudadas, o extrato rico em cardanol tem potencial de ser aplicado para o tratamento do câncer de bexiga (T24). Em relação ao glioblastoma, constata-se que, embora o efeito citotóxico do extrato tenha sido maior frente às células saudáveis comparado às células tumorais, este resultado indica que o extrato não pode ser descartado como possível tratamento para glioblastoma, porém estudos que visem à purificação do extrato são necessários para que estes efeitos sejam melhores explorados.

Na literatura, não foram encontrados estudos da ação do cardanol ou do LCC frente às linhagens celulares T24 e M059J. Porém, há estudos que revelam a ação antitumoral do cardanol e/ou do LCC frente ao câncer de mama humano, MCF-7 (Al-Hazzani et al., 2012), ao câncer do colo do útero humano, HeLa (Ashraf e Rathinasamy, 2018; Ola et al., 2008), ao carcinoma de células escamosas oral, OSCC-3 (Neto et al., 2014), ao melanoma humano, M14 (Su et al., 2017) e ao hepatocarcinoma, HepG2 (Massaro et al., 2015).

Dentre estes trabalhos, destaca-se o estudo de Su et al. (2017) que avaliaram a ação do cardanol em concentrações crescentes (0; 0,76; 1,52; 3,04; 6,08; 9,12; 12,16  $\mu\text{g/mL}$ ) nas células de melanoma humano (M14). A fim de comparação, os autores relatam que o cardanol apresenta toxicidade pouco evidente contra hepatócitos (células saudáveis humanas), no entanto, frente à linhagem em estudo, M14, o cardanol apresentou elevada toxicidade, sendo o  $\text{IC}_{50}$ , determinado após 24 h de tratamento, correspondente a 7,00  $\mu\text{g/mL}$ . Em relação ao presente estudo, a partir do resultado apresentado pelos autores (Su et al., 2017), constata-se que o cardanol apresenta toxicidade menor em relação às células de câncer de bexiga (T24) comparada às células de melanoma humano (M14), já que o  $\text{IC}_{50}$  do cardanol na viabilidade da linhagem T24 é maior comparado ao  $\text{IC}_{50}$  do cardanol na viabilidade da linhagem M14 (21,50  $\mu\text{g/mL}$  > 7,00  $\mu\text{g/mL}$ ).

Acrescenta-se o trabalho de Ashraf e Rathinasamy (2018) que avaliaram a atividade anticancerígena do LCC técnico frente às células HeLa em comparação com as células fibroblásticas, L929 (células saudáveis). A composição do LCC técnico não foi revelada pelos autores, no entanto, sabe-se que o LCC técnico apresenta o cardanol como componente majoritário. Os autores relatam que células HeLa tratadas com LCC técnico em todas as concentrações avaliadas (0,005; 0,010; 0,015; 0,020% v/v em DMSO) apresentaram alteração na morfologia após 24 h de tratamento, sendo observada a inibição da proliferação de células HeLa com  $\text{IC}_{50}$  de 0,004% (v/v). Em comparação ao resultado alcançado por Ashraf e Rathinasamy (2018) com o obtido no presente estudo, observa-se que o cardanol apresenta menor toxicidade frente às células HeLa comparada às células de câncer de bexiga (T24), pois o  $\text{IC}_{50}$  do cardanol na viabilidade da linhagem T24 corresponde a 0,002% (v/v) (resultado da conversão de 21,50  $\mu\text{g/mL}$  para percentual em razão volume/volume; para o cálculo, foi utilizada a densidade do extrato rico em cardanol determinada experimentalmente  $d = 0,899 \text{ g/mL}$ ). Acrescenta-se que, no presente estudo, além da alteração na morfologia celular da linhagem T24, também foi observada alteração na morfologia da linhagem Vero (células saudáveis) após 24 h de tratamento com o extrato nas concentrações crescentes de cardanol (0,003; 0,006; 0,012; 0,024 % (v/v)), no entanto, Ashraf e Rathinasamy (2018) não observaram alteração na morfologia das células de fibroblastos (células saudáveis) mesmo na concentração mais alta utilizada. Considerando que as concentrações avaliadas no presente estudo e pelos autores

(Ashraf e Rathinasamy, 2018) foram muito semelhantes, constata-se que o cardanol têm potencial para ser aplicado no tratamento do câncer de bexiga (T24), sendo que as células saudáveis do tipo L929 podem tolerar concentrações mais altas de LCC técnico, ou seja, de cardanol.

Considerando que, no presente estudo, o extrato de cardanol apresenta potencial para ser aplicado no tratamento de câncer de bexiga (T24), propõe-se incorporá-lo a uma matriz biodegradável e biocompatível de PLGA a fim de ser produzido um biomaterial capaz de substituir o tecido canceroso da bexiga removido cirurgicamente. Polímeros sintéticos biodegradáveis, com fármaco incorporado, têm sido relatados, na literatura, como proposta de tratamento para o câncer de bexiga (Chun et al., 2009).

## 5.5. Filmes biodegradáveis de PLGA

### 5.5.1. Filmes biodegradáveis de PLGA preparados

Filmes biodegradáveis maleáveis de PLGA com espessura de, aproximadamente, 0,12 mm foram preparados, em sextuplicata, pelo método de evaporação de solvente conforme descrito na seção 4.7.1 (Figura 5.19).

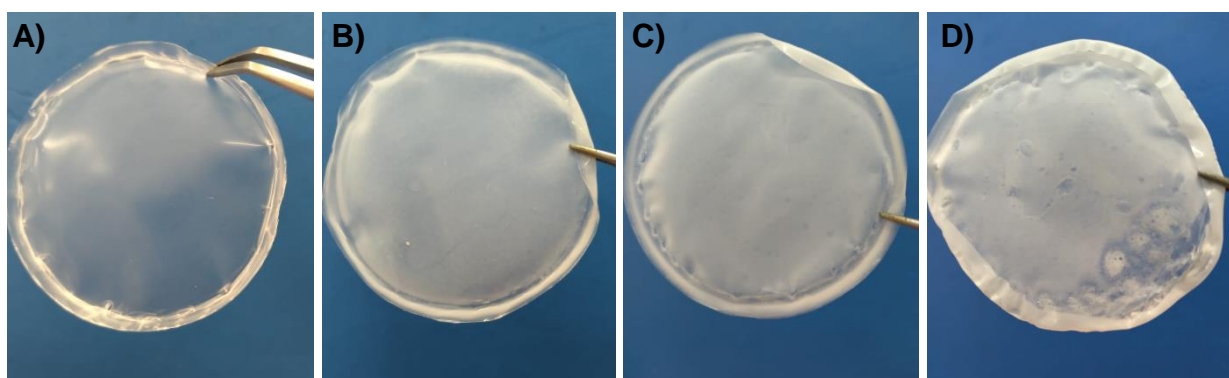


Figura 5.19. Imagens dos filmes biodegradáveis preparados:  
(A) F\_puro; (B) F\_710; (C) F\_1430 e (D) F\_2860.

Ao observar as imagens dos filmes (Figura 5.19), pode-se constatar que o filme de PLGA sem adição de cardanol apresenta aspecto transparente, enquanto os filmes de PLGA com cardanol incorporado possuem aspecto opaco. Observa-se que o

cardanol apresenta boa distribuição, especialmente nos filmes F\_710 e F\_1430, pois, visualmente, os filmes apresentam aparência uniforme, conforme ilustra a Figura 5.19.

### 5.5.2. Ensaio de liberação

Os perfis de liberação de cardanol a partir dos filmes de PLGA com frações mássicas de cardanol de 0,354% (F\_710), 0,710% (F\_1430) e 1,410% (F\_2860) foram avaliados. Os filmes foram incubados a 37 °C em PBS (pH 7,4), contendo Tween-20, como surfactante, e agitados em uma cuba agitadora. Em intervalos de tempo pré-determinados (1, 2, 3, 4, 5, 7, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53 e 55 h), alíquotas da solução foram coletadas e analisadas por espectrofotometria. A partir da curva de calibração, apresentada da seção 4.7.2, obteve-se a equação da reta que relaciona as duas variáveis: concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) e absorbância. A partir dos valores de concentração de cardanol liberado na solução de PBS+Tween-20, foi determinada a massa acumulada em cada intervalo de tempo avaliado. De posse desses resultados, gráficos de massa acumulada ( $M_t$ ) versus tempo ( $t$ ) foram levantados e ajustados à equação de Peppas (1985) (Figura 5.20).

Ao analisar as curvas de liberação do cardanol a partir dos filmes de PLGA, observam-se duas etapas de liberação no tempo avaliado neste estudo (55 h). A fase inicial (primeiras 7 h, aproximadamente) é caracterizada pela dissolução e difusão de uma grande quantidade de cardanol - comparada à quantidade liberada na segunda fase - para o meio de liberação, fenômeno chamado de efeito *burst* (do inglês, explosão) (Fredenberg et al., 2011; Huang e Brazel, 2001). Na segunda fase, observa-se que a velocidade de liberação alcançou um perfil estável, durante a qual o cardanol se difunde lentamente através dos poros existentes na matriz polimérica de PLGA.

