



ISABEL CRISTINA DO NASCIMENTO DEBIEN

ESTUDO DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES: OBTENÇÃO DE BETA-ECDISONA DO GINSENG BRASILEIRO (*Pfaffia glomerata*) E EQUILÍBRIO DE FASES DE SISTEMAS CONTENDO L-ÁCIDO LÁCTICO, CO₂, PROPANO E ETANOL

Campinas - SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ISABEL CRISTINA DO NASCIMENTO DEBIEN

ESTUDO DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES: OBTENÇÃO DE BETA-ECDISONA DO GINSENG BRASILEIRO (*Pfaffia glomerata*) E EQUILÍBRIO DE FASES DE SISTEMAS CONTENDO L-ÁCIDO LÁCTICO, CO₂, PROPANO E ETANOL

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Isabel Cristina do Nascimento Debien e orientada pela Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles.

Assinatura do Orientador

Campinas - SP

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

D351e Debien, Isabel Cristina do Nascimento, 1983-
Estudo de processos de extração e equilíbrio de fases a altas pressões :
obtenção de beta-ecdisona do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) e equilíbrio
de fases de sistemas contendo L-ácido láctico, CO₂, propano e etanol / Isabel
Cristina do Nascimento Debien. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). 2. Compostos bioativos. 3. Equilíbrio
de fases. I. Meireles, Maria Angela de Almeida. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Process study of extraction and phase equilibrium data at high
pressures : obtaining of beta-ecdysone from Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) and phase
equilibrium data of systems containing L-lactic acid, CO₂, propane and ethanol

Palavras-chave em inglês:

Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*)

Bioactive compounds

Phase equilibrium

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Doutora em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Maria Angela de Almeida Meireles [Orientador]

Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz

Losiane Crisitna Paviani Diehl

Mariana Conceição da Costa

Irede Angela Lucini Dalmolin

Data de defesa: 29-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida por **Isabel Cristina do Nascimento Debien** aprovado pela Comissão Julgadora em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
DEA/FEA/UNICAMP
Orientadora

Profa. Dra. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
EQA/UFSC
Membro titular

Dra. Losiane Cristina Paviani Diehl
Membro titular

Profa. Dra. Mariana Conceição da Costa
FCA/UNICAMP
Membro titular

Dra. Irede Angela Lucini Dalmolin
DDPP/FEQ/UNICAMP
Membro titular

Profa. Dra. Cíntia Bernardo Gonçalves
FZEA/USP
Membro suplente

Profa. Dra. Marise Aparecida Rodrigues Pollonio
DTA/FEA/UNICAMP
Membro suplente

Prof. Dr. Julian Martínez
DEA/FEA/UNICAMP
Membro suplente

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: Isabel Cristina do Nascimento Debien.

TÍTULO: Estudo de processos de extração e equilíbrio de fases a altas pressões: Obtenção de beta-ecdisona do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) e equilíbrio de fases de sistemas contendo L-ácido láctico, CO₂, propano e etanol.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles.

RESUMO

O presente projeto de doutorado foi desenvolvido em duas etapas: (1) Estudo da extração com fluido supercrítico e com líquido pressurizado dos ecdisteróides do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) e (2) Estudo do equilíbrio de fases de sistemas complexos.

Etapa 1:

Espécies do gênero *Pfaffia* são popularmente conhecidas como substituto do gênero *Panax* devido a sua morfologia e propriedades bioativas semelhantes. Dentre as espécies do gênero *Pfaffia*, a *Pfaffia glomerata*, popularmente conhecida como Ginseng brasileiro, se destaca devido à presença de ecdisteróides. Comercialmente, esse composto é obtido através de métodos convencionais de extração sólido-líquido, onde uma grande quantidade de solvente é utilizada. Atualmente, há um crescente interesse por métodos de extração que agridam menos o meio ambiente, como é o caso da extração com fluido supercrítico (SFE) e com líquido pressurizado (PLE) que possibilitam a extração de compostos bioativos utilizando altas temperaturas e pressões com menor consumo de solvente. Nessa etapa do trabalho os objetivos foram: (a) realizar um estudo preliminar da extração com fluido supercrítico da beta-ecdisona das raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). Foram avaliados os efeitos da pressão (20 e 30 MPa) e quantidade de cossolvente utilizada (15, 75 e 90 % de etanol) no comportamento da curva global de extração (OEC) e no teor de beta-ecdisona no extrato. Usando dióxido de carbono (CO₂): etanol (EtOH) (85:15, v/v) como solvente a 20 MPa, maiores quantidade de beta-ecdisona foram obtidas em um menor tempo de processo. O aumento da proporção de etanol na mistura (cossolvente) resultou no aumento do rendimento da extração e do teor de beta-ecdisona em relação a quantidade de matéria-prima; (b) realizar um estudo da extração com líquido pressurizado da beta-

ecdisona das raízes de Ginseng brasileiro. Foram avaliados os efeitos da temperatura (333 – 393 K), pressão (8 – 30 MPa) e do solvente (EtOH e EtOH : H₂O (80:20 v/v)) no rendimento global, atividade antioxidante e teor de beta-ecdisona dos extratos. O aumento da temperatura ocasionou o aumento do rendimento global, chegando a 25 % (base seca). Assim, pode-se concluir que aumentando a temperatura a seletividade do solvente diminui, uma vez que ocorre a coextração de outros compostos além dos ecdisteróides. Extratos com maior atividade antioxidante foram obtidos quando o solvente de extração é a mistura EtOH: H₂O (80:20, v/v). Quando o EtOH puro foi usado como solvente uma maior recuperação de beta-ecdisona foi obtida. Cerca de 5 % de beta-ecdisona nos extratos foi obtida usando etanol a 393 K, enquanto a pressão não afetou significativamente. Assim a melhor condição de extração em termos do teor de beta-ecdisona (393 K, 8 MPa e etanol como solvente) foi selecionada para a realização do estudo cinético. Na OEC foi possível observar que na primeira hora de extração aproximadamente 70 % do total do rendimento e 74 % do total de massa de beta-ecdisona foi obtido. O custo de manufatura foi avaliado na condição da cinética, onde foram obtidos maiores teores de beta-ecdisona quanto maior a capacidade do extrator. Os custos de manufatura, tanto em relação a quantidade de extrato quanto em relação a quantidade de beta-ecdisona recuperada no processo de PLE, foram 14 e 8 vezes maiores do que os obtidos no processo de SFE, respectivamente.

Etapa 2:

Polímeros biodegradáveis tem recebido maior atenção devido ao seu potencial para aplicações na área médica e na indústria de alimentos, dentre eles o poli (L-lactídeo) (PLA) principalmente por causa da sua biocompatibilidade e características sustentáveis. Ao longo dos últimos anos, a síntese de tais biopolímeros pela reação de polimerização utilizando a técnica de abertura do anel aromático catalisada enzimaticamente em fluidos comprimidos tem se mostrado bastante promissora. O objetivo nessa etapa do trabalho foi medir os dados de equilíbrio de fases dos sistemas L-ácido láctico + (propano + etanol) e L-ácido láctico + (CO₂ + etanol). Os experimentos foram realizados numa célula de equilíbrio de fases com visualização utilizando o método estático sintético, em temperaturas de 323,15 a 353,15 K e pressões até 25 MPa, mantendo constante a fração mássica de etanol:CO₂ (ou propano) de 1:9. Para o sistema L-ácido láctico + (propano + etanol) foram observadas as transições

líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-líquido-vapor, enquanto que para o sistema L-ácido láctico + (CO₂ + etanol) foram observadas somente as transições líquido-líquido. Os resultados mostraram que o sistema L-ácido láctico + (propano + etanol) apresenta transições do tipo UCST (Upper Critical Solution Temperature) e um UCEP (Upper Critical End Point), enquanto o sistema L-ácido láctico + (CO₂ + etanol) apresenta um comportamento do tipo LCST (Lower Critical Solution Temperature). Foi realizada a modelagem termodinâmica dos dados experimentais obtidos utilizando a equação de estado de Peng-Robinson com regra de mistura quadrática de van der Waals (PR-vdW2) e com regra de mistura de Wong-Sandler (PR-WS). Os resultados mostraram que os modelos PR-vdW2 e PR-WS foram capazes de representar satisfatoriamente o comportamento de fases do sistema L-ácido láctico + (dióxido de carbono + etanol). Entretanto, para o sistema L-ácido láctico + (propano + etanol), o modelo PR-vdW2 não foi capaz de descrever apropriadamente o seu comportamento.

Palavras-chave: *Pfaffia glomerata*, extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado, compostos bioativos, custo de manufatura, equilíbrio de fases, L-ácido láctico, propano, etanol, dióxido de carbono.

DOCTORAL THESIS

AUTHOR: Isabel Cristina do Nascimento Debien

TITLE: Process study of extraction and phase equilibrium data at high pressures: Obtaining of beta-ecdysone from Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) and phase equilibrium data of systems containing L-lactic acid, CO₂, propane and ethanol.

ADVISOR: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

ABSTRACT

The doctoral project is being developed in two steps: (1) Supercritical fluid and pressurized liquid extraction study of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) ecdysteroids and (2) Phase equilibrium data of complex systems.

Step 1:

Species of the genus *Pfaffia* are popularly known as substitute for *Panax* due their similar morphology and bioactive properties. Among them, *Pfaffia glomerata* has received special attention due the presence of ecdysteroids. Commercially, this compound is obtained by conventional solid-liquid extraction methods, that is, using large quantities of solvents. Nowadays, more environmentally friend methods are preferred, like supercritical fluid (SFE) and pressurized liquid extraction (PLE) that enables extraction of bioactive compounds under high temperatures and pressures. The aim of this step of work is: (a) preliminary study the supercritical fluid extraction of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) ecdysteroids. The effects of pressure (20 and 30 MPa) and cosolvent amount (10, 15, 75 and 90 % of Ethanol) on the behavior of overall extraction curve (OEC) and content of beta-ecdysone were studied. The larger amounts of beta-ecdysone were obtained in shorter processing time using CO₂: EtOH (85:15, v/v) as extracting solvent at 20 MPa. The higher proportion of EtOH in the mixture leads an increase an extraction yield and an increase a beta-ecdysone content relative a raw material amount. (b) study the pressurized liquid extraction of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) ecdysteroids. The effects of temperature (333 – 393 K), pressure (8 – 30 MPa) and solvent [ethanol and ethanol:water (80:20 v/v)] on the global yield extraction, antioxidant activity and beta-ecdysone content of the extracts from Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) roots were studied. The extraction global yield

increased with the increase in temperature (333 – 393 K) reaching up to 25 % (dry basis). As the temperature increased the selectivity of the extracting solvent decreased promoting the co-extraction of other compounds besides the ecdysteroids. The use of EtOH:H₂O (80:20 v/v) as extracting solvent produced extracts with the highest antioxidant activity. The recovery of beta-ecdysone was maximized when EtOH was used, besides fractions containing up to 5 % of beta-ecdysone were obtained using this solvent at 393 K, while pressure did not affect it. Thus the better extraction condition in terms of beta-ecdysone was selected (393 K, 8 MPa and ethanol as extracting solvent) and the kinetic extraction study was realized. From the overall extraction curve obtained it was possible to verify that in the first hour of extraction approximately 70 % of the total yield and 74 % of the total beta-ecdysone mass are obtained. The cost of manufacturing (COM) was evaluated in the kinetic condition in which was obtained the highest beta-ecdysone content; the increase of the extractor capacity significantly decreased the COM. The COMs for the crude extract and beta-ecdysone obtained by this novel process were 14-fold and 8-fold lower than that for the SFE process, respectively.

Step 2:

Biodegradable polymers has received increased attention due to their potential applications in medicine and food industry, with highlights to poly (L-lactic acid) (PLA) mainly because of its biocompatibility and resorbable features. Over the last years, synthesis of such biopolymer by enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of L-lactic acid in compressed fluids has been considered a promising route over. The aim of this step of work is to report phase equilibrium data (cloud points) of L-lactic acid + (propane + ethanol) and L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol). Phase equilibrium experiments were conducted in a variable-volume view cell employing the static synthetic method, from 323.15 K to 353.15 K and pressures up to 25 MPa, keeping constant the mass ratio of ethanol to CO₂ or propane at 1:9. For the (propane + ethanol) + L-lactic acid it was observed vapor-liquid, liquid-liquid and vapor-liquid-liquid, while for (carbon dioxide + ethanol) + L-lactic acid only liquid-liquid type transitions were recorded. Results show that the system (propane + ethanol) + L-lactic acid present UCST (Upper Critical Solution Temperature) transition type and an UCEP (Upper Critical End Point), whereas the system (carbon dioxide +

ethanol) + L-lactic acid exhibit LCST (Lower Critical Solution Temperature) behavior. The experimental data were modeled using the Peng-Robinson equation of state with the classical van der Waals quadratic mixing rule (PR-vdW2) and with the Wong-Sandler mixing rule (PR-WS). It is shown that the PR-vdW2 and PR-WS models were both able to satisfactorily represent the phase behavior of the system L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol). However, for the system L-lactic acid + (propane + ethanol), the PR-vdW2 model was not able to appropriately describe its phase behavior.