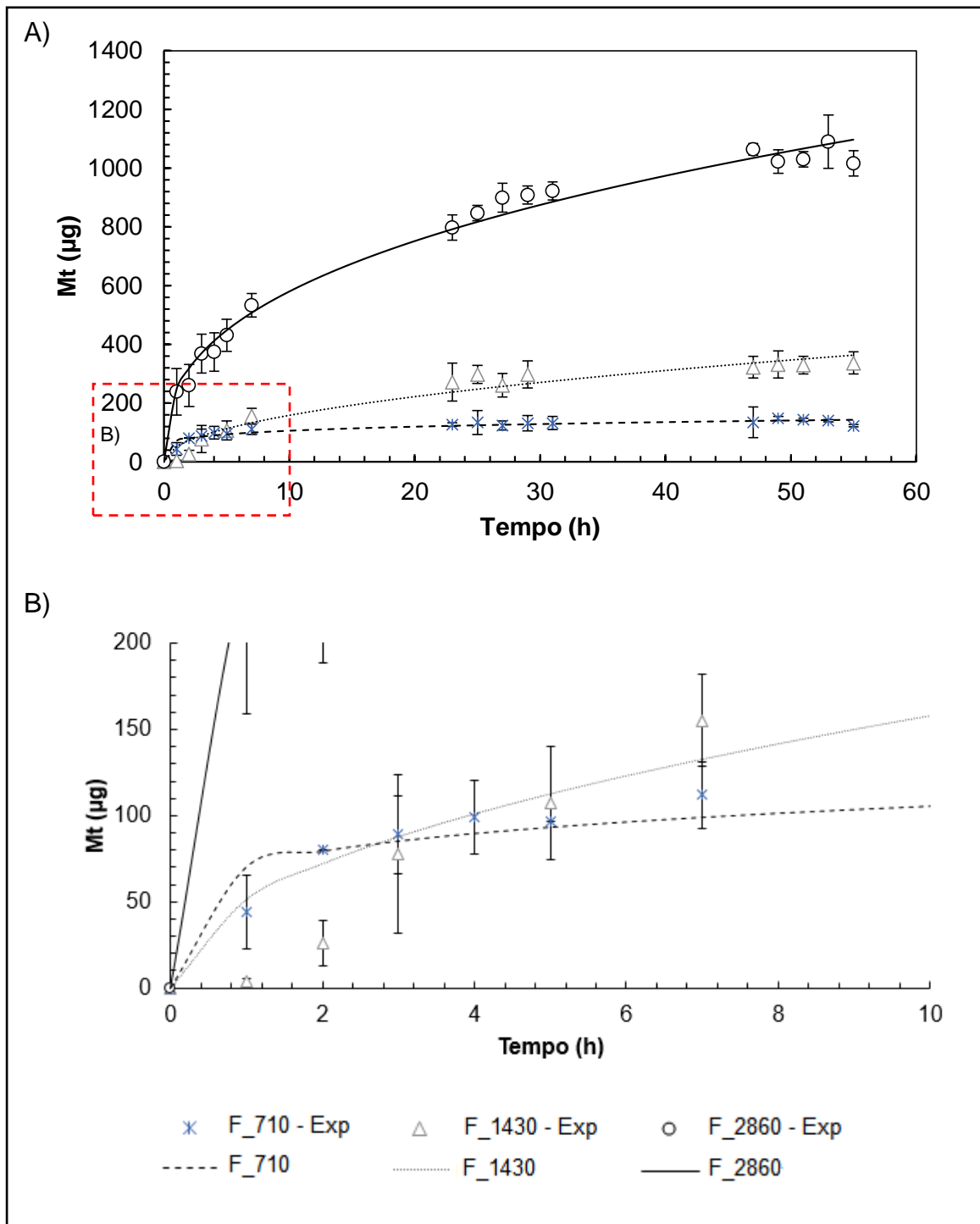


Figura 5.20. Aplicação do modelo analítico de Peppas (1985) para os dados experimentais (Exp) de liberação de cardanol a partir da matriz de PLGA em A) 55 h de ensaio e B) 10 h de ensaio, a fim de avaliar com mais clareza o perfil de liberação inicial do cardanol a partir dos filmes F\_710 e F\_1430.

Os dois principais mecanismos de liberação de fármacos baseados em PLGA são difusão do fármaco através de poros cheio de água presentes na matriz polimérica e degradação/erosão da matriz polimérica, que é determinada pela taxa de hidrólise,



(Ahmad et al., 2019; Fredenberg et al., 2011; Dinarvand et al., 2011). No entanto, PLGA hidrofóbico e de alta massa molar ( $M_w$ ), caso do PLGA 85:15, ( $M_w = 363.000 \text{ g/mol}$ ) utilizado nesta tese, degrada a uma taxa insignificante em comparação com a taxa de difusão através de uma rede porosa (Kanehashi et al. 2013). Diante disso, sugere-se que, no tempo avaliado neste estudo (55 h), o mecanismo de liberação seja baseado apenas no processo de difusão do cardanol, não sendo observada a degradação da matriz polimérica de PLGA. Esse resultado corrobora o obtido por Vatankhah et al. (2020) que utilizaram PLGA 75:25 – ou seja, com elevada quantidade de PLA em relação ao PGA, o que o torna hidrofóbico – para preparar micropartículas carregadas com ácido rosmarínico (AR). Os autores afirmaram que a alta massa molar e a alta razão PLA:PGA do PLGA empregado neste estudo fazem dele um copolímero com baixa taxa de hidrólise, portanto, a liberação do AR a partir da erosão do polímero não foi o mecanismo de liberação que controlou a taxa de liberação durante cerca de 24 h avaliadas pelos autores.

Com base na análise das curvas de liberação do cardanol a partir dos filmes de PLGA contendo massa total (MT) de cardanol de 710  $\mu\text{g}$  (F\_710), 1430  $\mu\text{g}$  (F\_1430) e 2860  $\mu\text{g}$  (F\_2860), observa-se que os percentuais em massa de cardanol liberado em relação a massa total de cardanol incorporado no filme ( $\%M_t/MT$ ) foram cerca de 21%, 23% e 38%, respectivamente, em 55 h de ensaio. No entanto, constata-se que a velocidade de liberação do cardanol a partir do filme F\_710 alcançou um perfil de estabilidade após 25 h de ensaio, enquanto que, para os filmes F\_1430 e F\_2860, somente após 47 h de ensaio este período foi atingido.

O modelo semi-empírico proposto por Peppas (1985) fornece informações indicativas sobre o tipo de fenômeno de transporte que está controlando a liberação da substância incorporada para o meio. A Tabela 5.11 apresenta os valores para a constante  $k$ , que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo em análise, e o expoente  $n$  que indica o tipo de fenômeno físico associado à liberação.

Tabela 5.11. Valores dos parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando a equação de Peppas (1985) para os filmes contendo cardanol. O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra de filme.

Filme	$n$	$k$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
F_710	0,1768	0,2318	0,9347
F_1430	0,4871	0,0208	0,9528
F_2860	0,3740	0,0486	0,9885

Em relação à cinética de liberação de cardanol a partir dos filmes avaliados, observa-se que a mesma foi mais rápida para o filme F\_710, Figura 5.20, comparada à cinética de liberação de cardanol a partir dos demais filmes (F\_1430 e F\_2860); o que é evidenciado pelo valor de  $k$  igual a  $0,2318 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$  comparado aos valores de  $k$  correspondentes a  $0,0208 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $0,0486 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$  para os filmes F\_1430 e F\_2860, respectivamente. O maior valor de  $k$  para o filme F\_710 está de acordo com o percentual em massa de cardanol liberado em função da massa total liberada em 55 h de ensaio ( $\%M_t/M_\infty$ ), sendo, nas primeiras 3 h de ensaio, correspondente a 60%. Para os F\_1430 e F\_2860, esses percentuais foram inferiores, sendo 23% e 34%, respectivamente, resultado esperando visto que o valor de  $k$  do filme F\_1430 é menor que o valor de  $k$  do filme F\_2860.

No que se refere ao tipo de fenômeno físico associado à liberação indicado pelos valores do parâmetro  $n$ , segundo os autores, Sahoo et al. (2012), Olejnik et al. (2017), Sevostyanov et al. (2020) e Rojas et al. (2022), para a geometria de filme fino, valores de  $n$  inferiores a 0,5 ( $n < 0,5$ ) indicam que o mecanismo de liberação corresponde à difusão quase-Fickiana (do inglês: *quasi-Fickian diffusion*). Diante disso, pode-se afirmar que, para todos os filmes avaliados, a liberação ocorreu por difusão quase-Fickiana. Este mecanismo indica que o cardanol se difunde através de uma matriz com poros cheios de água (Jamnongkan e Kaewpirom, 2010; Cojocarú et al., 2015), resultado que está de acordo com as imagens de MEV-FEG que revelam uma superfície porosa que serão apresentadas na seção 5.5.3.

Fazendo uma aproximação para o fenômeno de liberação por difusão Fickiana destaca-se que este se trata de um processo pelo qual a matéria é transportada, espontaneamente, de uma parte de um sistema para outra como resultado de

movimentos moleculares aleatórios. Esses movimentos moleculares aleatórios resultam no transporte de uma espécie química de uma região de maior potencial químico para uma região de menor potencial químico. Como o potencial químico está diretamente relacionado à concentração química, a difusão é mais convenientemente descrita como o transporte de uma espécie química devido a um gradiente na concentração da espécie química (Shackelford e Moore, 2013). Para um filme fino, a difusão fickiana é caracterizada pela dependência da raiz quadrada da variável tempo em relação, tanto à quantidade difundida do princípio ativo, quanto à difusão por penetração na posição frontal (Paarakh et al., 2018).

O mecanismo de difusão quase-Fickiana também foi relatado para outros compostos em matrizes poliméricas. Akpan et al. (2020) estudaram a liberação de extratos de folhas de *Annona muricata* (que apresenta ação contra células do câncer de mama) a partir de *scaffolds* eletrofiados de PLGA/gelatina e plurônico F127, como surfactante. Os extratos de *Annona muricata* contêm altas concentrações de metabólitos secundários como, alcalóides, terpenóides, flavonóides, cumarinas, taninos e fenóis. Os autores aplicaram o modelo descrito por Peppas e obtiveram valores de  $n$  inferiores a 0,45, sendo, portanto, o mecanismo que descreve a liberação correspondente à difusão quase-Fickiana, já que se trata de uma matriz cilíndrica. A liberação do extrato a partir dos *scaffolds* ocorreu em três estágios: liberação inicial mais rápida (primeira hora), liberação moderada (12 h) e liberação lenta e sustentada (72 h). A partir desse estudo, os autores concluem que *scaffolds* eletrofiados de PLGA/gelatina e plurônico F127 contendo extratos de *Annona muricata* têm potencial para serem utilizados no tratamento de câncer de mama.

O mecanismo de difusão quase-Fickiana também foi relatado por Vatankhah et al. (2020). Os autores prepararam micropartículas de PLGA carregadas com ácido rosmarínico (AR), composto fenólico com atividades antioxidantes e antibacterianas. Os autores avaliaram quatro formulações, P3R5, P3R10, P5R5 e P5R10, que foram preparadas a partir da mistura de soluções de PLGA (3% e 5%) e AR (5% a 10% em relação ao PLGA) em acetona - como exemplo, a formulação P3R5 apresenta 3% de PLGA e 5% de AR. O modelo de Peppas foi aplicado para realizar a avaliação da liberação de AR a partir das micropartículas de PLGA, sendo que as micropartículas P3R5 e P3R10 seguiram o mecanismo de difusão Fickiana, enquanto as

micropartículas P5R5 e P5R10 descreveram o mecanismo de difusão quase-Fickiana, já que os valores de  $n$  foram inferiores a 0,43 que, para a geometria esférica, é indicativo deste mecanismo de liberação, conforme propõe o autor do estudo, que corrobora outros autores (Olejnik et al., 2017; Sahoo et al., 2012). Em relação ao parâmetro  $k$ , os autores constataram que ao diminuir a concentração de AR e manter a concentração de PLGA constante, ocorre um aumento deste valor. Este resultado corrobora o obtido no presente estudo, já que foi observado um maior valor de  $k$  para o filme F\_710 que apresenta quantidade de cardanol 50% e 75% menor que as quantidades de cardanol presentes nos filmes F\_1430 e F\_2860, respectivamente.