Keywords: *Pfaffia glomerata*, supercritical fluid extraction, pressurized liquid extraction, bioactive compounds, cost of manufacturing, phase equilibrium, L-lactic acid, propane, ethanol, carbon dioxide.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xxv
LISTA DE TABELAS	xxix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxxii
ESTRUTURA DA TESE	1
PARTE 1: Estudo da Extração de Bioativos do Ginseng Brasileiro.....	5
CAPÍTULO 1 – EXTRAÇÃO A ALTAS PRESSÕES	7
1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 GINSENG BRASILEIRO	8
1.1.1 Ecdisterona ou beta-ecdisona	12
1.1.2 Mercado.....	13
1.2 EXTRAÇÃO	15
1.2.1 Extração sólido-líquido	16
1.2.2 Solubilidade.....	27
1.2.3 Rendimento Global (X_0).....	29
1.2.4 Cinética de Extração	31
1.3 SIMULAÇÃO DE PROCESSOS.....	35
1.4 JUSTIFICATIVA.....	36
1.5 OBJETIVOS.....	38
1.5.1 Objetivo Geral	38
1.5.2 Objetivos Específicos	39
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 2 – SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF BETA-ECDYSONE FROM BRAZILIAN GINSENG (<i>Pfaffia glomerata</i>) ROOTS.....	49
Abstract.....	53
Keywords.....	53
1. Introduction	53
2. Materials and Methods.....	54

2.1 Raw material characterization and preparation	54
2.2 Experimental design	54
2.3 Extraction procedure.....	55
2.4 Beta-ecdysone quantification	56
3. Results and Discussion	56
4 Conclusion	58
Acknowledgements	58
References	58

CAPÍTULO 3 – PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION AS A PROMISING ECONOMICALLY FEASIBLE TECHNIQUE FOR THE RECOVERY OF BETA-ECDYSONE FROM BRAZILIAN GINSENG (*Pfaffia glomerata*) ROOTS..... 61

Abstract.....	63
Keywords.....	63
1 Introduction	65
2 Material and Methods	67
2.1 Raw material characterization and preparation	67
2.2 Experimental design	67
2.3 Extraction procedure.....	67
2.4 Antioxidante activity (AA).....	69
2.5 Beta-ecdysone quantification	70
2.6 PLE extraction kinetics.....	70
2.7 Process simulation: scale-up and economic evaluation.....	71
3 Results and Discussion	75
3.1 Global extraction yield (X_0)	75
3.2 Beta-ecdysone quantification	77
3.3 Antioxidant activity (AA).....	78
3.4 Extraction kinetic.....	79
3.5 Economic evaluation	81
3.5.1 Sensitivity analysis	81
3.5.2 COM as a fuction of the extraction time	82
4 Conclusion	86
Acknowledgements	87
References	88

PARTE 2: Estudo do Equilíbrio de Fases de Sistemas Complexos.....	93
CAPÍTULO 4 - EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES.....	95
1 INTRODUÇÃO.....	95
2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES.....	96
2.1 MÉTODO ESTÁTICO SINTÉTICO.....	97
3 COMPORTAMENTO DE FASES EM FLUIDOS PRESSURIZADOS.....	99
4 MODELAGEM TERMODINÂMICA DE EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES.....	104
5 JUSTIFICATIVA.....	107
6 OBJETIVOS.....	108
6.1 OBJETIVO GERAL.....	108
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	108
REFERÊNCIAS.....	109
CAPÍTULO 5 – HIGH-PRESSURE PHASE EQUILIBRIUM DATA FOR THE SYSTEMS L-LACTIC ACID + (PROPANE + ETHANOL) AND L-LACTIC ACID + (CARBON DIOXIDE + ETHANOL)	111
Abstract.....	115
Keywords.....	115
1 Introduction	115
2 Experimental.....	116
2.1 Materials	116
2.2 Phase equilibrium apparatus and procedure	116
3 Results and discussion.....	116
4 Conclusion.....	118
Acknowledgements	118
References	118
CAPÍTULO 6 - THERMODYNAMIC MODELLING OF HIGH-PRESSURE EQUILIBRIUM DATA FOR THE SYSTEMS L-LACTIC ACID + (PROPANE + ETHANOL) AND L-LACTIC ACID + (CARBON DIOXIDE + ETHANOL)	121
Abstract.....	123
Acknowledgements	135
List of Symbols.....	136
References	137

CONCLUSÕES GERAIS	139
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	143
APÊNDICE	145
APÊNDICE 1.....	153
APÊNDICE 2.....	185
MEMÓRIAS DO DOUTORADO	199

DEDICATÓRIA

Agradável surpresa em 03/4/2004!

Alice chegou.

Cativou a todos!

Derreteu meu coração!

Surpreende-me a cada momento!

Pra você, afilhada querida,

meu carinho, minha tese!

AGRADECIMENTOS

Agradecendo... sempre!

Obrigada Deus – Iluminação, entusiasmo para escrever de Vós vieram até mim!

Professora Dra. Maria Angela de Almeida Meireles, sua orientação, opiniões, críticas e cobrança não só nortearam meu trabalho como também contribuíram para meu crescimento pessoal, levando-me a concluir a tese com segurança e qualidade. Meus profundos agradecimentos!

Professores Dr. José Vladimir, Dr. Márcio Mazutti e Dr. Marcos Corazza, sem a intervenção de vocês minhas dificuldades seriam maiores. Obrigada!

Professores da banca, por sua disponibilidade e compreensão e principalmente por compartilharem seus conhecimentos comigo, sensibilizada agradeço muitíssimo a todos.

Ari (LASEFI/DEA/FEA), pelo bom humor, paciência e por ter sido tão prestativo nos momentos mais necessários, obrigada!

Professor Ms. Cláudio Zakrzewski por sempre salvar os equipamentos.

Frederico e Reinaldo (secretaria do DEA) por serem sempre solícitos e alegres nos momentos mais difíceis, meu muito obrigado!

Cosme e Marcos (secretaria de pós graduação) pela paciência: lidar com a minha ansiedade não é fácil, e vocês o fizeram com maestria! Obrigada, demais!

Agradeço à CAPES (programa PROCAD 247/2007) e ao CNPq pelo financiamento deste trabalho.

Amigos do LASEFI, por todo apoio durante o desenvolvimento do meu trabalho e pelos momentos de descontração.

Amigos da URI/Erechim, pelo chimarrão, pelas “jantas”, pelos vinhos enfim, por terem me recebido tão bem. Em especial à Rê, Carlinha e Caçula que além de me acolherem com todo amor e carinho, me presentearam com uma segunda família! Na minha trajetória pelo Sul vocês foram essenciais e continuarão sendo pro resto da vida!

Amigos de Campinas, que Graças a Deus são muitos, meu muito obrigado pelo companheirismo e compreensão durante os tortuosos caminhos que enfrentei durante o doutorado. Em especial à Lídia, pela amizade à primeira vista!

Amigos de BH, que mesmo de longe participaram da minha vida aqui em Campinas, sempre me apoiando e vibrando com as minhas conquistas.

Querida família “Born”, vocês são incríveis! Sempre presentes no meu pensamento!

Papai e Mamãe, aos seus elogios e crença nas minhas intenções, muito obrigada! Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Bia e Danilo, nossas diferenças nos unem! Muito obrigada por acreditarem em mim.

Cidade de Campinas, senti-me acolhida, aprendi um outro estilo de vida, obrigada!

“A questão não é o que você olha,
mas o que você vê.”

Henry Thoreau

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:
esquenta e esfria, aperta daí afrouxa, sossega e depois
desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

João Guimarães Rosa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das etapas do desenvolvimento do projeto.....	2
Figura 1.1. Ginseng brasileiro (<i>Pfaffia glomertata</i>): (a) partes aéreas (Foto tirada no Campo experimental do CPQBA em outubro de 2011) e (b) raízes.....	11
Figura 1.2. Estrutura química da beta-ecdisona..	13
Figura 1.3. Diagrama de fases P-T para uma substância pura, onde C é o ponto crítico e T é o ponto triplo (Cooper, 2000).....	20
Figura 1.4. (a) Demonstração gráfica da variação da densidade do CO ₂ puro. (b) Representação esquemática da variação a partir do equilíbrio gás-líquido ($T < T_c$) para fluido supercrítico ($T \geq T_c$), onde a substância é aquecida até sua temperatura crítica na pressão acima da P_c (Cooper, 2000).	21
Figura 1.5. Diagrama Pressão-Volume para o etanol, calculado pela equação de estado de Peng-Robinson (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).	25
Figura 1.6. Curva de extração típica de processo supercrítico apresentando os três períodos característicos: taxa de extração constante (CER), taxa de extração decrescente (FER) e período difusional (DC).....	31
Figura 2.1. Figure 1. Chemical structure of beta-ecdysone.....	54
Figura 2.2. Figure 2. Schematic diagram of the supercritical CO ₂ extraction unit (adapted of Veggi, 2013).....	55
Figura 2.3. Figure 3. Overall extraction curve of BGR extracts (\diamond) and beta-ecdysone (Δ) obtained with CO ₂ : EtOH (85:15, v/v) as extracting solvent at 30 MPa and 333 K. Dotted line denotes the calculated yield using a three straight lines spline.(CER: constant extraction rate period; FER: falling extraction rate period; DC: diffusional controlled rate period).....	56
Figura 2.4. Figure 4. Overall extraction curve of BGR extracts (\diamond) and beta-ecdysone (Δ) obtained with CO ₂ : EtOH (85:15, v/v) as extracting solvent at 20 MPa and 333 K. Dotted line denotes the calculated yield using a three straight lines spline.(CER: constant	

extraction rate period; FER: falling extraction rate period; DC: diffusional controlled rate period).....	56
Figura 2.5. Figure 5. Overall extraction curve of BGR extracts (\diamond) and beta-ecdysone (Δ) obtained with CO ₂ : EtOH (25:75, v/v) as extracting solvent at 20 MPa and 333 K. Dotted line denotes the calculated yield using a three straight lines spline.(CER: constant extraction rate period; FER: falling extraction rate period; DC: diffusional controlled rate period).....	57
Figura 2.6. Figure 6. Overall extraction curve of BGR extracts (\diamond) and beta-ecdysone (Δ) obtained with CO ₂ : EtOH (10:90, v/v) as extracting solvent at 20 MPa and 333 K. Dotted line denotes the calculated yield using a three straight lines spline.(CER: constant extraction rate period; FER: falling extraction rate period; DC: diffusional controlled rate period).....	57
Figura 3.1. Figure 1. Flow diagram of the PLE unit. TS: Tank of solvent; P1: High pressure pump; V-1 and V-2: block valve; V-3: micrometric valve; M-1 and M-2: manometers; EB: extraction bed; TB: thermostatic bath; GF: glass flask.	68
Figura 3.2. Figure 2. Flowchart of pressurized liquid extraction developed in SuperPro Designer [®]	72
Figura 3.3. Figure 3. Overall extraction curve for the system BGR + EtOH obtained at 8 MPa and 393 K; the experimental data was fitted to a spline of three straight lines.	81
Figura 3.4. Figure 4. COMs of crude extract estimated for PLE in extraction units containing 0.005 (\square), 0.05 (Δ) and 0.5 (\times) m ³ extractor vessels and extraction yield (\blacklozenge)....	83
Figura 4.1. Diagramas de fases para sistemas binários (Espinosa, 2001).	102
Figura 5.1. Fig. 1. Pressure-temperature diagram for the system (propane + ethanol) + L-lactic acid for overall mass fractions of (propane + ethanol) of 0.950 and 0.955.	116
Figura 5.2. Fig. 2. Pressure-temperature diagram for the system (propane + ethanol) + L-lactic acid for overall mass fractions of (propane + ethanol) of 0.960 and 0.990 (VLE-BP).	116