Na literatura, não foram encontrados estudos que avaliaram o mecanismo de liberação do cardanol a partir de matrizes de PLGA. No entanto, cita-se o estudo de Massaro et al. (2015) que discutiu o mecanismo de liberação do cardanol a partir de nanotubos de haloisita modificados com sais de triazólio hidrofóbicos. Os autores avaliaram a liberação do cardanol em três soluções de pH diferentes, já que o pH é um fator chave que influencia a administração oral do fármaco. A liberação de cardanol, em pH 1, a partir dos nanotubos, atinge um perfil estável após cerca de 250 min, sendo uma explosão inicial (efeito *burst*) observada em 200 min, seguida por uma liberação prolongada. Os perfis de liberação obtidos em pH 6 e em pH 7,4 apresentaram comportamento semelhante ao pH 1, mas, em ambos os casos, uma menor quantidade de cardanol foi liberada dos sistemas. A fim de determinar a cinética e o mecanismo de liberação de cardanol a partir dos nanotubos, os autores analisaram os dados experimentais utilizando quatro modelos matemáticos: modelo da equação de primeira ordem (Gibaldi e Feldman, 1967); modelo exponencial duplo (Wilczak e Keinath, 1993); modelo de raiz quadrada de Higuchi (Higuchi, 1963) e a lei de potência (Ritger e Peppas, 1987; Siepmann e Peppas, 2001). A partir da análise dos coeficientes de correlação ( $R^2$ ), os autores concluíram que o modo de liberação do cardanol segue a cinética de primeira ordem ( $R^2 > 0,97$ ), sugerindo que o processo de liberação seja devido à somente uma etapa de dessorção, já que o cardanol está adsorvido apenas na superfície externa do nanotubo. Neste estudo, no entanto, os autores obtiveram, para o equacionamento de Peppas (Ritger e Peppas, 1987; Siepmann e Peppas, 2001), valores de  $R^2$  superiores a 0,90, indicando, portanto, que este modelo também pode ser utilizado para a determinação da cinética de liberação do cardanol. Esse resultado, portanto, sustenta a aplicação do modelo de Peppas

(1985), utilizado nesta tese, para estudar a cinética e o mecanismo de liberação do cardanol a partir da matriz de PLGA.

Os coeficientes de correlação da regressão ( $R^2$ ), como mostra a Tabela 5.11, confirmaram a aceitabilidade do modelo de Peppas (1985) para a análise da liberação de cardanol a partir dos filmes de PLGA; sendo o conhecimento dos mecanismos de liberação e dos processos físico-químicos que influenciam a taxa de liberação fundamental para desenvolver dispositivos de liberação controlada. Os dados experimentais obtidos a partir do estudo da liberação do cardanol a partir da matriz de PLGA são preliminares e indicam que os filmes preparados têm potencial para serem aplicados como dispositivos de liberação controlada. A proposta de aplicação desses filmes é utilizá-los como *scaffolds* para o tratamento local do câncer de bexiga, no entanto, os filmes devem ser avaliados em ensaios pré-clínicos (*in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*) a fim de determinar a quantidade de cardanol que deve ser incorporada com base na dose terapêutica, bem como no tempo ideal de liberação, visando ao efeito farmacológico desejado. Ensaios pré-clínicos das amostras de filmes preparados não foram realizados, por não fazerem parte do escopo do trabalho, sendo, portanto, uma proposta para trabalhos futuros.

### **5.5.3. Técnicas de caracterização dos filmes biodegradáveis de PLGA**

#### **5.5.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)**

Os filmes biodegradáveis de PLGA puro (F\_puro) e com cardanol incorporado com frações mássicas de 0,354% (F\_710), 0,710% (F\_1430) e 1,410% (F\_2860) foram preparados por meio da técnica de evaporação de solvente, conforme descrito na seção 4.7.1. As morfologias das superfícies dos filmes foram avaliadas por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG), Figura 5.21.

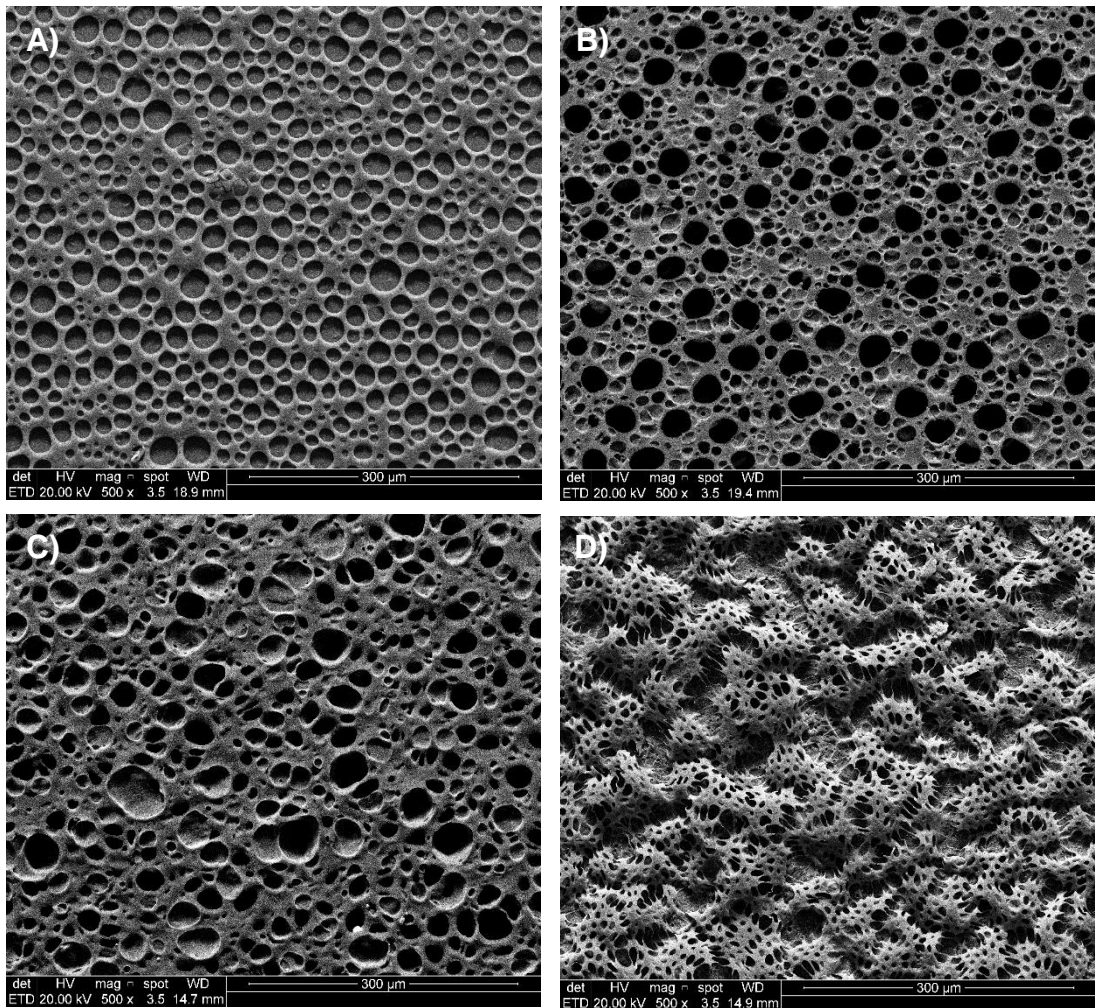


Figura 5.21. Imagens de MEV-FEG dos filmes biodegradáveis de PLGA preparados: (A) F\_puro; (B) F\_710; (C) F\_1430 e (D) F\_2860.

A partir da análise da Figura 5.21, é possível observar a presença de uma estrutura porosa bem distribuída nas superfícies de todas as amostras de filmes avaliadas. No entanto, a obtenção de filmes biodegradáveis porosos, geralmente, envolve o uso de técnicas como: formação de espuma por gás (*gas foaming*), evaporação de solvente/lixiviação de partículas (*solvent casting/particulate leaching*) ou por separação de fases (*phase separation*) (Mikos et al., 2000). Nesta tese, todavia, filmes porosos de PLGA foram obtidos utilizando a técnica de evaporação de solvente, sem adição de agente porogênico (como cloreto de sódio, por exemplo).

Diante disso, sugere-se que o mecanismo para explicar a geração de poros nos filmes poliméricos preparados pela técnica de evaporação de solvente seja baseado em um fenômeno chamado “*breath figure*” (Figura 5.22). Ponnusamy et al. (2012),

prepararam filmes de PLGA com morfologia porosa, muito semelhante a obtida nesta tese, sendo esta explicada por este fenômeno (*breath figure*).

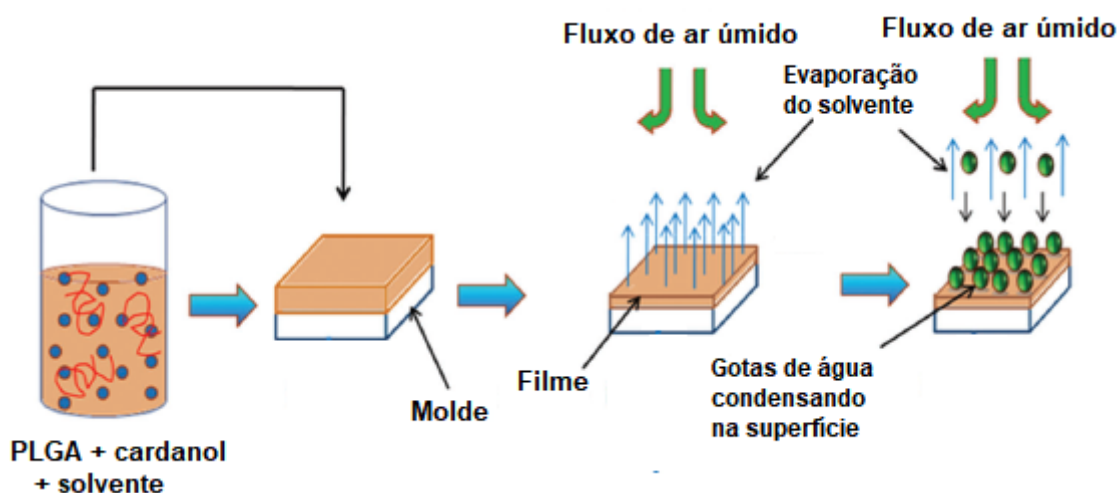


Figura 5.22. Esquema representativo do fenômeno “*breath figure*”  
(Adaptado de Ponnusamy et al., 2012).

Este fenômeno envolve um polímero hidrofóbico (PLGA) dissolvido em um solvente volátil imiscível com a água ( $\text{CHCl}_3$ ). Ao verter a solução do polímero no molde (placa Petry), em um ambiente úmido, o resfriamento provocado pelo solvente pode fazer com que as moléculas de água do ar circundante condensem na superfície do filme polimérico. Neste caso, as gotas de água agem como esferas duras, deixando marcas circulares e, finalmente, formando poros circulares após a evaporação (Huang e Thomas, 2018).

Ao analisar as superfícies dos filmes (Figura 5.21), constata-se que a adição de quantidades de cardanol correspondentes às frações mássicas de 0,354% (F\_710) e 0,710% (F\_1430) não provocaram alterações significativas na superfície da matriz de PLGA. No entanto, alterações significativas foram observadas ao comparar as superfícies dos filmes F\_puro, F\_710 e F\_1430 (Figuras 5.21A-B-C, respectivamente) com a superfície do filme F\_2860 (Figura 5.21D) que apresenta 1,410% de cardanol: nesta superfície, constata-se a presença de aglomerados com poros de tamanhos inferiores e com morfologia que se difere da observada para os demais filmes avaliados. Possivelmente, a alteração no tamanho do poro esteja associada a

diferentes taxas de evaporação do solvente. Segundo Preuksarattanawut et al. (2019) uma diminuição do tamanho do poro está associada a uma alta taxa de evaporação.