Figura 5.3. Fig. 3. Pressure-composition diagram for the system (propane + ethanol) + L-lactic acid.....	118
Figura 5.4. Fig. 4. Pressure-temperature diagram for the system (carbon dioxide + ethanol) + L-lactic acid (LLE).....	118
Figura 5.5. Fig. 5. Pressure-composition diagram for the system (carbon dioxide + ethanol) + L-lactic acid (LLE).....	118
Figura 6.1. Fig. 1. Pressure-temperature diagram of the system {Propane (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)} (VLE-BP) (▲: $w_3 = 0.0396$; ●: $w_3 = 0.0347$; ■: $w_3 = 0.0271$; ○: $w_3 = 0.0253$; Δ: $w_3 = 0.0199$; ◇: $w_3 = 0.0150$; □: $w_3 = 0.0100$). The continuous line denotes the calculated values from PR-vdW2, using the fitted interaction parameters.	132
Figura 6.2. Fig. 2. Pressure-temperature diagram of the system {CO ₂ (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)} (LLE) (◆: $w_3 = 0.0663$; ■: $w_3 = 0.0589$; ▲: $w_3 = 0.0485$; ●: $w_3 = 0.0396$; ◇: $w_3 = 0.0286$; ○: $w_3 = 0.0199$; Δ: $w_3 = 0.0105$). The continuous line denotes the calculated values from PR-vdW2, using the fitted interaction parameters.	133
Figura 6.3. Fig. 3. Pressure-temperature diagram of the system {Propane (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)} (LLE) (◇: $w_3 = 0.0501$; □: $w_3 = 0.0447$). The continuous line denotes the calculated values from PR-WS, using the fitted interaction parameters.	133
Figura 6.4. Fig. 4. Pressure-temperature diagram of the system {Propane (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)} (VLE-BP) (▲: $w_3 = 0.0396$; ●: $w_3 = 0.0347$; ■: $w_3 = 0.0271$; ○: $w_3 = 0.0253$; Δ: $w_3 = 0.0199$; ◇: $w_3 = 0.0150$; □: $w_3 = 0.0100$). The continuous line denotes the calculated values from PR-SW, using the fitted interaction parameters.	134
Figura 6.5. Fig. 5. Pressure-temperature diagram of the system {CO ₂ (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)} (LLE) (◆: $w_3 = 0.0663$; ■: $w_3 = 0.0589$; ▲: $w_3 = 0.0485$; ●: $w_3 = 0.0396$; ◇: $w_3 = 0.0286$; ○: $w_3 = 0.0199$; Δ: $w_3 = 0.0105$). The continuous line denotes the calculated values from PR-SW, using the fitted interaction parameters.	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Propriedades características de gases, líquidos e fluidos supercríticos (Brunner, 2005).....	22
Tabela 2.1. Table 1. Experimental extraction conditions.....	55
Tabela 2.2. Table 2. Comparison between extraction yield, S/F and beta-ecdysone content of each experimental condition at t_{CER}	57
Tabela 3.1. Table 1. Economic parameters used for COM estimation.....	74
Tabela 3.2. Table 2. Global yield (X_0), antioxidante activity (AA) and beta-ecdysone content for BGR extracts obtained by PLE.....	76
Tabela 3.3. Table 3. BGR extraction yields obtained using polar and unipolar solvents; PLE performed at 12 MPa and 333 K.....	78
Tabela 3.4. Table 4. Input and output of raw material and product needed for the production beta-ecdysone-rich extract from Brazilian ginseng roots (BRG) for different scales.....	84
Tabela 3.5. Table 5. Contribution of each component in COM of PLE at 0.05 m ³ extractor.	84
Tabela 3.6. Table 6. Comparison between of COM for crude extract, beta-ecdysone and the contribution of each components estimated for PLE (this work) and SFE (Leal <i>et al.</i> , 2010) processes using 0.4 m ³ extractors with the same extraction yield (70 %).	85
Tabela 5.1. Table 1. Phase equilibrium data for system (propane + ethanol) (1)/L-lactic acid (2).....	117
Tabela 5.2. Table 2. Phase equilibrium data for system (carbon dioxide + ethanol) (1)/L-lactic acid (2).	117
Tabela 6.1. Table 1. Characteristic parameters of the pure compounds.....	129
Tabela 6.2. Table 2. Fitted binary interaction parameters of the PR-vdW2 model used in this work.	130

Tabela 6.3. Table 3. Fitted binary interaction parameters of the PR-WS model used in this work..... 131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: atividade antioxidante

BGR: (*Brazilian ginseng roots*) raízes de Ginseng brasileiro

b.s.:base seca (ou d.b. = *dry basis*)

CER: (*constant extraction rate*) período de taxa constante de extração

COL: (cost of operation labor) custo de mão de obra

COM: (*cost of manufacturing*) custo de manufatura

CO₂: dióxido de carbono

CRM: (cost of raw materials) custo de matéria-prima

CUT: (cost of utilities) custo de utilidades

DC: (diffusion controlled) período controlado por difusão

EtOH: etanol

FCI: (*fixed capital of investment*) custo de investimento

FER: (*falling extraction rate*) período de taxa decrescente de extração

GRAS: (*generally recognized as safe*) comumente reconhecido como seguro

HPLC: (high performance liquid chromatography) cromatografia líquida de alta eficiência

LCST: *lower critical solution temperature*

LLE: transição de fase do tipo líquido-líquido

LPSE: (*low pressure solvent extraction*) extração com solventes orgânicos a baixa pressão

M_{CER}: taxa de transferência de massa no período CER

OEC: (*overall extraction curve*) curva global de extração

P: pressão

P_c: pressão crítica

PLE: (*pressurized liquid extraction*) extração com líquidos pressurizados

PR: equação de Peng-Robinson

R_{CER} : rendimento no período CER

SCF: (*supercritical fluid*) fluido supercrítico

S/F: razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima

SFE: (*supercritical fluid extraction*) extração com fluido supercrítico

T: temperatura

T_c : temperatura crítica

t_{CER} : duração do período CER

t_{FER} : duração do período FER

UCEP: *upper critical end point*

UCST: *upper critical solution temperature*

vdW2: regra de mistura quadrática de van der Waals

VLE-BP: transição de fase do tipo líquido-vapor ponto de bolha

VLLE: transição de fase do tipo líquido-líquido-vapor

WS: regra de mistura de Wong-Sandler

X_0 : rendimento global

Y_{CER} : razão mássica de soluto por solvente na saída do extrator no período CER

ESTRUTURA DA TESE

A presente tese está dividida em duas partes – **Parte 1: Estudo da Extração de Bioativos do Ginseng Brasileiro** e **Parte 2: Estudo do Equilíbrio de Fases de Sistemas Complexos**. Cada parte é composta por capítulos, nos quais são apresentados trabalhos e artigos científicos publicados e submetidos à publicação, de acordo com as etapas do desenvolvimento do projeto de pesquisa de doutorado mostrado na Figura 1.

O **Capítulo 1 – Extração a altas pressões** trata da fundamentação teórica sobre a matéria-prima utilizada nos processos de extração, o ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*); sobre o processo de extração sólido-líquido, mais especificamente os processos de extração supercrítica (SFE) e extração com líquidos pressurizados (PLE) e as etapas de desenvolvimento do processo, que são: otimização dos parâmetros operacionais e estudo da simulação do processo. Também são apresentados os objetivos, geral e específicos, do trabalho.

O **Capítulo 2 – Supercritical fluid extraction of beta-ecdysone from Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) roots** apresenta os resultados de um estudo cinético preliminar com o objetivo de avaliar o comportamento do processo de extração de beta-ecdisona das raízes do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) utilizando CO₂ supercrítico e etanol como cossolvente. Foram avaliados dois níveis de pressão (20 e 30 MPa) e diferentes proporções de cossolvente. Esse trabalho foi aceito para a publicação no periódico *Food and Public Health* 4(2) (2014) 67-73.

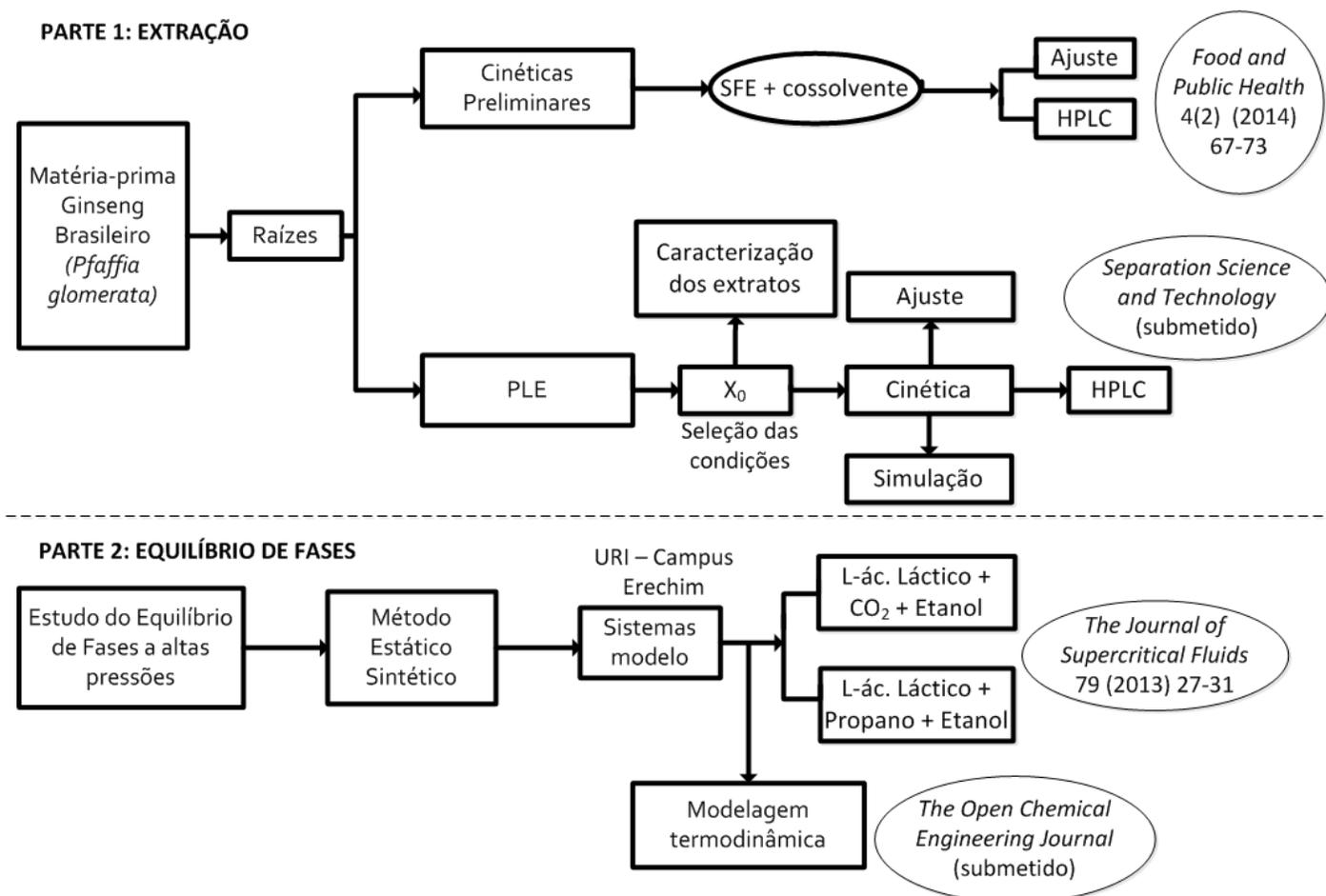


Figura1. Esquema das etapas do desenvolvimento do projeto.

Diante dos resultados obtidos no Capítulo 2, foi possível selecionar as condições experimentais (temperaturas, pressões e solventes) que foram utilizadas nos ensaios referentes ao estudo realizado no **Capítulo 3 – Pressurized Liquid extraction as a promising economically feasible technique for the recovery of beta-ecdysone from Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) roots**. Essa etapa teve como objetivo determinar experimentalmente as isotermas de rendimento global, caracterizar os extratos obtidos com relação à atividade antioxidante e teor de beta-ecdisona e selecionar a condição ótima de extração em termos de teor de beta-ecdisona no extrato. A partir dos resultados obtidos, realizar o estudo da cinética de extração, determinar os parâmetros operacionais otimizados

e estimar o custo de manufatura dos extratos. Esse trabalho foi submetido para ao periódico *Separation Science and Technology*.

No **Apêndice 1** é apresentada a descrição da unidade de extração utilizada na realização dos experimentos relativos aos Capítulos 2 e 3, bem como seu procedimento operacional e procedimento para o preparo do leito de extração. Também são apresentados os resultados experimentais dos Capítulos 2 e 3, procedimento de ajuste dos dados cinéticos a um spline com três retas e resultados da simulação do processo de PLE.

O **Capítulo 4 – Equilíbrio de fases a altas pressões** trata da fundamentação teórica sobre os métodos experimentais utilizados para a determinação do equilíbrio de fases a altas pressões, mais especificamente sobre o método estático sintético; sobre o comportamento de fases de fluidos pressurizados e sobre a modelagem termodinâmica dos dados de equilíbrio obtidos. Também são apresentados os objetivos, geral e específicos, do trabalho.

Foi realizado um estudo do equilíbrio de fases¹ a altas pressões dos sistemas complexos L-ácido láctico + (propano + etanol) e L-ácido láctico + (CO₂ + etanol). Os dados de equilíbrio de fases a altas pressões (**Capítulo 5 – High-pressure phase equilibrium data for the L-lactic acid + (propane + etanol) and L-lactic acid + (carbono dioxide + etanol) systems**) obtidos nessa etapa do projeto foram apresentados no *10th International Symposium on Supercritical Fluids – ISSF 2012* e publicados como trabalho completo nos Anais do Evento. Posteriormente, o artigo completo foi publicado no

¹ Esta etapa do trabalho foi realizada no âmbito do programa PROCAD 247/2007 envolvendo as IES: UNICAMP (Coordenação Geral), URI e UFSC. Os dados experimentais foram determinados no Departamento de Engenharia de Alimentos da URI sob a orientação dos professores Márcio Antonio Mazutti e Joé Vladimir de Oliveira.

The Journal of Supercritical Fluids 79 (2013) 27-31; número especial dedicado ao ISSF 2012.

Posteriormente foi realizada a modelagem termodinâmica dos dados de equilíbrio de fases a altas pressões usando a equação cúbica de estado de Peng-Robinson (PR) com regra de mistura quadrática de Van der Waals (vdW2) e com regra de mistura de Wong-Sandler (WS): **Capítulo 6 – Thermodynamic modeling of high-pressure equilibrium data for the L-lactic acid + (propane + etanol) and L-lactic acid + (carbono dioxide + etanol) systems**. Esse trabalho foi submetido para publicação no periódico *The Open Chemical Engeneering Journal*.

No **Apêndice 2** é apresentada a descrição do aparato experimental utilizado para a determinação dos dados de equilíbrio de fases a altas pressões apresentado no Capítulo 5, assim como o procedimento experimental.

**PARTE 1: Estudo da Extração de
Bioativos do Ginseng Brasileiro**

CAPÍTULO 1 – EXTRAÇÃO A ALTAS PRESSÕES

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são usadas como alternativa no tratamento de diversas doenças. Para que seus efeitos sejam elucidados, os extratos e óleos voláteis de várias plantas têm sido estudados a fim de avaliar as propriedades terapêuticas atribuídas pela medicina popular (Silva, 2008).

Uma espécie que tem sido usada por milhares de anos nos países asiáticos é o Ginseng, o qual pertence ao gênero *Panax*. Os princípios ativos mais importantes do Ginseng são as saponinas, compostas por diversos ginsenóides que exercem inúmeros efeitos sobre o sistema imunológico. No Brasil, as plantas do gênero *Pfaffia*, como *Pfaffia paniculata* e *Pfaffia glomerata* pertencentes à família *Amaranthaceae*, substituem as plantas do gênero *Panax*. Estas plantas são conhecidas popularmente como “Ginseng brasileiro” e são encontradas principalmente nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Paraná e Goiás (Kim *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2010).

O Ginseng brasileiro está entre os maiores volumes de venda da indústria nacional de fitoterápicos, apresenta uma série de efeitos sobre o sistema nervoso, mas é conhecido principalmente por ser estimulante do aprendizado e da memória (Qiao *et al.*, 2005). Comercialmente é acessível sob a forma de cápsulas contendo raízes em pó, misturadas ou não com extratos etanólicos desta planta obtidos por métodos convencionais – por exemplo, soxhlet (Matsuzaki *et al.*, 2003).

Assim, tendo em vista as propriedades biológicas do extrato do Ginseng brasileiro, este pode ser usado como ingrediente de alimentos funcionais. Neste contexto, a obtenção

desses extratos utilizando fluidos supercríticos e líquidos pressurizados como solventes é uma interessante alternativa para obtê-los com alta qualidade sem gerar resíduos tóxicos. Isso porque os processos de extração com fluidos supercríticos (SFE = *Supercritical Fluid Extraction*) e com líquidos pressurizados (PLE = *Pressurized Liquid Extraction*) têm se caracterizado nos últimos anos como tecnologias com diversas vantagens em relação aos métodos convencionais (soxhlet, etc.) de extração, especialmente por serem tecnologias limpas e seletivas, empregando menor tempo de processo.

Para países em desenvolvimento, como o Brasil, agregar valor à matéria-prima cultivada em território nacional processando-a com uma tecnologia ecologicamente correta representa a possibilidade de aumentar sua competitividade no mercado global de produtos naturais. O estudo de plantas nativas e adaptáveis ao cultivo brasileiro proporciona um conhecimento aplicável ao desenvolvimento auto-sustentável de comunidades locais, além da exploração da biodiversidade da flora nacional (Maireles, 2008). Assim como a situação geográfica, social e econômica do país podem refletir na abordagem da tecnologia. Por isso, a exploração da SFE e PLE considerando as necessidades de países em desenvolvimento, pode levar à obtenção de produtos de interesse para a população local (Prado, 2010).

1.1 GINSENG BRASILEIRO

Dentre as diversas espécies de plantas medicinais está o ginseng, o qual pertence ao gênero *Panax* e é usado há milhares de anos em países asiáticos como medicamento de cura e tônico (Wu et al., 2005). O *Panax ginseng* C. A. Meyer, (popularmente chamado de Ginseng asiático, chinês ou coerano) e o *Panax quinquefolius* L. (também conhecido como Ginseng americano) são as espécies de ginseng mais populares. Há ainda o *Panax*

notoginseng (Burk.) F. H. Chen, o *Panax japonicus* C.A. Meyer (Ginseng japonês) e o *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (Ginseng vietnamense). Todas as espécies pertencentes à família Araliaceae são semelhantes, cujos rizomas e raízes são utilizados em preparações na medicina popular (Rates e Gosmann, 2002; Qi, Wang e Yuan, 2011).

Tradicionalmente, são utilizadas as raízes do ginseng e encontram-se disponíveis na forma branca ou vermelha, na qual a primeira é obtida por secagem natural após a colheita e a outra é obtida por secagem a quente (Qi, Wang e Yuan, 2011). Entre seus diversos efeitos sobre o sistema nervoso, o ginseng é conhecido principalmente por ser um estimulante do aprendizado e da memória (Qiao *et al.*, 2005).

No Brasil, várias espécies do gênero *Pfaffia*, pertencentes à família *Amaranthaceae*, são utilizadas em substituição ao ginseng (*Panax* ssp, *Araliaceae*), utilizado pela medicina chinesa há mais de três mil anos como elixir da longa vida, devido à semelhança na morfologia das raízes destas espécies e aos efeitos adaptógenos atribuídos a elas, sendo conhecidas como “Ginseng brasileiro” e “fáfia”. Adaptógeno é o termo que define substâncias que aumentam a resistência inespecífica, permitindo ao organismo uma maior adaptação aos esforços físicos e mentais (Magalhães, 2000; Simoes, 2001; Neto *et al.*, 2005; Zimmer *et al.*, 2006).

Entre essas espécies de Ginseng brasileiro são citadas: *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, *Pfaffia iresinoides* Sprengel e *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze (Shiobara *et al.*, 1993). Dos países da América do Sul, o Brasil se destaca como o mais importante centro de cultivo de plantas do gênero *Pfaffia* (Freitas *et al.*, 2004), uma das plantas medicinais nativas brasileiras mais empregadas nos últimos anos. O uso do Ginseng brasileiro tornou-se uma panacéia, sendo popularmente denominada “para-tudo”, “suma” ou “corango” (Oliveira, 1986). Os produtos são, geralmente, rotulados como *P. paniculata* ou Ginseng-

brasileiro e as indicações fornecidas pelos fabricantes são: “revigorante, regenerador celular, indicado para esgotamento físico e mental e falta de memória” ou “indicado como auxiliar no tratamento de irregularidades circulatórias, estresse, anemia, diabetes...” ou “indicado nos caso de fadiga física, intelectual e de indisposição em geral; contribui no tratamento de fraqueza sexual” (Rates e Gosmann, 2002). Porém muitas dessas alegações necessitam de comprovação científica.

Em função da sua importância na medicina popular, grande parte dos estudos que envolvem o Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) (Figura 1.1) tem como objetivo elucidar os efeitos farmacológicos dos extratos dessa planta. Grupos de pesquisa em todo o mundo têm demonstrado que os extratos possuem potencial para o tratamento de inflamações crônicas (Neto *et al.*, 2005). Em relação ao sistema gastrointestinal de ratos protegem a mucosa gástrica, diminui o número de lesões, age no aumento do pH do duodeno e reduz as secreções gástricas (Freitas *et al.*, 2004). Possuem atividade anti-hiperglicemiante (Sanches *et al.*, 2001); atividade antinociceptiva (Freitas *et al.*, 2009), atividade antimicrobiana contra *Leishmania braziliensis* (Neto *et al.*, 2004); atividade antioxidante (Sousa *et al.*, 2005) e efeitos sobre melanogênese (Nakamura *et al.*, 2010).



(a)



(b)

Figura 1.1. Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*): (a) partes aéreas (Foto tirada no Campo experimental do CPQBA em outubro de 2011) e (b) raízes.

Existem vários estudos que descrevem os constituintes de diferentes espécies de *Pfaffia*. Os principais componentes da *P. paniculata* incluem stigmasterol, sitosterol e seus glicosídeos, alantoína, nortriterpenóides (como ácido pfáfico e suas saponinas chamadas pfaffosides A, B, C, D, E e F), triterpenóides e ecdisteróides. Shiobara *et al.* (1993) mostraram a presença de um triterpenóide (ácido glomérico) e um nortriterpenóide (ácido pfamérico) junto com ecdisterona (também chamada de beta-ecdisona), rubrosterona, ácido oleanóico e β -glucopiranosil oleanolato em *P. glomerata* (Freitas *et al.*, 2004).

Pfaffia glomerata é a espécie de Ginseng brasileiro de maior importância medicinal e comercial (Figueiredo, 2004; Vigo *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2006). Sua ação adaptógena é atribuída à presença dos fitoecdisteróides, em especial ao composto beta-ecdisona (Vigo, Narita e Marques, 2003; Figueiredo, 2004), que é utilizado como marcador químico da qualidade da matéria-prima (raízes) dessa espécie (Montanari, Magalhães e Queiroga, 1999; Magalhães, 2000; Zimmer *et al.*, 2006).

1.1.1 Ecdisterona ou beta-ecdisona

Os ecdisteróides, em particular a ecdisterona (ou beta-ecdisona) [(2 β ,3 β ,5 β ,22R)-2,314,20,22,25-hexahydroxy-cholest-7-en-6-one] e seus derivados acetilados, regulam a diferenciação dos queratinócitos. Essa diferenciação se traduz particularmente, em relação a epiderme, aumentando a coesão celular, regulando, favorecendo e/ou normalizando a diferenciação dos queratinócitos. Contribuindo dessa forma para fornecer à pele um aspecto mais liso e mais suave, além de restaurar, preservar e/ou reforçar a função protetora da pele (Cortez, Truitt e Cortez, 1998).

Os principais constituintes ativos do ginseng brasileiro são as saponinas, as quais já foram identificadas por diferentes autores em diversos estudos. Segundo Shiobara *et al.* (1993), a beta-ecdisona (CAS n° 8047-15-2) é caracterizada como o principal saponina da espécie *Pfaffia glomerata*. Mais recentemente, Nakamura *et al.* (2010) identificaram 6 novos constituintes e 8 já conhecidos, dentre os quais a beta-ecdisona apareceu em maior quantidade (0,46 gramas de beta ecdisona por 100 gramas de extrato). Essa é tida como o principal constituinte do Ginseng brasileiro em função de seu efeito adaptógeno (Zimmer *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2009)

A beta-ecdisona, (Figura 1.2), principal componente bioativo presente nas raízes de Ginseng brasileiro, possui estrutura esteroidal e pertence ao grupo dos fitoecdisteróides (Zimmer *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2009).

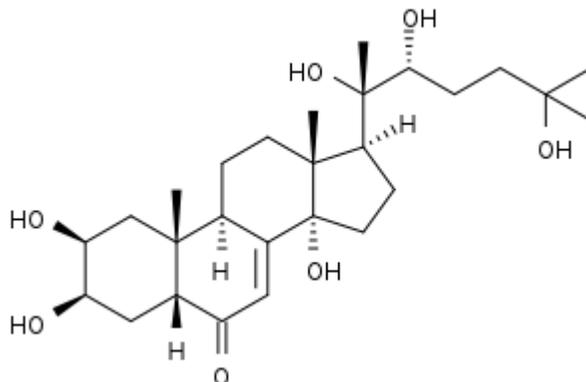


Figura 1.2. Estrutura química da beta-ecdisona. Fonte: Zimmer *et al.* (2006).