A porosidade apresentada pelos filmes de PLGA com cardanol incorporado, preparados neste trabalho, é uma importante propriedade exibida por biomateriais utilizados na área médica, já que a existência de poros favorece o crescimento e a proliferação celular facilitando a formação de novos tecidos biológicos, além de contribuir com a liberação controlada de fármacos a partir de matrizes poliméricas biodegradáveis (Nishimura e Murakami, 2021; Nahuis et al., 2019).

Considerando que a proposta de aplicação dos filmes de PLGA com cardanol incorporado preparados esteja voltada para o tratamento local do câncer de bexiga, o estudo desenvolvido por Obayemi et al. (2020) apresenta resultados que contribuem com esta proposta. Obayemi et al. (2020) prepararam *scaffolds* porosos carregados com fármacos anticâncer (paclitaxel) a partir de blendas poliméricas de poli(ácido láctico-co-glicólico), polietilenoglicol e policaprolactona. Os autores observaram que a porosidade apresentada pelo *scaffold* favoreceu a proliferação, a nutrição e a migração celular, sendo que a liberação localizada do fármaco a partir desses *scaffolds* pode ser usada para tratar tumores de mama locais recorrentes e promover a regeneração normal do tecido mamário após a ressecção cirúrgica.

#### 5.5.3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada com o objetivo de caracterizar as amostras em relação à estrutura química das mesmas. Foi realizada a análise do extrato (Cardanol Extrato), obtido na condição de 50 °C/150 bar e, a fim de comparação, também foi realizada a análise do LCC técnico comercial (LCC Comercial) e do cardanol padrão comercial (Cardanol Padrão). Os espectros na região do infravermelho são apresentados na Figura 5.23.



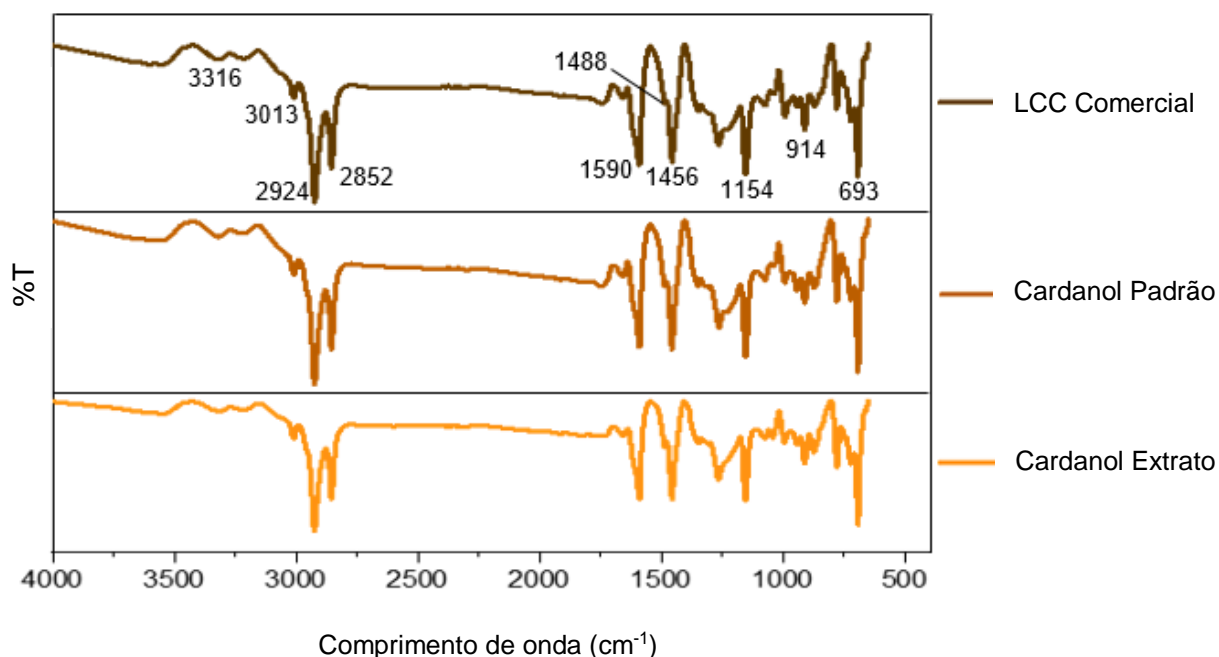


Figura 5.23. FTIR do LCC Comercial, do Cardanol Padrão e do Cardanol Extrato.

Os espectros na região do infravermelho obtidos para as três amostras avaliadas (Cardanol Extrato, Cardanol Padrão e LCC Comercial) (Figura 5.23) são muito semelhantes e revelam características estruturais consistentes com a literatura. Os espectros analisados apresentam as seguintes bandas de absorção: bandas referentes ao estiramento OH fenólico são observadas em 3316 cm<sup>-1</sup> e 1265 cm<sup>-1</sup> (Mele et al., 2019; Kanehashi et al., 2015); o estiramento observado em 3013 cm<sup>-1</sup> corresponde à CH aromático, enquanto os estiramentos constatados em 2924 cm<sup>-1</sup> e em 2852 cm<sup>-1</sup> correspondem, respectivamente, aos grupos CH e CH<sub>2</sub> alifáticos presentes na cadeia lateral do cardanol. Em 1488 cm<sup>-1</sup>, são verificadas vibrações deformativas que indicam a presença dos grupos CH<sub>3</sub> (Srivastava e Srivastava, 2015). Em 1590 cm<sup>-1</sup> e 1456 cm<sup>-1</sup> têm-se a deformação axial C=C ao longo do eixo e o estiramento C=C de anel aromático (Lochab et al., 2014). Em 1154 cm<sup>-1</sup>, evidencia-se a banda referente à ligação C-OH (fenólico) (Zafar et al., 2020) e, por fim, grupos vinil são observados em 914 cm<sup>-1</sup> e 693 cm<sup>-1</sup> (Lochab et al., 2014).

Os filmes de PLGA puro e com cardanol incorporado também foram analisados por FTIR. A Figura 5.24 apresenta os espectros na região do infravermelho dos filmes preparados, bem como o espectro do Cardanol Extrato.

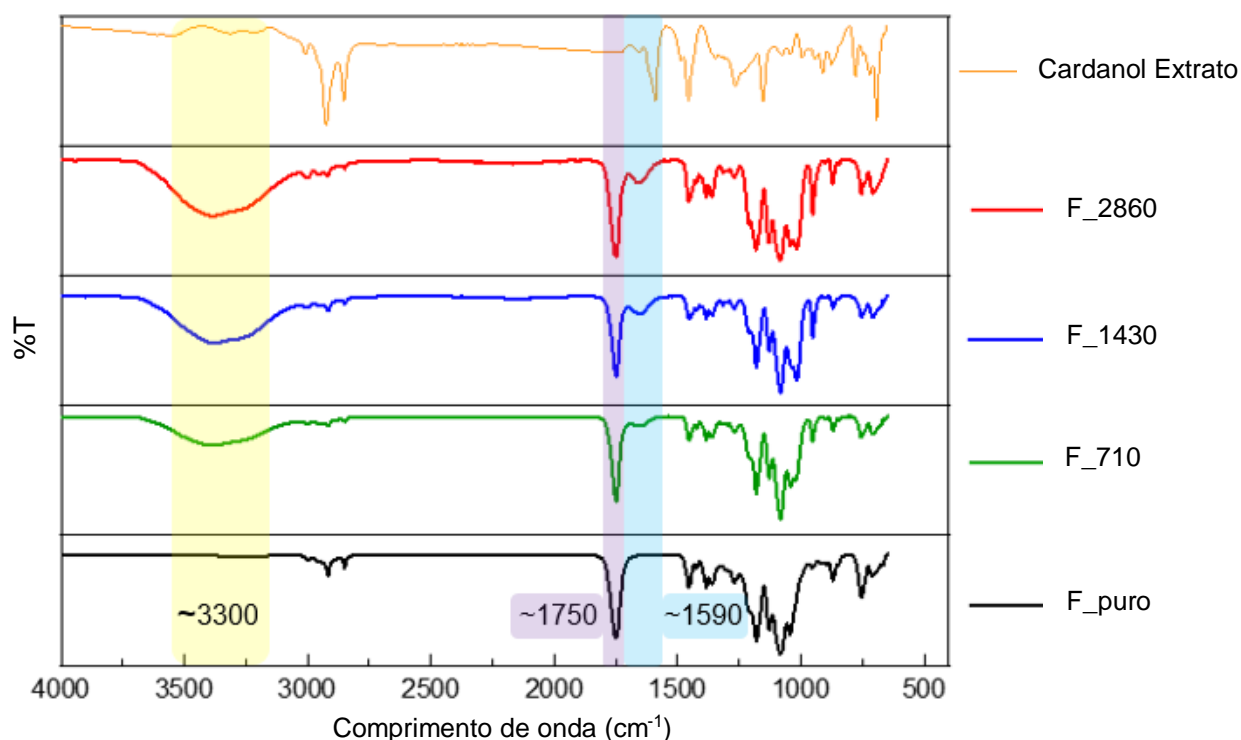


Figura 5.24. FTIR do Cardanol Extrato e dos filmes de PLGA puro e com cardanol incorporado (F\_puro, F\_710, F\_1430 e F\_2860).

A incorporação de cardanol na matriz de PLGA foi confirmada por análises de FTIR, conforme mostrado na Figura 5.24. Para identificar e comparar as bandas relacionadas às ligações químicas de cardanol, o espectro de Cardanol Extrato também é exibido. As bandas características das vibrações das ligações existentes no PLGA estão presentes em todas as amostras de filmes avaliadas e correspondem às bandas de absorção fortes em  $1750\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas às vibrações de estiramento de grupos carbonila, e em  $1180\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas ao modo de estiramento C–O–C. A presença de cardanol foi confirmada pelo aparecimento das bandas em aproximadamente  $3300\text{ cm}^{-1}$  e  $1590\text{ cm}^{-1}$  que são atribuídas, respectivamente, ao estiramento assimétrico da ligação O–H fenólica e ao estiramento das ligações aromáticas C=C, cuja intensidade está relacionada ao aumento do teor de cardanol incorporado. Essas bandas ( $3300\text{ cm}^{-1}$  e  $1590\text{ cm}^{-1}$ ) não são observadas no espectro do PLGA puro. Esse resultado corrobora o obtido por Mele et al. (2019) que avaliaram a influência da adição do cardanol em filmes de PLA a partir de análises por FTIR.