Análises feitas em raízes de diferentes acessos de *Pfaffia glomerata* mostraram teores de beta-ecdisona variando de 0,15 a 0,75 %, mostrando que a espécie apresenta grande variabilidade em relação ao acúmulo deste metabólito (Montanari, Magalhães e Queiroga, 1999; Figueiredo, 2004; Freitas *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2006). Segundo Figueiredo *et al.* (2004), essas variações no conteúdo de beta-ecdisona podem ser devido às diferenças na metodologia de análise e nas condições ambientais de cultivo.

1.1.2 Mercado

Devido aos resultados positivos obtidos em estudos acerca do Ginseng brasileiro (Ming e Correa, 2002; Correa, Ming e Cortez, 2008), há uma crescente demanda de raízes desta planta para servir como material de estudo e de matéria-prima para medicamentos e

complementos alimentares. Como o Ginseng brasileiro é uma espécie tropical perene, nativa brasileira, que não suporta baixas temperaturas, o Brasil tem sido fornecedor desta planta para diversos países (Júnior, 2005).

São poucas as informações disponíveis sobre a quantidade produzida e comercializada anualmente de Ginseng brasileiro e essas informações devem ser vistas com reservas, pois a maioria da produção é conseguida por extrativismo, principalmente na região noroeste do estado do Paraná e vendida aos atacadistas de plantas medicinais que as revendem para os mercados interno e externo. Foi estimado que apenas da bacia do alto Rio Paraná saiam 60 t/mês, atingindo 720 t anuais (Ming e Correa, 2002). Em 2005, o preço de raízes secas de Ginseng brasileiro pago pelo mercado atacadista de São Paulo situou-se entre R\$ 8,00 e 10,00 por kg (Júnior, 2005).

Os últimos dados da exportação do Ginseng brasileiro são de 2004, quando foram vendidas 190 toneladas do pó da raiz, confirmando a boa aceitação do produto no exterior. Acredita-se que esse volume seguramente deve ter aumentado nos últimos anos. Dentre os cinco “ginsengs” existentes no mundo (coreano, japonês, siberiano, norte-americano e a fáfia) o brasileiro é o que apresenta a maior possibilidade de expansão e crescimento, já que é mais produtivo que as outras espécies. Atualmente 50 produtores cultivam a fáfia, numa área total de 60 hectares. Os principais cultivos estão localizados no estado do Paraná em Querência do Norte e Araucária e a margem bruta de lucro da cultura chega a R\$ 20.000,00 por hectare (Emater, 2011).

1.2 EXTRAÇÃO

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, por processos químicos, físicos ou mecânicos. Quando se coloca em contato duas fases de composições diferentes, e, portanto com potenciais químicos dos vários componentes diferentes, pode ocorrer a transferência de massa dos componentes de uma fase para a outra. Esta é a base das operações de transferência de massa. Se estas fases ficarem em contato durante tempo suficiente, acabarão atingindo um estado de equilíbrio no qual, além de temperatura e pressão iguais, os potenciais químicos dos diversos componentes serão iguais. É nesta diferença de composição dos constituintes das fases na mistura que se baseiam algumas operações unitárias, tais como destilação, adsorção, absorção, separação por membranas, extração sólido-líquido, extração líquido-líquido, e também os processos de extração envolvendo fluidos supercríticos (Prado, 2010).

Em processos de engenharia, a extração possui diversas aplicações na remoção de contaminantes ou compostos indesejados dos alimentos como alcalóides e colesterol e na recuperação de componentes de interesse dos alimentos e/ou matrizes orgânicas. Entre os compostos de interesse encontram-se substâncias antioxidantes, flavorizantes, corantes, esteróides, entre outros (Leal, 2008).

O rendimento da extração de compostos de plantas é influenciado pelas condições em que o processo é realizado. A escolha do processo mais adequado depende de condições como temperatura, ação mecânica (pressão e agitação) e tipo do solvente (Takeuchi *et al.*, 2009). Além disso, a matriz vegetal apresenta uma microestrutura complexa formada por células, espaços intracelulares, capilares e poros. A extração é influenciada pela estrutura

molecular do soluto, tamanho, localização e a ligação com outros componentes. As características químicas do solvente e a estrutura e composição da planta asseguram que cada sistema matriz vegetal-solvente apresenta comportamento peculiar, o qual não pode ser facilmente previsto (Veggi, 2009). Portanto, o estudo do comportamento de cada sistema se faz relevante, uma vez que se deseja obter determinadas substâncias de matrizes vegetais.

A otimização de processos de extração deve buscar a determinação do maior rendimento com maior taxa de extração, com mínimo consumo de energia e mínimo solvente residual, produzindo um extrato de alta qualidade química e sensorial (Badalyan, Wilkinson e Chun, 1998).

1.2.1 Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido, ou extração com solvente, consiste na dissolução seletiva por um solvente líquido dos compostos solúveis presentes em uma matéria sólida e representa uma etapa importante de muitos processos industriais. É realizada como uma fase inicial de preparo dos produtos a fim de disponibilizar o material extraível contido nas matrizes vegetais (Veggi, 2009). O exemplo mais importante é o setor de plantas medicinais, das quais são extraídos princípios ativos com as propriedades farmacológicas para o tratamento de diversas patologias humanas, aplicáveis também em indústria de cosméticos e de perfume (Naviglio *et al.*, 2007).

No início do processo o solvente entra nos capilares da matéria-prima dissolvendo o extrato. Uma mudança na concentração entre a solução no material da extração e a solução que cerca as partículas contínuas ocorre em função da difusão. Ao final do processo, uma

determinada quantidade de solução composta por uma mistura de solvente e soluto extraído é retirada ainda nas partículas contínuas, razão pela qual não é possível realizar praticamente nenhuma extração por completo (Gamse, 2002).

Do ponto de vista industrial, alguns fatores devem ser avaliados antes de iniciar o processo, uma vez que estes influenciam na taxa de extração (Takeuchi *et al.*, 2009):

- Preparação do material sólido: Embora o soluto desejado possa estar sobre a superfície das células, na maioria dos casos o soluto encontra-se nos espaços intracelulares, capilares ou estrutura da célula. Assim, o sucesso da extração com solvente é dependente das condições do sólido. Uma etapa de pré-tratamento que pode ser considerada é a moagem da matéria-prima, que promove um aumento da área de contato entre o solvente e a matriz sólida;

- Umidade do material sólido: A água presente na matriz pode competir com o solvente extrativo pela dissolução do soluto, afetando a transferência de massa. Na maioria dos casos, o material é seco em condições que não causem a degradação dos compostos;

- Taxa de difusão: Devido à complexidade da estrutura da célula e a existência de poros e diferentes compartimentos no interior das células, a difusividade de materiais biológicos tem uma denominação específica: difusividade efetiva. Essa depende da composição e da posição do soluto na matriz sólida;

- Temperatura: Em geral, temperaturas elevadas são atrativas em processos de extração. Altas temperaturas promovem um aumento na solubilidade do soluto no solvente, aumentando a taxa de difusão do soluto e, conseqüentemente, levando a uma maior taxa de transferência de massa. Entretanto, na indústria de alimentos, o uso de altas temperaturas

pode gerar reações indesejadas que causam, por exemplo, a degradação de compostos termolábeis;

- Escolha do solvente: A seleção do solvente de extração é baseada em diversos fatores, tais como as propriedades físico-químicas, custo e toxicidade. A escolha do solvente deve considerar características como a seletividade e capacidade de dissolver o soluto, assim como a tensão interfacial, viscosidade, estabilidade, reatividade, toxicidade e custo. Alguns solventes orgânicos têm restrições quanto ao seu uso em alimentos devido à toxicidade. Em termos de consumo humano, a presença de alguns solventes como acetona, etanol, acetato de etila, acetato de propila, 1- propanol e 2- propanol são aceitáveis em percentagens residuais baixas, de acordo com as boas práticas de fabricação (BPF). Estes são classificados como Classe 1 pela FDA (Food and Drug Administration). Outros, classificados como Classe 2, tais como acetonitrila, clorofórmio, hexano, metanol, tolueno, diclorometano e etil-metil-cetona podem ser usados sob condições específicas e apresentam limitações para aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos devido sua toxicidade inerente. Os solventes que compreendem a Classe 3 são bezeno, tetracloreto de carbono, 1,2- dicloroetano, 1,1-dicloroetano e 1,1,1-tricloroetano e não devem ser usados devido sua toxicidade inaceitável e seus efeitos deletérios ao meio ambiente.

Dentre os métodos de extração sólido-líquido mais aplicados à obtenção de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais encontram-se Soxhlet, hidrodestilação e maceração (Wang e Weller, 2006). Em geral, através destes métodos, muitas toneladas de matéria-prima são necessárias para obter alguns gramas de metabólitos secundários, que em pequenas quantidades não forneceriam nenhum papel fisiológico vital. A fim de explorar os recursos oferecidos pela planta, novas técnicas de extração são desenvolvidas para obter tais metabólitos secundários com finalidades comerciais (Poirot *et al.*, 2006).

1.2.1.1 Extração com fluido supercrítico (SFE)

O processo de extração com fluido supercrítico (SFE) é uma operação unitária por contato que se fundamenta no equilíbrio e nas propriedades físico-químicas dos fluidos supercríticos: alto poder de solvatação, alto coeficiente de difusão, baixa tensão superficial e baixa viscosidade (Brunner, 1994).

Fluidos supercríticos

Um fluido supercrítico (SCF = *Supercritical Fluid*) pode ser definido como uma substância na qual sua temperatura e pressão estão acima dos valores críticos (Figura 1.3). Entretanto, essa definição é de uso limitado, uma vez que nenhuma informação é dada sobre a densidade da substância. Assim pode ser descrito, de forma mais prática, como qualquer substância que se encontra na temperatura, pressão e densidade acima de seus valores críticos (Darr e Poliakoff, 1999).

Próximo da densidade crítica, fluidos supercríticos apresentam propriedades que estão muitas vezes entre aquelas de um líquido e um gás. Por exemplo, um fluido supercrítico pode ser relativamente denso e dissolver certos sólidos, exibindo alta difusividade e baixa viscosidade. Ainda, fluidos supercríticos são altamente compressíveis e a densidade pode ser alterada ao longo de uma vasta faixa de pressão e temperatura (Figura 1.4). Esta propriedade pode ser explorada, por exemplo, na separação de produtos reacionais ou no fracionamento de polímeros. Dentre os SCFs o dióxido de carbono (CO₂) tem sido amplamente usado, uma vez que sua utilização pode acarretar em alguns

benefícios reais, como, a redução da utilização de solventes orgânicos tóxicos e a facilidade da separação do solvente.

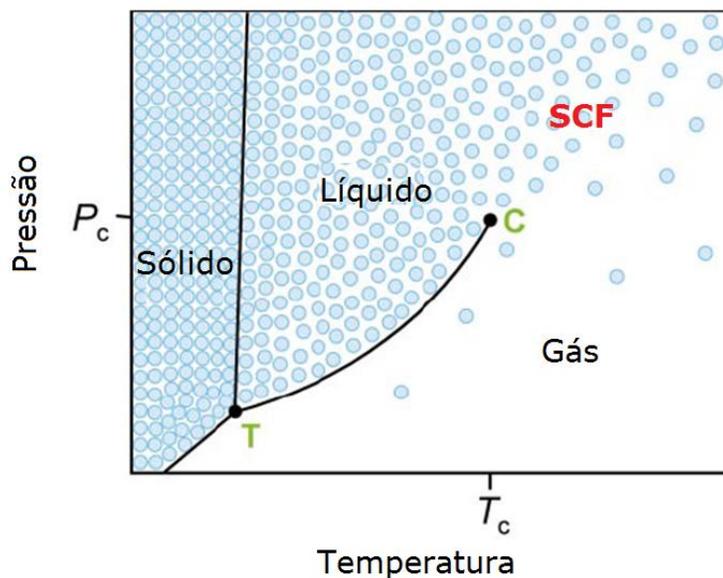


Figura 1.3. Diagrama de fases P-T para uma substância pura, onde C é o ponto crítico e T é o ponto triplo. Fonte: adaptado de Cooper (2000).

Quando um líquido é aquecido acima de sua temperatura crítica a uma pressão que exceda sua pressão crítica, a transição de líquido para fluido supercrítico é contínua (Figura 1.4). Entretanto, sob condições apropriadas (logo abaixo da temperatura e pressão crítica), o CO_2 líquido pode ser considerado como um fluido “próximo da condição crítica”, o qual apresenta propriedades semelhantes às dos SCFs (baixa viscosidade e densidade). Como consequência, o CO_2 líquido próximo de sua condição crítica demonstra um grau de compressibilidade limitado e suas propriedades podem ser “ajustadas” em função da pressão. Uma vantagem prática de se trabalhar com CO_2 líquido é que densidades relativamente altas podem ser encontradas em pressões moderadas, por exemplo, a densidade do CO_2 líquido a $20\text{ }^\circ\text{C}$ é de $0,84\text{ g.cm}^{-3}$ em pressões acima de 75 bar.

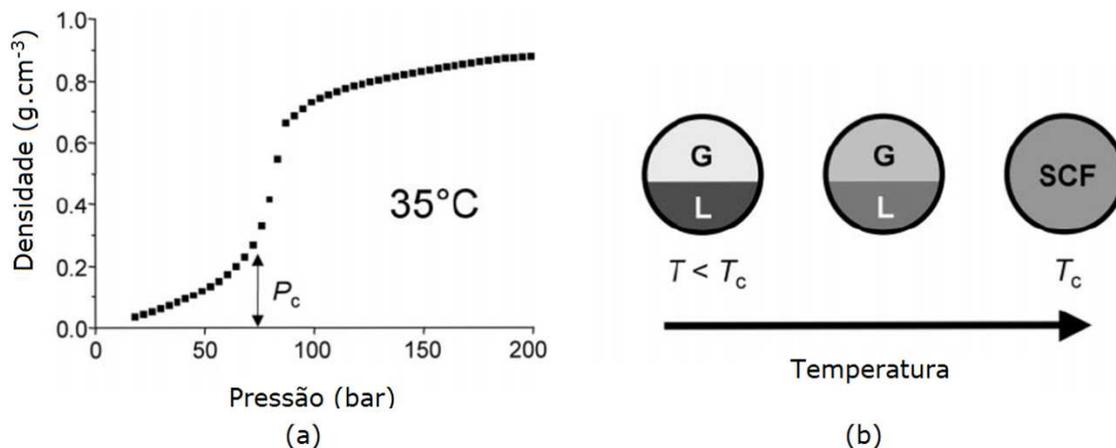


Figura 1.4. (a) Demonstração gráfica da variação da densidade do CO₂ puro. (b) Representação esquemática da variação a partir do equilíbrio gás-líquido ($T < T_c$) para fluido supercrítico ($T \geq T_c$), onde a substância é aquecida até sua temperatura crítica na pressão acima da P_c . Fonte: adaptado de Cooper (2000).

Neste sentido, a aplicação de solventes em condição supercrítica é baseada na observação experimental de que muitos gases apresentam melhoria significativa de seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (Mchugh e Krukoni, 1994).

Fluidos em estado supercrítico apresentam propriedades de transporte, como difusividade e viscosidade, com valores intermediários entre as dos gases e dos fluidos (Brunner, 2005). Faixas de valores de densidade, difusividade e viscosidade de compostos em diferentes estados de agregação estão dispostas na Tabela 1.1, na qual a pressão é indicada pela letra P, a temperatura pela letra T e o subíndice *c* refere-se à condição supercrítica.

Estas propriedades tornam os fluidos supercríticos interessantes para processos de extração já que a alta densidade proporciona a eles um poder de solvatação semelhante ao apresentado pelos líquidos, enquanto a alta difusividade e a baixa viscosidade permitem

alto poder de penetração em diferentes matrizes, propriedade essa apresentada pelos gases (Rizvi *et al.*, 1986), o que favorece a transferência de massa no processo de extração.

Tabela 1.1. Propriedades características de gases, líquidos e fluidos supercríticos (Brunner, 2005).

Estado do fluido	Densidade (kg/m ³)	Difusividade (m ² /s)	Viscosidade (kg/m.s)
<i>Gasoso</i>			
P=1atm T=298-303K	0,6-2,0	$(0,1-0,4) \times 10^{-4}$	$(0,6-2,0) \times 10^{-5}$
<i>Líquido</i>			
P=1atm T=298-303k	600-1600	$(0,2-2,0) \times 10^{-9}$	$(0,2-3,0) \times 10^{-3}$
<i>Fluido Supercrítico</i>			
P=P _c , T≈T _c	200-500	$0,7 \times 10^{-7}$	$(1-3) \times 10^{-5}$
P=4P _c , T≈T _c	400-900	$0,2 \times 10^{-7}$	$(3-9) \times 10^{-5}$

Processo de extração supercrítica

A extração supercrítica de plantas é um processo baseado no contato entre um leito fixo de material vegetal moído com um solvente em estado supercrítico, sendo um processo de separação físico-química que remove um soluto ou uma mistura de solutos da fase sólida (matriz vegetal), e consiste em duas etapas principais: extração e separação do extrato do solvente (Diaz e Brignole, 2009).

A etapa de extração se inicia quando o solvente no estado supercrítico é bombeado através do extrator, escoando continuamente através da matéria-prima sólida, a qual absorve o fluido, dilatando sua estrutura celular e diminuindo a resistência ao transporte de

massa, facilitando a solubilização dos compostos que são transportados para a superfície do sólido, escoando para a saída do extrator.

A etapa de separação do extrato do solvente ocorre quando a pressão do fluido é reduzida por uma válvula de expansão, localizada após o extrator, diminuindo drasticamente seu poder de solubilização quando expandido a estado gasoso, e o soluto (extrato) precipita em um separador onde sua quantidade pode ser medida (Brunner, 1994).

Na etapa de extração, as condições de operação, temperatura, pressão e utilização de cossolvente ou não, são selecionadas para maximizar os rendimentos nos compostos de interesse, enquanto que na separação o nível de solubilidade é reduzido para assegurar a precipitação do extrato e possibilitar a reciclagem do fluido supercrítico (Quispe-Condori, 2005). A etapa de separação pode ser realizada por decompressão, variação de temperatura e adsorção. Em escala laboratorial, a separação pode ser realizada à pressão atmosférica e o solvente pode ser descartado ao ambiente, e em escala maior, o solvente deixa o dispositivo de coleta em pressões bem acima da pressão atmosférica, embora bem abaixo da pressão de operação, e é resfriado para recirculação.

O CO₂ é o solvente mais usado para a extração supercrítica por estar disponível em alta pureza, ser barato, não tóxico, não inflamável e de fácil remoção do soluto, pois é removido pela simples expansão à pressão ambiente. Suas propriedades críticas são relativamente baixas, o que o torna favorável como solvente de extração de compostos termosensíveis, uma vez que não são necessariamente expostos a altas temperaturas (que podem induzir alterações em sua composição) e nem às altas pressões de operação. Há assim redução de investimento e, conseqüentemente, os custos de manufatura (Uquiche, Del Valle e Ortiz, 2004; Brunner, 2005; Vasconcellos, 2007).

O estudo de processos SFE deve envolver a interação complexa entre a termodinâmica (solubilidade) e a cinética de extração (transferência de massa) (Badalyan, Wilkinson e Chun, 1998; Rosa e Meireles, 2009).

1.2.1.2 Extração com líquido pressurizado (PLE)

Recentemente, o interesse por novas técnicas de extração que não agridam o ambiente e produzam produtos seguros têm aumentado. Uma técnica que vem sendo estudada e que atende a estes requisitos é a extração com líquido pressurizado, a qual consiste na aplicação de pressão durante o processo de extração e permite o uso de temperaturas acima da temperatura de ebulição dos solventes, sem atingir o ponto crítico (Nieto *et al.*, 2010). Estas condições melhoram a solubilidade do soluto no solvente e a cinética de desorção a partir da matriz sólida (Ju e Howard, 2003).

A PLE baseia-se na utilização de solventes orgânicos que são submetidos à alta temperatura e pressão a fim de extrair determinados compostos de matrizes sólidas ou semissólidas em um curto tempo e com a utilização de pequena quantidade de solvente.

A PLE utiliza uma vasta faixa de condições na região do líquido comprimido, situado à esquerda da curva de líquido saturado e abaixo da linha da temperatura crítica (T_c), como mostrado no diagrama de pressão-volume do etanol (Figura 1.5). Nesta região, os líquidos são altamente incompressíveis e quando os solventes são submetidos a mudanças de pressão a uma temperatura constante, sua densidade e poder de solvatação não são afetados significativamente. No entanto, o aumento da temperatura melhora a eficiência da extração uma vez que promove o aumento das taxas de transferência de massa e de difusão (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

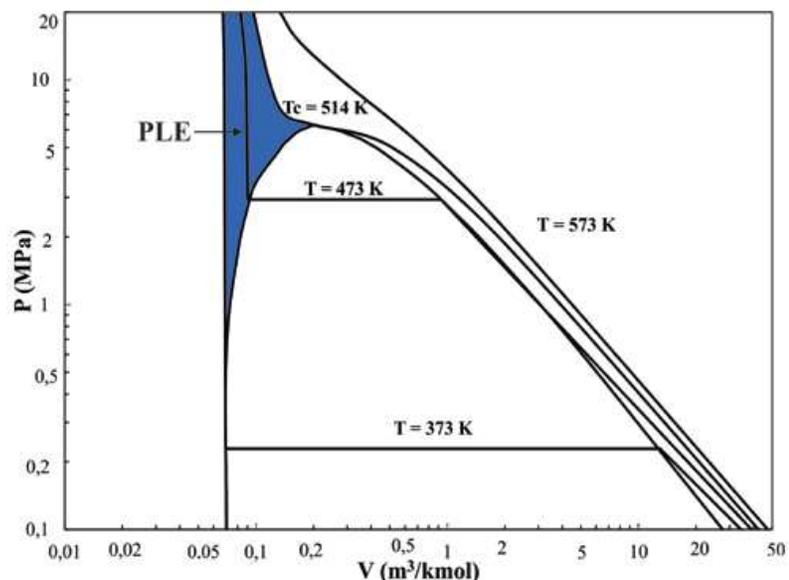


Figura 1.5. Diagrama Pressão-Volume para o etanol, calculado pela equação de estado de Peng-Robinson (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

A principal vantagem deste método de extração consiste na utilização de temperaturas acima do ponto de ebulição (80 a 200 °C) dos solventes os quais são pressurizados normalmente de 3,5 a 20 MPa, de forma a serem mantidos no estado líquido (Osorio-Tobón e Meireles, 2013). Os altos valores de temperatura aumentam a solubilidade, taxa de difusão e transferência de massa enquanto os valores de viscosidade e tensão superficial do solvente são menores do que aqueles à temperatura ambiente. Além disso, à alta temperatura a energia de ativação de dessorção é superada mais facilmente e as cinéticas de dessorção e solubilização são mais favoráveis (Huie, 2002). Este método de extração, assim como a SFE, utiliza ambiente livre de oxigênio e luz, o que tem promovido sua ampla utilização na extração de compostos bioativos (Stalikas, 2007).

A PLE apresenta vantagens como curto tempo de extração (entre 15 e 45 minutos) e baixo consumo de solvente em relação às técnicas de extração convencionais (Wijngaard,

Ballay e Brunton, 2011). Outra vantagem em relação às demais técnicas de extração emergentes, como extração assistida por ultrassom ou microondas, é que PLE não se limita ao uso de solventes que absorvam tais ondas. As principais limitações desse método, assim como acontece com outras técnicas são: baixa seletividade de extração que permite a coextração de compostos indesejados e, em alguns casos, o extrato obtido pode estar muito diluído, principalmente se vários ciclos de extração forem empregados (Nieto *et al.*, 2010).

Os parâmetros que afetam significativamente a PLE são o solvente de extração, temperatura, pressão, tempo de extração estático, número de ciclos de extração e massa da amostra. Cada parâmetro pode ser otimizado separadamente ou usando técnicas de delimitamento experimental (Nieto *et al.*, 2010).

Ju e Howard (2003) estudaram o efeito do solvente e da temperatura na PLE de antocianinas e compostos fenólicos da casca de uva vermelha. Observaram que o uso de água acidificada a altas temperaturas (80-100 °C), que é um solvente “verde” foi tão efetiva quanto metanol a 60 % acidificado na extração de antocianinas. Já para compostos fenólicos, o maior rendimento foi obtido quando a mistura metanol: acetona: água: HCl (40:40:20:0,1) foi usada.

Santos *et al.* (2011) também utilizaram PLE para extração de antocianinas a partir de cascas de jabuticaba e a melhor condição de extração estabelecida foi: a pressão de 5 MPa, temperatura de 80°C, tempo estático de 9 minutos e a vazão de solvente foi 1,67 mL/min (por 12 minutos) (Santos e Meireles, 2011).