Acrescenta-se ainda que o alargamento do pico referente à hidroxila observado na região em cerca de  $3300\text{ cm}^{-1}$  seja, possivelmente, devido às ligações de hidrogênio ( $\text{O-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ ) entre os grupos hidroxil fenólico do cardanol e os grupos carboxílicos do PLGA (Figura 5.25). Este alargamento da banda da hidroxila também foi associado às ligações de hidrogênio na análise de FTIR realizada por Chai et al. (2018) ao estudar blendas de PDLLA/PVA (Poli(D,L-ácido láctico)/Álcool polivinílico).

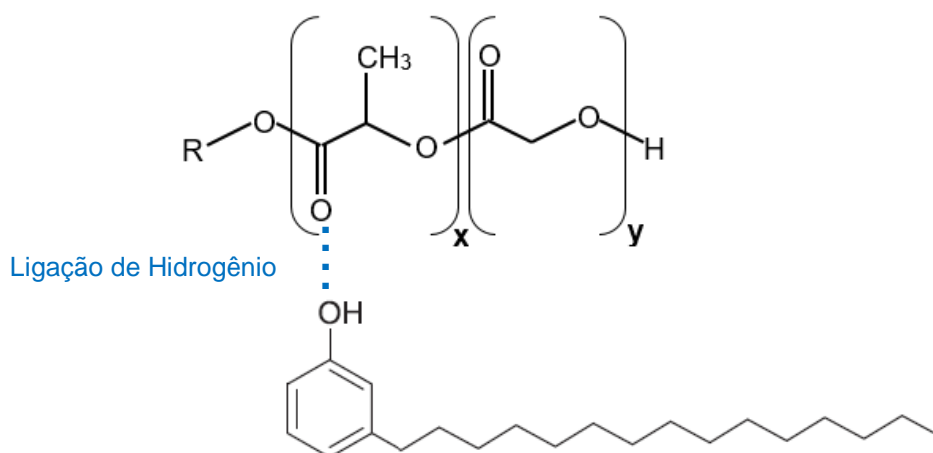


Figura 5.25. Ligação de Hidrogênio entre o grupo hidroxila do cardanol e o grupo carboxil do PLGA.

### 5.5.3.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica através da qual se realiza a medida do fluxo de calor diferencial entre uma amostra de estudo e uma de referência como função da temperatura e do tempo. Esta técnica é amplamente utilizada para medir as transições endotérmicas e exotérmicas dos polímeros (Knopp et al., 2016). Neste trabalho, esta técnica foi proposta para avaliar as interações entre os componentes que compõem os filmes através da comparação das curvas de DSC do filme de PLGA puro com as curvas obtidas para os filmes contendo cardanol incorporado. Sendo que estas interações são avaliadas através da observação do desaparecimento, aparecimento ou deslocamento de picos nas curvas de DSC (Pereira et al., 2014).

As temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e de fusão ( $T_f$ ) dos filmes foram determinadas utilizando a análise calorimétrica diferencial (DSC). A Figura 5.26

apresenta as curvas de DSC e a Tabela 5.12 apresenta os dados calorimétricos obtidos a partir destas curvas.

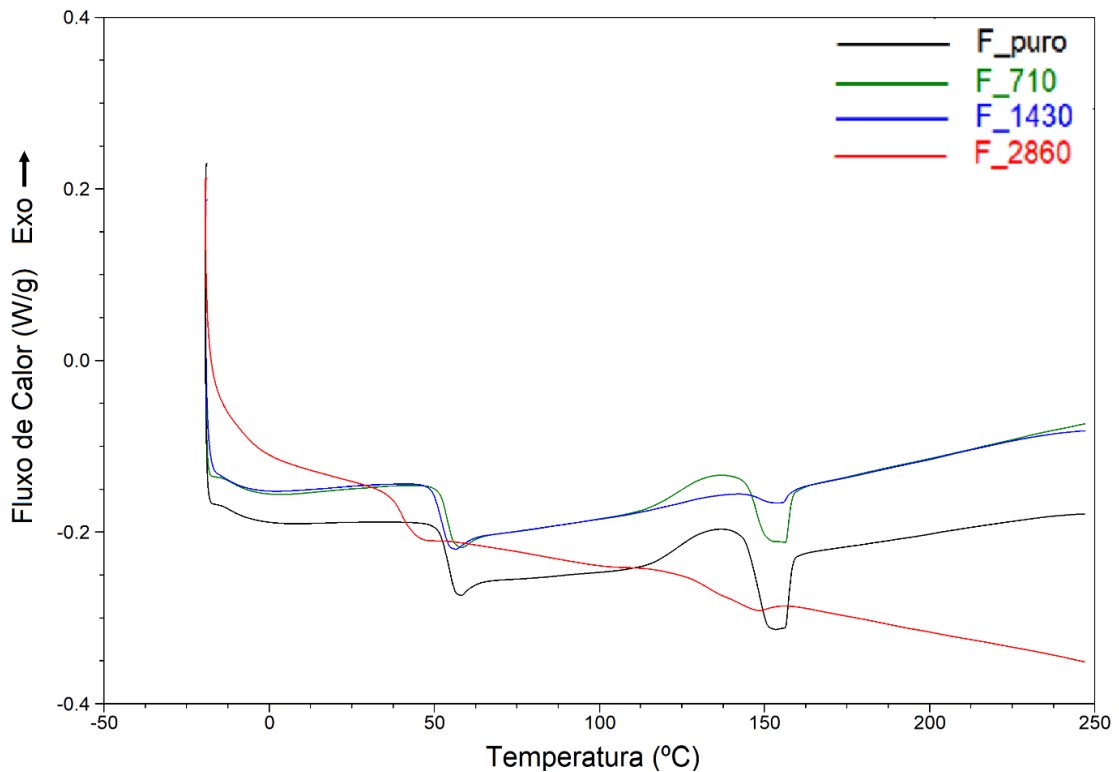


Figura 5.26. Curvas de DSC dos filmes: F\_puro; F\_710; F\_1430 e F\_2860 (segundo ciclo de aquecimento).

Tabela 5.12. Dados calorimétricos das amostras obtidos a partir das curvas de DSC.

Amostra	Tg (°C)	Tf (°C)
F_puro	55	152
F_710	54	152
F_1430	53	155
F_2860	40	144

A Figura 5.26 apresenta a curva de DSC do filme de PLGA puro, onde pode ser observada a ocorrência de dois eventos endotérmicos: em 55 °C, característico da transição vítrea (Tg) do polímero; e em 152 °C, correspondente à temperatura de fusão do polímero. Este resultado está de acordo com o descrito por Nahuis et al. (2019).

Ao analisar as curvas de DSC dos filmes de PLGA contendo 710  $\mu\text{g}$  e 1430  $\mu\text{g}$  de cardanol incorporado (F\_710 e F\_1430, respectivamente), pode-se constatar que não houve alteração significativa nos valores de Tg e de Tf destes filmes, comparados aos valores obtidos para o filme de PLGA puro.

No entanto, a curva de DSC do filme contendo 2860  $\mu\text{g}$  de cardanol (F\_2860), revela um deslocamento do pico endotérmico referente à Tg comparado ao pico endotérmico correspondente à Tg do PLGA puro. A adição desta quantidade de cardanol na matriz de PLGA, reduziu a Tg do polímero puro de 55 °C para 40 °C. A diminuição da Tg indica que o cardanol, utilizado nesta quantidade, agiu como um plastificante diminuindo, portanto, a interação entre as moléculas do PLGA, afastando-as e assim facilitando o movimento das cadeias poliméricas. Além disso, provocou a redução da Tf do PLGA puro: de 152 °C para 144 °C. Este resultado é, possivelmente, devido à dispersão do cardanol na matriz polimérica, o que faz com que a energia necessária para a conversão do estado sólido para o líquido seja menor, o que pode indicar uma possível interação entre o cardanol e o polímero, pois quando um material sofre uma alteração em seu estado físico-químico ou reage quimicamente, o calor associado a essa alteração é absorvido ou liberado (Cardoso et al., 2018).

Esses resultados corroboram os obtidos por Cardoso et al. (2018) ao avaliar as propriedades térmicas de micropartículas de poli(ácido láctico) (PLA) contendo diferentes quantidades de cardanol encapsulado. Os autores observaram o deslocamento dos picos de fusão para temperaturas mais baixas do que as observadas inicialmente para as micropartículas de PLA sem cardanol, sendo que quanto maior a concentração de cardanol nas micropartículas, maior foi esse deslocamento.

#### 5.5.3.4. Determinação do ângulo de contato

A determinação do ângulo de contato é um método utilizado para estimar a molhabilidade de uma superfície, sendo esta correspondente à facilidade de espalhamento do líquido na superfície do biomaterial (Agrawal et al., 2017).

Biomaterial é toda substância (exceto fármacos) ou combinações de substâncias, de origens sintéticas ou naturais, que durante um período de tempo indeterminado, é empregada como um todo ou em parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de qualquer tecido, órgãos ou funções corporais (Williams, 2008). É importante, portanto, que os biomateriais apresentem propriedades de superfícies adequadas para evitar reações inflamatórias e infecções. Dentre estas propriedades, destaca-se a molhabilidade que corresponde a um importante fator para garantir a resposta biológica desejada, como a interação das células e tecidos com o biomaterial (Agrawal et al., 2017). A molhabilidade do biomaterial influencia, portanto, a biocompatibilidade que se refere ao sucesso determinado pela interação entre o biomaterial e as células para uma aplicação biomédica específica (Menzies e Jones, 2010).

Para avaliar esta propriedade, foram determinados os valores do ângulo de contato das superfícies dos filmes. Esses dados foram expressos como média±desvio padrão e são apresentados na Tabela 5.13. As imagens do ângulo de contato de uma gota de água deionizada na superfície dos filmes avaliados são apresentadas na Figura 5.27.

Tabela 5.13. Medidas do ângulo de contato entre a interface filme-água.

Amostra	Ângulo de contato (°)
F_puro	78,7±0,3
F_710	84,5±0,4
F_1430	85,8±0,5
F_2860	86,8±0,1

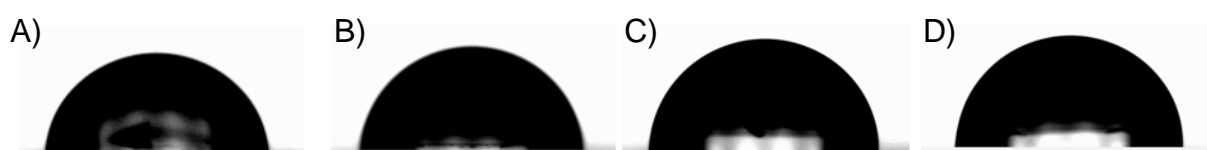


Figura 5.27. Imagens do ângulo de contato de uma gota de água deionizada na superfície de: (A) F\_puro, 78,6°; (B) F\_710, 84,7°; (C) F\_1430, 85,7°; (D) F\_2860, 86,7°.

Observa-se que a adição de cardanol provocou o aumento do ângulo de contato do filme de PLGA puro, tornando, dessa forma, as superfícies dos filmes menos hidrofílicas. Esse resultado é consistente com a natureza hidrofóbica do cardanol. É importante destacar que os valores dos ângulos de contato dos filmes contendo cardanol aumentaram com o aumento na quantidade de cardanol adicionado, conforme o esperado. Esse resultado corrobora os obtidos por Massaro et al. (2015) que exploraram nanotubos de haloisita como carreadores de cardanol. Os autores observaram um aumento significativo no valor do ângulo de contato dos nanotubos com a adição de cardanol e atribuíram este aumento à natureza hidrofóbica do material.

Assim, embora o cardanol, de natureza hidrofóbica, tenha sido adicionado na matriz de PLGA, as superfícies dos filmes preparados, de acordo com o valor do ângulo de contato, classificam-se como hidrofílicas, segundo a classificação proposta por Ferrari et al. (2019) (Tabela 5.14), já que apresentam valores de ângulo de contato na faixa de 10 a 90°.

Tabela 5.14 Classificação da superfície em função do ângulo de contato (°).

<b>Ângulo de contato (°)</b>	<b>Superfície</b>
< 10	Superhidrofílica
10 – 90	Hidrofílica
90 – 150	Hidrofóbica
> 150	Superhidrofóbica

A hidrofiliabilidade é uma propriedade importante para os biomateriais, pois aumenta a adesão, a proliferação e o crescimento celular (Fonner et al., 2008; Liu, H. et al., 2012). Superfícies hidrofóbicas, no entanto, têm alta afinidade com uma ampla variedade de proteínas. A adsorção de proteínas plasmáticas - por exemplo, albumina e fibrinogênio - associadas ao implante e às mudanças conformacionais promovem reações inflamatórias. Dessa forma, as superfícies hidrofílicas podem aumentar a biocompatibilidade do material, já que tem pouca afinidade com essas proteínas (Thevenot et al., 2008).

Considerando que a aplicação que se propõe aos filmes preparados neste trabalho esteja voltada à terapia do câncer, a hidrofiliçidade (aumento da adesão celular) torna-se ainda mais relevante, já que, em geral, a adesão de células cancerosas é menor comparada a de células saudáveis, o que permite que as mesmas migrem, resultando na perda da estrutura histológica (Ferrari et al., 2019).



## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico mostrou-se uma tecnologia limpa e promissora para a obtenção de cardanol a partir do LCC técnico comercial. A condição ótima de extração foi definida, a partir do planejamento Box-Behnken, como pressão, temperatura e vazão de solvente de, respectivamente, 200 bar, 48 °C e 884 g/h. A partir desta condição, estimou-se a obtenção de um extrato contendo 57,82% de cardanol por massa de LCC investido. Este método apresentou aderência aos dados experimentais ( $R^2 = 0,929$ ), sendo que a análise estatística apontou a pressão e a temperatura como variáveis significativas para um intervalo de confiança de 95%.

A solubilidade do cardanol em CO<sub>2</sub> supercrítico, importante parâmetro para este estudo, foi obtida a partir de medidas experimentais. Na condição de temperatura e pressão de, respectivamente, 50 °C e 150 bar, a solubilidade determinada foi de 0,087 g<sub>Cardanol</sub>/kg<sub>CO2</sub>, correspondente à fração mássica de  $8,7 \cdot 10^{-5}$ ; estando esta ordem de grandeza de acordo com os valores encontrados na literatura para a solubilidade de compostos fenólicos em CO<sub>2</sub> supercrítico. Este resultado é de suma relevância, pois o equilíbrio líquido-vapor da mistura cardanol/CO<sub>2</sub> corresponde a um sistema extremamente complexo.

Com a solubilidade predita pelo modelo termodinâmico, o modelo de transferência de massa, proposto por Sovová (2005), foi utilizado para estimar o coeficiente de transferência de massa, sendo este correspondente à  $1,02 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , compatível com os dados previamente reportados, na literatura, para a extração de moléculas semelhantes.

A partir da análise da estrutura química dos extratos empregando a técnica de RMN <sup>1</sup>H, foi comprovada a obtenção de cardanol, sendo este presente nos extratos

em concentração de até 94%, superior às quantidades de cardanol presentes no LCC técnico comercial (89%) e no Cardanol padrão comercial (93%), determinadas por CG/EM. A concentração de cardanol, presente no extrato obtido, foi mais elevada em comparação às encontradas, na literatura, ao utilizar métodos convencionais de extração de cardanol a partir do LCC, como cromatografia em coluna ou a partir do uso do extrator Soxhlet.

Com base na avaliação da atividade citotóxica dos extratos, foi constatado que o extrato rico em cardanol apresentou a maior toxicidade contra as células T24 ( $IC_{50}$  de 21,50  $\mu\text{g/mL}$ ) e menor toxicidade frente às células M059J ( $IC_{50}$  de 86,58  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo que as células Vero apresentaram um valor de  $IC_{50}$  de 34,00  $\mu\text{g/mL}$ . Diante deste resultado, pode-se concluir que, nas concentrações estudadas, o extrato rico em cardanol tem potencial de ser aplicado para o tratamento do câncer de bexiga (T24) e glioblastoma (M059J).

O extrato rico em cardanol foi incorporado em uma matriz de PLGA a fim de ser produzido um biomaterial capaz de substituir o tecido canceroso removido cirurgicamente. Ensaio de liberação de cardanol a partir da matriz de PLGA foram conduzidos e, a partir da modelagem matemática da cinética, concluiu-se que a cinética de liberação de cardanol foi mais rápida a partir do filme F\_710 ( $k=0,2318 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ ) comparada à cinética de liberação de cardanol a partir dos filmes F\_1430 ( $k=0,0208 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ ) e F\_2860 ( $k=0,0486 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Com o parâmetro  $n$ , determinado mediante à aplicação do modelo de Peppas (1985), foi constatado que o tipo de fenômeno físico associado à liberação corresponde à difusão quase-Fickiana. Este mecanismo indica que o cardanol se difunde através de uma matriz com poros cheios de água; resultado que está de acordo com as imagens de MEV-FEG que revelaram a presença de poros nas superfícies dos filmes. A porosidade é uma propriedade que favorece o crescimento e a proliferação celular, além de contribuir com a liberação controlada de fármacos, sendo, portanto, uma importante propriedade exibida por biomateriais utilizados na área médica.

A partir das análises dos filmes e dos extratos por FTIR, foi confirmada a incorporação do cardanol na matriz de PLGA, sendo evidenciada uma possível interação por ligações de Hidrogênio entre os grupos fenólicos do cardanol e os

grupos carboxílicos do PLGA. Esse resultado corrobora o obtido a partir da análise por DSC, a partir da qual, foi identificada a redução das temperaturas de fusão e de transição vítrea do filme F\_2860 em relação aos valores referentes ao PLGA puro, indicando uma possível interação entre o cardanol e o PLGA.

Os filmes de PLGA com cardanol incorporado também foram avaliados quanto à hidrofiliabilidade da superfície mediante à determinação do ângulo de contato. Foi constatado que a quantidade de cardanol adicionado, embora este apresente natureza hidrofóbica, manteve o caráter hidrofílico da superfície do PLGA utilizado nesta tese. Sendo a hidrofiliabilidade uma importante propriedade para os biomateriais, já que está associada ao aumento da adesão, da proliferação e do crescimento celular, conclui-se que este resultado contribui com as características requeridas por biomateriais que se destinam à área médica.

Ressalta-se, finalmente, que o ineditismo desta tese se deve ao fato de não terem sido encontrados, na literatura disponível, dados referentes à solubilidade do cardanol em CO<sub>2</sub> supercrítico, à toxicidade do cardanol frente às células de câncer de bexiga e glioblastoma, bem como à incorporação de cardanol em filmes de PLGA com proposta para aplicação na terapia do câncer.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

As atividades programadas e trabalhos futuros a serem desenvolvidos estão apresentados abaixo:

1. Realizar extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico na condição otimizada, determinada a partir da metodologia de superfície de resposta com Planejamento Box-Behnken, a fim de comparar a concentração de cardanol obtido com o valor previsto pelo método, com intuito de validá-lo.
2. Avaliar a atividade citotóxica do cardanol em diferentes concentrações em relação às que foram utilizadas nesta tese, como: 10, 20, 30 e 75 µg/mL. Desta forma, será possível explorar, com mais detalhamento, o perfil de toxicidade do cardanol frente às linhagens de células de câncer estudadas.
3. Aumentar o tempo de avaliação da atividade citotóxica do cardanol frente às linhagens celulares estudadas, através do protocolo MTT, para 48 h; avaliar a dinâmica populacional e a morte celular após o tratamento.
4. Avaliar a atividade citotóxica do cardanol incorporado em filmes de PLGA frente às células de câncer estudadas e relacioná-la ao perfil de liberação de cardanol a partir da matriz de PLGA obtido nesta tese. De posse deste resultado, determinar a quantidade de cardanol que deve ser incorporado com base na dose terapêutica, bem como no tempo ideal de liberação, visando ao efeito farmacológico desejado.
5. Investigar o emprego de uma metodologia de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas que permita a quantificação e

diferenciação das estruturas presentes no cardanol que se diferem apenas pelo grau de instauração da cadeia alifática.

6. Avaliar as propriedades mecânicas dos filmes preparados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, G. et al. Wettability and contact angle of polymeric biomaterials. In: **Characterization of Polymeric Biomaterials**. Woodhead Publishing, 2017. p. 57-81.

AHMAD, H. et al. PLGA scaffolds: building blocks for new age therapeutics. In: **Materials for Biomedical Engineering**. Elsevier, 2019. p. 155-201.

AL-HAZZANI, Amal et al. Formulation of cashew nut shell liquid (CSNL) nanoemulsion, a potent inhibitor of human MCF-7 breast cancer cell proliferation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 7, p. 1384-1388, 2012.

ALMAJHDI, F. N. et al. In-vitro anticancer and antimicrobial activities of PLGA/silver nanofiber composites prepared by electrospinning. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 4, p. 1045-1053, 2014.

AMMERMAN, N. C.; BEIER-SEXTON, Magda; AZAD, Abdu F. Growth and maintenance of Vero cell lines. **Current Protocols in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. A. 4E. 1-A. 4E. 7, 2008.

ANAND, R.; Nair, B. P. Anacardic acid and cardanol: Prospective applications for cancer therapy, drug delivery, and imaging. In: **Cashew nut shell liquid**. Springer, Cham, 2017. p. 145-161.

ANDRADE, T.J.A.S. et al. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). **Food Chemistry**, v. 126, p. 1044-1048, 2011.

ASHRAF, S. M.; Rathinasamy, K. Antibacterial and anticancer activity of the purified cashew nut shell liquid: implications in cancer chemotherapy and wound healing. **Natural Product Research**, v. 32, n. 23, p. 2856-2860, 2018.

BALGUDE, D. B.; Sabnis, A. S.; Ghosh, S. K. Designing of cardanol based polyol and its curing kinetics with melamine formaldehyde resin. **Designed Monomers and Polymers**, v. 20, n. 1, p. 177-189, 2017.