No estudo realizado por Srinivas *et al.* (2011), foram avaliados os efeitos da temperatura, tipo de solvente e presença de ácidos orgânicos sobre a extração de flavonoides e antocianinas do bagaço de uva (*Vitis labrusca* L) utilizando PLE. A mistura de etanol:água a 80 % mostrou-se como solvente ótimo para a extração de antocianinas (na

presença de ácido acético) e flavonoides (sem ácido acético). A temperatura ótima para extração de antocianinas e flavonoides foi 85,4 °C e 124 °C, respectivamente. Sob condições ótimas, a PLE apresentou rendimento 158 % maior que extração com solvente convencional (Srinivas *et al.*, 2011).

A PLE foi estudada para extração de compostos voláteis de folhas de cúrcuma (*Curcuma domestica*) e as condições ótimas de extração obtidas foram 147 °C, 7150 kPa e 17 min de tempo estático. Sob estas condições PLE mostrou-se vantajosa em relação aos métodos convencionais (hidrodestilação e Soxhlet), pois apresentou o melhor rendimento e requereu menor tempo de extração e quantidade de solvente (Zaibunnisa *et al.*, 2009).

1.2.2 Solubilidade

A massa de soluto dissolvido em um solvente depende das similaridades e diferenças nas propriedades termodinâmicas e estruturais do soluto e do solvente. Biomoléculas e misturas multicomponentes devem ser caracterizadas previamente antes de se analisar sua solubilidade em solventes supercríticos, a fim de conhecer as interações entre os solutos e destes com o solvente. É possível, também, conhecer as interações entre a matriz biológica inerte ao solvente (estrutura celulósica) e soluto. No entanto, para os extratos vegetais, por possuírem composição química complexa, chegando a conter centenas de compostos, este tipo de estudo torna-se intrincado. Por outro lado, o comportamento de misturas complexas pode ser predito através do estudo de sistemas mais simples, binários ou ternários (Prado, 2010).

A solubilidade é um parâmetro de grande relevância na determinação das condições de operação enquanto que a seletividade permite a obtenção de informações acerca da qualidade e composição dos extratos (França *et al.*, 1999).

O equilíbrio de fases determina os limites para a transferência de massa entre diferentes fases envolvidas em processos de separação, como a extração com fluido supercrítico. Além da temperatura e da pressão, outros fatores devem ser considerados para a determinação da solubilidade. Entre estes cita-se o tamanho da molécula e a funcionalidade do soluto, a funcionalidade do solvente, a pressão de vapor do soluto, as interações moleculares existentes no sistema, as quantidades envolvidas e a complexidade do sistema (Brunner, 1994).

A seletividade do solvente por determinados componentes de uma mistura pode ser controlada mediante o ajuste das condições de temperatura e pressão do processo, dentro da região supercrítica. A definição das condições de extração (temperatura e pressão) indica o poder de solvatação do solvente. Assim, quanto maior o poder de solvatação, maior não somente a solubilidade de um determinado composto, como o número de compostos solubilizáveis de uma mistura. Assim, alta solubilidade significa baixa seletividade e vice-versa (Brunner, 1994; França *et al.*, 1999).

A condição de equilíbrio em sistemas com fluidos pressurizados fornece informações sobre a capacidade do solvente de solubilizar substâncias no equilíbrio termodinâmico (Brunner, 1994):

- Composição em equilíbrio na fase líquida;
- Seletividade do solvente (habilidade do solvente em solubilizar seletivamente um ou mais compostos da mistura).

1.2.3 Rendimento Global (X_0)

O rendimento global (X_0) é definido como a quantidade de material solúvel que pode ser extraída de uma determinada quantidade de matéria-prima em uma dada pressão e temperatura de extração, expressa como a relação entre a massa de material solúvel pela massa de matéria-prima sólida (Meireles, 2003). No cálculo do rendimento global (Eq. 1.1) a quantidade de material extraível é calculada como a relação entre a massa total de extrato ($M_{extrato}$) e a massa inicial da amostra em base seca ($M_{amostra\ b.s.}$) em base seca.

$$X_0 = \left(\frac{M_{extrato}}{M_{amostra\ b.s.}} \right) 100 \quad \text{Eq. (1.1)}$$

O X_0 também considera as interações de um sistema pseudoternário, e ainda que a solubilidade do extrato no fluido supercrítico não possa ser determinada através de experimentos de rendimento global, este dado pode ser utilizado como um indicativo de solubilidade (Rodrigues *et al.*, 2002). O X_0 é mais útil na seleção de temperatura e pressão do processo de extração, uma vez que se pode empregar menor tempo para sua determinação quando comparado ao método dinâmico de determinação da solubilidade (Rodrigues *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2005).

O X_0 depende das características da matéria-prima, mas também da forma como os compostos nela presentes interagem com o solvente. Portanto, o X_0 está diretamente ligado a duas propriedades físico-químicas: densidade do solvente e pressão de vapor e/ou sublimação do soluto (Brunner, 2005).

De forma geral, o comportamento do X_0 com a pressão e temperatura permite visualizar o comportamento da solubilidade do extrato, proporcionando as informações

necessárias para a seleção das condições operacionais de extração. Além disso, é usado como um dado experimental importante na aplicação dos diversos modelos matemáticos (Prado, 2010).

1.2.3.1 Modificadores ou cossolventes

O dióxido de carbono possui limitada habilidade de dissolver moléculas polares, mesmo a elevadas densidades. Portanto, uma alternativa para modificar sua polaridade é a adição de pequenas quantidades de substâncias polares, tais como água e etanol (Reverchon e De Marco, 2006).

Desta forma, a adição de cossolventes provoca um incremento de polaridade do solvente de extração, contribuindo para o aumento da eficiência do processo nos casos em que os compostos que se pretende isolar são substâncias com maior polaridade, como acontece com boa parte das substâncias com propriedades antioxidantes (Ko, Weng e Chiou, 2002). Neste caso, as isotermas de rendimento global podem apresentar comportamento muito mais complexo do que o apresentado para sistemas apenas com CO₂ como solvente, com mais de uma pressão de inversão (Leal *et al.*, 2008; Takeuchi, 2009).

O uso de cossolventes acrescenta uma etapa ao processo de extração, no caso da extração supercrítica, que é a remoção de solvente no extrato final. Porém, as quantidades de cossolventes utilizadas são geralmente reduzidas, mantendo assim todas suas vantagens (Braga *et al.*, 2003).

1.2.4 Cinética de Extração

A curva global de extração (OEC = Overall Extraction Curve) consiste na função entre a massa de extrato ou rendimento acumulado e o tempo de extração ou a quantidade de solvente utilizada (Brunner, 1994). Uma OEC (Figura 1.6) descreve o processo de SFE, fornecendo informações sobre o comportamento cinético da extração, possibilitando a determinação do tempo requerido para uma batelada (ciclo de extração) mais viável para um processo.

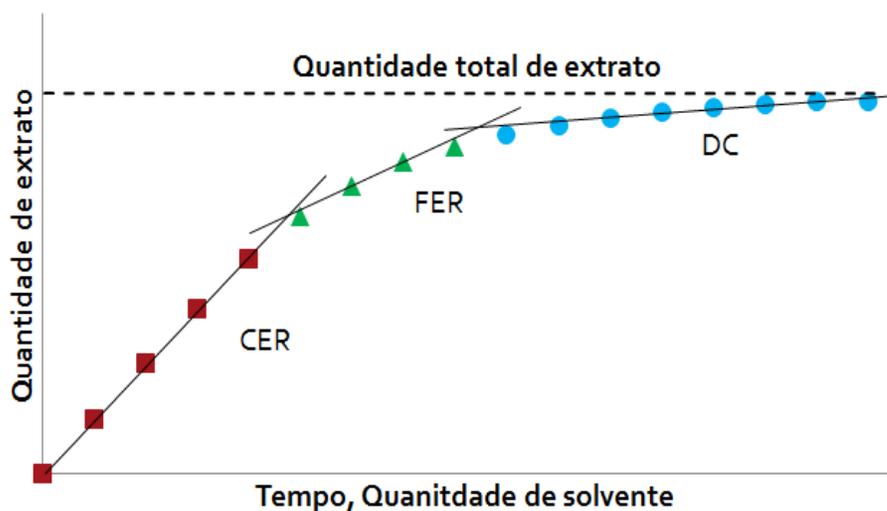


Figura 1.6. Curva de extração típica de processo supercrítico apresentando os três períodos característicos: taxa de extração constante (CER), taxa de extração decrescente (FER) e período difusional (DC). Fonte: adaptado de Brunner (1994).

Ao longo do processo SFE, a taxa de obtenção do extrato não é uma função linear no tempo, como pode ser observado na Figura 1.6 uma OEC típica pode ser descrita por três etapas (Vasconcellos, 2007; Meireles, 2008):

Etapa de taxa constante de extração (CER = Constant Extraction Rate): período em que ocorre extração do soluto mais facilmente acessível da superfície externa das partículas ou que foi liberado pelas células rompidas durante o pré-processamento (moagem). Nesta etapa a resistência à transferência de massa encontra-se majoritariamente no filme externo próximo à superfície da partícula, prevalecendo a transferência de massa por convecção. Em geral a taxa de extração é aproximadamente constante, e pode ser caracterizada pelos seguintes parâmetros: t_{CER} (duração do período CER), Y_{CER} (razão mássica de soluto por solvente na saída do leito no período CER), M_{CER} (taxa de transferência de massa no período CER) e R_{CER} (rendimento no período CER);

Etapa de taxa decrescente de extração (FER = Falling Extraction Rate), na qual aparecem falhas na camada superficial do soluto que recobre as partículas, ou o número de células rompidas não é mais uniforme, o que leva a uma resistência à transferência de massa na interface sólido-fluido. Nesta etapa a taxa de extração decresce rapidamente como resultado da diminuição da área efetiva de transferência de massa, e passa a ser significativo o processo de transferência de massa por difusão. Nesta fase de transição, a resistência à transferência de massa encontra-se concomitantemente na fase sólida e na fase fluida, e tanto a convecção quanto a difusão são importantes;

Etapa difusiva (DC = Diffusion Controlled), na qual não há mais soluto de fácil acesso recobrindo a superfície das partículas. A taxa de extração é determinada pela difusão do solvente para o interior das partículas sólidas seguida da difusão da mistura soluto + solvente para a superfície das partículas, caracterizando uma etapa lenta do processo de extração.

Segundo Meireles (2008) uma OEC pode ser descrita por um ajuste de retas, o qual pode ser realizado através de um *spline* linear. A massa de extrato (ou rendimento) pode ser calculada a partir da Equação 1.2, para cada uma das diversas retas.

$$m_{EXT}(t) = \left(b_0 - \sum_{i=1}^{i=N-1} t_i a_{i+1} \right) + \sum_{i=1}^{i=N} a_i t \quad \text{Eq. (1.2)}$$

Onde $m_{EXT}(t)$ é a massa do extrato recuperada (ou o rendimento da extração); b_i para $i = 0, 1, 2, \dots$ são os coeficientes lineares e a_i para $i = 1, 2, \dots$ são os coeficientes angulares das retas ajustadas (1, 2, ..., N); t_i para $i = 1, 2, \dots, N - 1$ é a intersecção entre essas retas; assim, t_1 é o tempo de intersecção entre a primeira e a segunda retas; e t é o tempo de extração. Então, para três retas, aplicação da Equação 1.2 resulta em:

Para $t \leq t_1$, isto é, para a primeira reta ou período CER, tem-se:

$$m_{EXT}(t) = b_0 + a_1 t \quad \text{Eq. (1.3)}$$

Para $t_1 \leq t \leq t_2$, isto é, para a segunda reta ou período FER, tem-se:

$$m_{EXT}(t) = (b_0 - t_1 a_2) + (a_1 + a_2) t \quad \text{Eq. (1.4)}$$

Para $t \geq t_2$, isto é, para a terceira reta ou período DC, tem-se:

$$m_{EXT}(t) = (b_0 - t_1 a_2 - t_2 a_3) + (a_1 + a_2 + a_3) t \quad \text{Eq. (1.5)}$$

Para OECs caracterizadas pelas três etapas de extração (período CER, FER e DC), um ajuste de três retas é utilizado. Para curvas onde os três períodos não estão claramente definidos, um ajuste de duas retas mostra-se mais adequado. Quando a resistência à

transferência de massa está totalmente localizada na fase fluida (solvente + soluto) há apenas uma reta; quando há resistência em ambas as fases, fluida e sólida (estrutura celulósica + soluto) a OEC segue um formato exponencial (Brunner, 2005).