BALGUDE, D.; Sabnis, A. S. CNSL: an environment friendly alternative for the modern coating industry. **Journal of Coatings Technology and Research**, v. 11, n. 2, p. 169-183, 2014.

BALGUDE, D.; Sabnis, A.; Ghosh, S. K. Synthesis and characterization of cardanol based reactive polyamide for epoxy coating application. **Progress in Organic Coatings**, v. 104, p. 250-262, 2017.

BARTON, P.; Jr. Hughes, R. E.; Hussein, M. M. Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 5, n. 3, p. 157-162, 1992.

BHANOT, A.; Sharma, R.; Noolvi, M. N. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 09-26, 2011.

BOX, G. E. P.; Behnken, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455-475, 1960.

BRUN, G. W. et al. Crystallization of caffeine by supercritical antisolvent (SAS) process: analysis of process parameters and control of polymorphism. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 4, p. 1943-1951, 2012.

CAILLOL, S. Cardanol: A promising building block for biobased polymers and additives. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 26-32, 2018.

CARDOSO, J. J. F. et al. Influence of cardanol encapsulated on the properties of poly (lactic acid) microparticles. **Química nova**, v. 41, p. 273-283, 2018.

CASSEL, E.; Vargas, R. M. F.; Brun, G. W. In: **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterapêuticos**. Processos de extração supercrítica aplicados a produtos naturais. Porto Alegre, 2008, 2ª ed.

CASTIGLIONI, S. et al. Silver nanoparticles-induced cytotoxicity requires ERK activation in human bladder carcinoma cells. **Toxicology Letters**, v. 237, n. 3, p. 237-243, 2015.

CHAI, Y. et al. Effects of Hydrogen Bond Interaction on the Miscibility of Poly (D, L-lactide) Composites Materials. **International Workshop on Materials, Chemistry and Engineering**, p. 416-424, 2018.

CHATTERJEE, S. et al. Extraction of a cardanol based liquid bio-fuel from waste natural resource and decarboxylation using a silver-based catalyst. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 560-564, 2017.

CHOURASIYA, V. et al. Formulation, optimization, characterization and in-vitro drug release kinetics of atenolol loaded PLGA nanoparticles using 33 factorial design for oral delivery. **Materials Discovery**, v. 5, p. 1-13, 2016.

CHUN, Y. W. et al. The role of polymer nanosurface roughness and submicron pores in improving bladder urothelial cell density and inhibiting calcium oxalate stone formation. **Nanotechnology**, v. 20, n. 8, p. 085104, 2009.

CHRASIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 15, p. 3016-3021, 1982.

COJOCARU, Victor et al. Formulation and Evaluation of *in vitro* Release Kinetics of Na<sub>3</sub>CaDTPA Decorporation Agent Embedded in Microemulsion-Based Gel Formulation for Topical Delivery. **Farmacia**, v. 63, n. 5, p. 656-664, 2015.



COSTA, K. P. et al. Chemical transformations in technical cashew nut shell liquid and isolated mixture of cardanols, evaluation of the antioxidant activity and thermal stability of the products for use in pure biodiesel. **Fuel**, v. 235, p. 1010-1018, 2019.

DINARVAND, R. et al. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 877, 2011.

ERBETTA, C. D. C. Alves, R. J. Resende, J. M. Freitas, R. F. S. Sousa, R. G. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, p. 208–225, 2012.

FALCÃO, M. A. et al. Supercritical fluid extraction of vinblastine from *Catharanthus roseus*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 129, p. 9-15, 2017.

FENG, J. et al. One-pot synthesis of cardanol-derived high-efficiency antioxidants based on intramolecular synergism. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 4, p. 3399-3408, 2017.

FERRARI, M.; Cirisano, F.; Morán, M. C. Mammalian cell behavior on hydrophobic substrates: influence of surface properties. **Colloids and Interfaces**, v. 3, n. 2, p. 48, 2019.

FONNER, J. M.; Forciniti, L.; Nguyen, H.; Byrne, J. D.; KouL, Y.; Nawaz, J. S.; Biocompatibility implications of polypyrrole synthesis techniques. **Biomedical Materials**, v. 3, p. 1 – 12, 2008.

FREDENBERG, S. et al. The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review. **International journal of pharmaceuticals**, v. 415, n. 1-2, p. 34-52, 2011.

GEDAM, P. H.; Sampathkumaran, P. S. Cashew nut shell liquid: extraction, chemistry and applications. **Progress in Organic Coatings**, v. 14, n. 2, p. 115-157, 1986.

GIBALDI, M.; Feldman, S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 10, p. 1238-1242, 1967.

GONÇALVES, R. V. et al. Pristine cardanol as biobased dopant for polyaniline. **Materials Letters**, v. 185, p. 327-330, 2016.

GRECO, A.; Ferrari, F.; Maffezzoli, A. UV and thermal stability of soft PVC plasticized with cardanol derivatives. **Journal of Cleaner Production**, v. 164, p. 757-764, 2017.

HAMEDANI, Y. et al. Novel Honokiol-eluting PLGA-based scaffold effectively restricts the growth of renal cancer cells. **Plos One**, v. 15, n. 12, p. e0243837, 2020.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

HUANG, C. L. et al. The influence of additives in modulating drug delivery and degradation of PLGA thin films. **NPG Asia Materials**, v. 5, n. 7, p. e54-e54, 2013.

HUANG, C.; Thomas, N. L. Fabricating porous poly (lactic acid) fibres via electrospinning. **European Polymer Journal**, v. 99, p. 464-476, 2018.

HUANG, X.; Brazel, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 121-136, 2001.

JAMNONGKAN, T.; Kaewpirom, S. Controlled-Release Fertilizer Based on Chitosan Hydrogel: Phosphorus Release Kinetics. **Science Journal Ubu**, v. 1, n. 1, p. 43-50, 2010.

JOHN, G.; Vemula, P. K. Design and development of soft nanomaterials from biobased amphiphiles. **Soft Matter**, v. 2, n. 11, p. 909-914, 2006.

JUSU, S. M. et al. Drug-encapsulated blend of PLGA-PEG microspheres: In vitro and in vivo study of the effects of localized/targeted drug delivery on the treatment of triple-negative breast cancer. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-23, 2020.

KANEHASHI, S. et al. Development of a cashew nut shell liquid (CNSL)-based polymer for antibacterial activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 45, 2015.

KANEHASHI, S. et al. Preparation and characterization of cardanol-based epoxy resin for coating at room temperature curing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 4, p. 2468-2478, 2013.

KHAN, S. et al. Development of bio-derived nanostructured coordination polymers based on cardanol–formaldehyde polyurethanes with “d 5” Mn (II) and “d 10” Zn (II) metal nodes: synthesis, characterization and adsorption behavior. **RSC Advances**, v. 6, n. 55, p. 50070-50082, 2016.

KHAN, S. et al. Utilization of renewable waste material for the sustainable development of thermally stable and biologically active aliphatic amine modified Cardanol (phenolic lipid)-Formaldehyde free standing films. **Journal of Cleaner Production**, v. 196, p. 1644-1656, 2018.

KNOPP, M. M. et al. Recent advances and potential applications of modulated differential scanning calorimetry (mDSC) in drug development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 164-173, 2016.

KUBO, I. et al. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 1016-1019, 1993.

KUMAR, P. P. et al. Process for isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4705-4708, 2002.

KUMAR, S. et al. Cashew nut shell liquid as a fuel for compression ignition engines: a comprehensive review. **Energy & Fuels**, v. 32, n. 7, p. 7237-7244, 2018.

LADMIRAL, V. et al. Aromatic biobased polymer latex from cardanol. **European Polymer Journal**, v. 93, p. 785-794, 2017.

LAGARIAS, J. C. et al. Convergence properties of the Nelder--Mead simplex method in low dimensions. **SIAM Journal on optimization**, v. 9, n. 1, p. 112-147, 1998.

LALITHA, K. et al. Stimuli responsive hydrogels derived from a renewable resource: synthesis, self-assembly in water and application in drug delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 27, p. 5560-5568, 2015.

LIU, H.; Wang, S.; Qi, N. Controllable Structure, Properties, and Degradation of the Electrospun PLGA / PLA-Blended Nanofibrous Scaffolds. **Polymer Science**, v. 125, p. E468 – E476, 2012.

LOCHAB, B.; Shukla, S.; Varma, I. K. Naturally occurring phenolic sources: monomers and polymers. **RSC Advances**, v. 4, n. 42, p. 21712-21752, 2014.

LOMONACO, D. et al. Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. **Green Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 31-33, 2009.

LOUREIRO, Tatiana et al. Cardanol polymerization under acid conditions by addition and condensation reactions. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 2, p. 555-566, 2018.

LU, L.; Peter, S.J.; Lyman, M. D.; Lai, H.; Leite, S. M.; Tamada, J. A.; Uyama, S.; Vacanti, J. P.; Langer, R.; Mikos, A. G. *In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly (D,L -lactic-co-glycolic acid) foams. **Biomaterials**, v. 21, p. 1837–1845, 2000.

MAKADIA, H. K.; Siegel, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.

MANOOCHEHRI, S. et al. Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2013.

MASSARO, M. et al. Pharmaceutical properties of supramolecular assembly of co-loaded cardanol/triazole-halloysite systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 476-485, 2015.

MAZZETTO, S. E.; Lomonaco, D.; Mele, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, p. 732-741, 2009.

MELE, G. et al. Influence of cardanol oil on the properties of poly (lactic acid) films produced by melt extrusion. **ACS Omega**, v. 4, n. 1, p. 718-726, 2019.

MELO, M. M. R.; Silvestre, A. J. D.; Silva, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115-176, 2014.

MENZIES, K. L.; Jones, L. The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. **Optometry and Vision Science**, v. 87, n. 6, p. 387-399, 2010.

MIKOS, A. G.; Temenoff, J. S. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 23-24, 2000.

MILOSEVIC, M. et al. Preparation and modeling of three-layered PCL/PLGA/PCL fibrous scaffolds for prolonged drug release. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

MORAIS, S. M. et al. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 31, 2017.

MOREIRA, M. M. et al. Synthesis and characterization of a new methacrylate monomer derived from the cashew nut shell liquid (CNSL) and its effect on dentinal tubular occlusion. **Dental Materials**, v. 34, n. 8, p. 1144-1153, 2018.

NAHUIS, L. E. C. et al. Preparation and characterization of polymeric microfibers of PLGA and PLGA/PPy composite fabricated by solution blow spinning. In: **Macromolecular Symposia**. 2019. p. 1800030.

NATARAJAN, M.; Murugavel, S. C. Synthesis, spectral and thermal degradation kinetics of novolac resins derived from cardanol. **High Performance Polymers**, v. 25, n. 6, p. 685-696, 2013.

NETO, L. et al. Characterization of cytotoxic activity of compounds derived from anacardic acid, cardanol and cardol in oral squamous cell carcinoma. In: **BMC Proceedings**. BioMed Central, 2014. p. 1-2.

NEWMAN, M. C.; Unger, M. A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. Lewis Publishers, New York, 2003. p. 433.

NICOLETTI, N. F. et al. Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. **Toxicon**, v. 129, p. 58-67, 2017.

NISHIMURA, Shinnosuke; MURAKAMI, Yoshihiko. Facile preparation of porous polymeric sheets with different sizes of pores on both sides using spontaneous emulsification. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 614, p. 126149, 2021.

NIST. Mass Spectral Search Program. Version 2.0. **National Institute of Standards and Technology**. Gaithersburg, 2005.

OBAYEMI, J. D. et al. Degradable porous drug-loaded polymer scaffolds for localized cancer drug delivery and breast cell/tissue growth. **Materials Science and Engineering: C**, v. 112, p. 110794, 2020.

OLA, A. R. B. et al. Molecular identification and anticancer activity of alkylphenol from cashew nut shell oil (*Anacardium occidentale*) grown In Timor Island. **Indonesian Journal of Pharmacy**, p. 137-144, 2008.

OLEJNIK, A. et al. Physico-chemical characterization of formulations containing endomorphin-2 derivatives. **Amino Acids**, v. 49, n. 10, p. 1719-1731, 2017.

OLIVEIRA, D. A. et al. Encapsulation of passion fruit seed oil by means of supercritical antisolvent process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 129, p. 96-105, 2017.

OLIVEIRA, M. S. C. et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, v. 117, n. 3, p. 165-170, 2011.

OZDIL, D.; Aydin, H. M. Polymers for medical and tissue engineering applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 12, p. 1793-1810, 2014.

PAARAKH, M. P. et al. Release Kinetics—Concepts and Applications. **International Journal of Pharmacy Research & Technology**, v. 8, n. 1, p. 12-20, 2018.

PARAMASHIVAPPA, R. et al. Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2548-2551, 2001.

PATEL, R. N.; Bandyopadhyay, S.; Ganesh, A. Economic appraisal of supercritical fluid extraction of refined cashew nut shell liquid. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, n. 1-2, p. 130-138, 2006.

PATEL, R. N.; Bandyopadhyay, S.; Ganesh, A. Extraction of cardanol and phenol from bio-oils obtained through vacuum pyrolysis of biomass using supercritical fluid extraction. **Energy**, v. 36, n. 3, p. 1535-1542, 2011.

PATEL, R. N.; Bandyopadhyay, S.; Ganesh, A. Extraction of cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell liquid using supercritical carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 847-853, 2006.

PATHAK, S. K.; Rao, B. S. Structural effect of phenalkamines on adhesive viscoelastic and thermal properties of epoxy networks. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 5, p. 4741-4748, 2006.

PAULA, A. A. N. et al. New potential AChE inhibitor candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 3754-3759, 2009.

PENG, D-Y; Robinson, D. B. A new two-constant equation of state. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals**, v. 15, n. 1, p. 59-64, 1976.

PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110-111, 1985.

PEREIRA, E. D. et al. Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. **Polímeros**, v. 26, p. 137-143, 2016.

PEREIRA, M. A. V. et al. Compatibility study between chitosan and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 116, n. 2, p. 1091-1100, 2014.

PIMENTEL, M. F. al. Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 3, p. 363-368, 2009.

PHILIP, J. Y. N. et al. Isolation of anacardic acid from natural cashew nut shell liquid (CNSL) using supercritical carbon dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9350-9354, 2008.

PONNUSAMY, T. et al. In vitro degradation and release characteristics of spin coated thin films of PLGA with a "breath figure" morphology. **Biomatter**, v. 2, n. 2, p. 77-86, 2012.

PREUKSARATTANAWUT et al. Highly ordered porous PLA films prepared by breath figure method. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v. 29, n. 4, 2019.



PUCHOT, L. et al. Breaking the symmetry of dibenzoxazines: a paradigm to tailor the design of bio-based thermosets. **Green Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 3346-3353, 2016.

RAHMAWATI, P. et al. Synthesis of cardanol-based novolac resin from cashew nut shell liquid. **Journal Engineering Science**, v. 15, p. 23-33, 2019.

REBOLLEDA, S. et al. Extraction of alkylresorcinols from wheat bran with supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 814-821, 2013.

REID, R. C.; Prausnitz, J. M.; Poling, B. E. The properties of gases and liquids. 1987.

REVERCHON, E. Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil. **AIChE Journal**, v. 42, n. 6, p. 1765-1771, 1996.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, n. 1, p. 1-37, 1997.

REVERCHON, E.; Donsi, G.; Osseo, L. S. Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, n. 11, p. 2721-2726, 1993.

REVERCHON, E.; Kaziunas, A.; Marrone, C. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hiprose seed oil: experiments and mathematical modelling. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 12, p. 2195-2201, 2000.

RITGER, P.L., Peppas, N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 23-36, 1987.

ROJAS, A. et al. Foaming with scCO<sub>2</sub> and Impregnation with Cinnamaldehyde of PLA Nanocomposites for Food Packaging. **Processes**, v. 10, n. 2, p. 376, 2022.

SAHOO, S. et al. Development and Evaluation of Gastroretentive Controlled Release Polymeric Suspensions Containing Ciprofloxacin and Carbopol Polymers. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 2268-2284, 2012.

SAHOO, S. K.; Panda, A. K.; Labhasetwar, V. Characterization of porous PLGA/PLA microparticles as a scaffold for three dimensional growth of breast cancer cells. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1132-1139, 2005.

SALDAÑA, M. D. A. et al. Determination of vapor pressure and solubility correlation of phenolic compounds in supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, n. 1, p. 7-19, 2007.

SETIANTO, W. B. et al. Pressure profile separation of phenolic liquid compounds from cashew (*Anacardium occidentale*) shell with supercritical carbon dioxide and aspects of its phase equilibria. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, n. 3, p. 203-210, 2009.

SEVOSTYANOV, M. A. et al. Biodegradable stent coatings on the basis of PLGA polymers of different molecular mass, sustaining a steady release of the thrombolytic enzyme streptokinase. **Reactive and Functional Polymers**, v. 150, p. 104550, 2020.

SHACKELFORD, C. D.; Moore, S. M. Fickian diffusion of radionuclides for engineered containment barriers: Diffusion coefficients, porosities, and complicating issues. **Engineering Geology**, v. 152, n. 1, p. 133-147, 2013.

SILVA, R. S. **Incorporação de modelos termodinâmicos na modelagem matemática de processos de extração supercrítica**. Porto Alegre. 2013. 86p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

SINGH, A. et al. Composite polymeric magnetic nanoparticles for co-delivery of hydrophobic and hydrophilic anticancer drugs and MRI imaging for cancer therapy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, n. 3, p. 842-856, 2011

SHARMA, P. et al. Valorization of cashew nut processing residues for industrial applications. **Industrial Crops and Products**, v. 152, p. 112550, 2020.

SHEN, X. et al. PLGA-based drug delivery systems for remotely triggered cancer therapeutic and diagnostic applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 381, 2020.

SHOBHA, S. V.; Ravindranath, B. Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of the phenolic lipids of cashew nut (*Anacardium occidentale*) shells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 2214-2217, 1991.

SHUKLA, S. et al. Cardanol benzoxazines—interplay of oxazine functionality (mono to tetra) and properties. **RSC Advances**, v. 5, n. 95, p. 78071-78080, 2015.

SIEPMANN, J.; Peppas, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.

SIEPMANN, J.; Siepmann, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 328-343, 2008.

SMITH JR, R. L. et al. Separation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid with supercritical carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 1, p. 1-7, 2003.

SOVOVÁ, H. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 15, p. 2499-2505, 1994.

SOVOVÁ, H. 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.

SRIVASTAVA, R.; Srivastava, D. Mechanical, chemical, and curing characteristics of cardanol–furfural-based novolac resin for application in green coatings. **Journal of**

**Coatings Technology and Research**, v. 12, n. 2, p. 303-311, 2015.

STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012.

SU, C-S; Chen, Y-M.; Chen, Y-P. Correlation of solid solubilities for phenolic compounds and steroids in supercritical carbon dioxide using the solution model. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 4, p. 608-615, 2011.

SU, W-C. et al. Mitochondria-associated apoptosis in human melanoma cells induced by cardanol monoene from cashew nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 28, p. 5620-5631, 2017.

THEVENOT, P.; Hu, W.; Tang, L. Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 270-280, 2008.

TYMAN, J. H. P. et al. The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the cashew nut (*Anacardium occidentale*). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 66, n. 4, p. 553-557, 1989.

TYMAN, J. H. P.; Tychopoulos, V.; Colenutt, B. A. Long-chain phenols: XXI. quantitative analysis of the phenolic lipids in technical cashew nut-shell liquid, from *anacardium occidentale*, by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 213, n. 2, p. 287-300, 1981.

VARGAS, R. M. F. et al. Supercritical extraction of carqueja essential oil: experiments and modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 375-382, 2006.

VATANKHAH, E. et al. Surfactant-assisted incorporation of rosmarinic acid into electrosprayed poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles with potential for cosmetic and pharmaceutical applications. **Polymer Testing**, v. 81, p. 106180, 2020.

VOIRIN, C. et al. Functionalization of cardanol: towards biobased polymers and additives. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 9, p. 3142-3162, 2014.

WANG, X.; Kalali, E. N.; Wang, D. Y. Renewable cardanol-based surfactant modified layered double hydroxide as a flame retardant for epoxy resin. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 12, p. 3281-3290, 2015.

WAZARKAR, K.; Kathalewar, M.; Sabnis, A. High performance polyurea coatings based on cardanol. **Progress in Organic Coatings**, v. 106, p. 96-110, 2017.

WILCZAK, A.; Keinath, T. M. Kinetics of sorption and desorption of copper (II) and lead (II) on activated carbon. **Water Environment Research**, v. 65, n. 3, p. 238-244, 1993.

WILLIAMS, D. F. Leading Opinion On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, p. 1–13, 2008.

XIE, J.; Tan, J. C.; Wang, C-H. Biodegradable films developed by electrospray deposition for sustained drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 3109-3122, 2008.

YULIANA, M. et al. Separation and purification of cardol, cardanol and anacardic acid from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut-shell liquid using a simple two-step column chromatography. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 5, p. 2187-2193, 2014.

YULIANA, M.; Tran-Thi, N. Y.; Ju, Y-H. Effect of extraction methods on characteristic and composition of Indonesian cashew nut shell liquid. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 230-236, 2012.

ZAFAR, F. et al. Application of FTIR-ATR spectroscopy to confirm the microwave assisted synthesis and curing of Cashew nut shell liquid derived nanostructured materials. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 228, p. 117732, 2020.

ZAFAR, F. et al. Nanostructured coordination complexes/polymers derived from cardanol: “one-pot, two-step” solventless synthesis and characterization. **RSC Advances**, v. 6, n. 8, p. 6607-6622, 2016.

ZHAO, W. et al. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 1181-1194, 2016.

ZURIARRAIN, A. et al. Quantitative determination of ethanol in cider by  $^1\text{H}$  NMR spectrometry. **Food Control**, v. 50, p. 758-762, 2015.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)