A inclinação da primeira reta representa a taxa de transferência de massa da etapa CER, M_{CER} . Apesar de M_{CER} poder ser determinada pela solubilidade no equilíbrio, uma reta pode também ser causada por uma resistência constante à transferência de massa, portanto, não se pode afirmar que a condição de equilíbrio foi atingida durante a extração (Brunner, 2005). Para garantir que o equilíbrio seja atingido, é necessário realizar vários experimentos com variação de vazão (Rodrigues *et al.*, 2002). Sendo assim, Y_{CER} é definido como a razão de massa de soluto na fase supercrítica na saída do extrator durante o período CER, e é obtido dividindo M_{CER} pela vazão média de solvente durante o período CER.

O tempo correspondente à intersecção das duas primeiras retas (t_1) é denominado t_{CER} e pode ser utilizado como estimativa inicial do tempo mínimo de duração de um ciclo de SFE. O rendimento relativo ao período CER, denominado R_{CER} , é o rendimento mínimo esperado do processo SFE para dada temperatura, pressão, vazão de solvente e pré-processamento de matriz vegetal. O tempo correspondente à intersecção entre a segunda e a terceira retas é denominado t_{FER} geralmente o tempo de ciclo mais favorável do ponto de vista econômico está localizado entre t_{CER} e t_{FER} (Meireles, 2008). Em alguns casos, quando o rendimento é muito baixo durante o período CER, define-se o t_{CER2} , sendo este a intersecção entre a primeira e a terceira reta, o que pode representar uma estimativa inicial de tempo de ciclo mais apropriada do que o t_{CER} (Leal, 2008).

O processo de PLE também é caracterizado pela OEC, onde os parâmetros cinéticos são obtidos através do ajuste de retas da mesma forma que a SFE (Osorio-Tobón e Meireles, 2013).

1.3 SIMULAÇÃO DE PROCESSOS

A simulação de processos é uma ferramenta muito utilizada por diversas áreas da engenharia, dando oportunidade para se trabalhar de forma otimizada, uma vez que permite a redução do tempo necessário para o desenvolvimento de processos. Ela permite a comparação entre alternativas de processos em uma base consistente na qual um grande número de informações processadas podem ser sintetizadas e analisadas interativamente em pouco tempo (Rouf *et al.*, 2001).

Os simuladores de processos são usados principalmente para avaliar cenários e para otimizar processos integrados. Esses podem ser aplicados em diversos estágios durante o processo da comercialização, sendo também utilizados na seleção do projeto baseados na análise econômica ou em outra exigência crítica do processo. O simulador permite o ajuste do processo e das condições operacionais permitindo que uma indústria reduza os custos e o tempo da utilização de laboratório e planta piloto (Jully *et al.*, 2004).

O simulador de processos SuperPro Designer® é um moderno *software* de processos industriais, constituído de módulos que representam, na quase totalidade, os processos das indústrias químicas e de alimentos, incluindo separadores, trocadores de calor e bioreatores. O *software* oferece uma vasta seleção de métodos para cálculos facilitando a difícil tarefa de desenvolver e desenhar o projeto de processos (Araújo *et al.*, 2004). O método principal do programa é que este executa suas simulações através dos

procedimentos da unidade na qual um conjunto de operações ocorre sequencialmente em uma parte do equipamento.

O *software* SuperPro Designer® permite que o usuário analise operações unitárias básicas individuais, mas com a flexibilidade de combinar estas operações unitárias para uma análise holística e integrada. Vários tipos de configurações do processo podem ser estudados, e o impacto visual é fornecido primeiramente pelo fluxo de diagramas esquemáticos produzidos pelo usuário. O *software* ainda permite a documentação detalhada dos resultados, gerando relatórios tanto de avaliação econômica quanto de dados de entrada e saída (Flora, Mcanally e Petrides, 1998).

O processo de extração em escala de laboratório pode ser transferido com sucesso para uma escala piloto, no entanto, uma avaliação econômica deve ser realizada anteriormente (Kotnik, Skerget e Knez, 2007).

A partir dos dados de rendimento e qualidade do extrato (composição química e funcionalidade) em cada tempo de operação de extração obtidos pela OEC e também a partir dos parâmetros de processo na etapa CER, em que o soluto é mais acessível, é possível otimizar o processo e estudar o aumento de escala para diferentes tamanhos de unidades laboratoriais. E assim validar os critérios de aumento de escala e estimar o custo de manufatura (Albuquerque, 2013).

1.4 JUSTIFICATIVA

Vários estudos farmacológicos e medicinais têm apresentado as propriedades dos extratos obtidos a partir das raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) como, por exemplo, propriedades analgésicas, anti-inflamatórias (Neto *et al.*, 2005), anti-glicêmicas

(Sanches *et al.*, 2001), anti-microbianas (Neto *et al.*, 2004), entre outras. Sendo o principal foco desses estudos a avaliação das propriedades do extrato e não necessariamente a técnica de extração utilizada para a obtenção dele.

Geralmente esses extratos são obtidos por extração com solventes orgânicos (Nishimoto *et al.*, 1984; Shiobara *et al.*, 1993), como metanol e clorofórmio, que são tóxicos e deixam resíduos no produto final. Existem estudos nos quais foram utilizados etanol e água aquecida (Freitas *et al.*, 2004), no entanto o rendimento foi extremamente baixo, havendo a necessidade de remoção do solvente por liofilização o que implica em maior custo e gasto energético.

Com base no potencial desses extratos, o grupo de pesquisa LASEFI vem explorando essa raiz em diversos trabalhos com o objetivo de obter produtos com diferentes propriedades e aplicações utilizando diferentes técnicas de extração a altas pressões (Leal *et al.*, 2010; Santos, Albarelli e Meireles, 2012; Santos, Barbosa, Vardanega, Albarelli, *et al.*, 2013; Santos, Barbosa, Vardanega, Sgomes, *et al.*, 2013; Santos, Vardanega, *et al.*, 2013).

No estudo da SFE das raízes de Ginseng brasileiro realizado por Leal *et al.* (2010) foram avaliadas as temperaturas de 30 e 50 °C e as pressões de 10, 20 e 30 MPa. A melhor condição de extração foi a 50 °C e 20 MPa, em que foi conduzido o estudo cinético com a utilização de etanol como cossolvente. Em termos de rendimento em extrato (base seca), esse foi maior quando utilizado 10 % de etanol (0,52 %). Nesse mesmo estudo também foi realizada a quantificação de beta-ecdisona, chegando a 4,6%. Porém os resultados obtidos ainda são baixos.

Santos *et al.* (2012) realizaram o estudo da PLE das raízes de Ginseng brasileiro, à 60 °C e 12 MPa, no qual o foco do trabalho foi a simulação do processo. Os resultados obtidos foram satisfatórios, porém ainda são necessários mais estudos com o objetivo de otimizar

todas as etapas do processo de obtenção do extrato e também com o objetivo de realizar análises químicas dele.

A presença de saponinas nas raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) favorece a formação de emulsões, portanto técnicas de extração convencionais não são adequadas para obtenção do extrato. Estudos mostraram que a utilizando a técnica de PLE foram obtidos extratos com propriedades surfactantes satisfatórias para a preparação de emulsões contendo óleos essenciais (Santos, Barbosa, Vardanega, Albarelli, *et al.*, 2013; Santos, Barbosa, Vardanega, Sgomes, *et al.*, 2013).

Nesse sentido, o estudo de extrações a altas pressões (SFE e PLE) das raízes de Ginseng brasileiro são de grande valia, principalmente em termos de quantificação de beta-ecdisona, que é o principal componente com atividade biológica dessas raízes empregado em formulações cosméticas e farmacológicas.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Estudar e otimizar a extração de beta-ecdisona das raízes do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) utilizando fluidos supercríticos (SFE) e líquidos pressurizados (PLE), utilizando CO₂, etanol e a mistura etanol:água (80:20) como solventes.

1.5.2 Objetivos específicos

- Extração com fluidos supercríticos (SFE):

Realizar ensaios exploratórios da cinética de extração das raízes do Ginseng brasileiro utilizando SFE com cossolvente em diferentes condições, com o objetivo de avaliar o comportamento do processo através das curvas globais de extração e da quantificação do teor de beta-ecdisona.

Definir a relação S/F, onde S é a massa de solvente e F a massa de alimentação, a ser utilizada na próxima etapa deste trabalho.

- Extração com líquidos pressurizados (PLE):

Determinar as isotermas de rendimento global para uma relação pré-fixada de S/F, em três temperaturas, 333, 363 e 393 K, utilizando seis valores de pressão, 8, 10, 15, 20, 25 e 30 MPa.

Determinar o teor de beta-ecdisona e atividade antioxidante dos extratos obtidos através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrofotometria, respectivamente.

Selecionar a melhor condição de extração (temperatura, pressão e solvente), em relação ao teor do composto de interesse (beta-ecdisona) nos extratos e assim realizar o estudo da cinética de extração.

A partir dos dados cinéticos obtidos realizar um estudo da simulação do processo PLE (aumento de escala e viabilidade econômica) através do software SuperPro Designer®.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C. L. C. **Obtenção de sementes desengorduradas e de óleo rico em tocotrienóis de urucum por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processo, do aumento de escala e da viabilidade econômica.** (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 288 p. 2013.

ARAÚJO, M. K.; SELVAM, P. V. P.; SANTOS, P. H.; SANTIAGO, S. H. B. **Síntese e análise econômica de produção de biodiesel a partir de matérias-primas regionais.** 2o. Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e gás 2004.

BADALYAN, A. G.; WILKINSON, G. T.; CHUN, B.-S. Extraction of Australian ginger root with carbon dioxide and ethanol entrainer. **The Journal of supercritical fluids**, v. 13, n. 1, p. 319-324, 1998.

BRAGA, M. E. M.; LEAL, P. F.; CARVALHO, J. E.; MEIRELES, M. A. A. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6604-6611, Oct 22 2003.

BRUNNER, G. **Gas extraction.** Ed. Techniques Ingénieur, 1994.

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

COOPER, A. I. Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide. **Journal of Materials Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 207-234, 2000.

CORREA, C.; MING, L. C.; CORTEZ, D. A. G. Seasonal variation in root production and beta-ecdisone content in *pfaffia* accessions. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 393-397, Jul-Sep 2008.

CORTEZ, D. A. G.; TRUITI, M. C. T.; CORTEZ, L. E. R. Ginseng brasileiro: revisão bibliográfica. **Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 2, n. 3, p. 299-306, 1998.

DARR, J. A.; POLIAKOFF, M. New directions in inorganic and metal-organic coordination chemistry in supercritical fluids. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 2, p. 495-541, Feb 1999.

DIAZ, M. S.; BRIGNOLE, E. A. Modeling and optimization of supercritical fluid processes. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 611-618, Jan 2009.

EMATER. Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. 2011. Disponível em: < <http://www.emater.pr.gov.br/> >.

FIGUEIREDO, L. S. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 1, p. 67-72, 2004.

FLORA, J. R. V.; MCANALLY, A. S.; PETRIDES, D. Treatment plant instructional modules based on SuperPro Designer® v.2.7. **Environmental Modelling & Software**, v. 14, n. 1, p. 69-80, 1998.

FLORES, R.; CEZAROTTO, V.; BRONDANI, D.; GIACOMELLI, S. R.; NICOLOSO, F. T. Analysis of β -ecdysone from in vivo and in vitro cultured plants of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen using Thin-Layer Chromatography. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 368-371, 2009.

FRANÇA, L. F.; REBER, G.; MEIRELES, M. A. A.; MACHADO, N. T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **The Journal of supercritical fluids**, v. 14, n. 3, p. 247-256, 1999.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; RIECK, L.; DE MORAES SANTOS, C. A.; JÚNIOR, C. C.; MING, L. C.; GARCIA CORTEZ, D. A.; MARQUES, M. C. A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1167-1179, 2004.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; TWARDOWSCHY, A.; SANTOS, A. C. D.; MAYER, B.; LUIZ, A. P.; SANTOS, C. A. M. D.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. D. Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of *Pfaffia glomerata* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 468-472, 2009.

GAMSE, T. Liquid-Liquid Extraction and Solid-Liquid Extraction. **Institute of Thermal Process and Environmental Engineering, Graz University of Technology**, hal, p. 2-24, 2002.

HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 23-30, 2002.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

JULLY, T.; FOO, D.; YEE, C.; KUMARESAN, S.; AZIZ, R. A. Modeling, optimization and debottlenecking of a pharmaceutical production process utilizing a batch process simulator. **In: MSMBB Scientific Meeting 2004 Melaka**, July 2004. p.12 - 21. 2004

JÚNIOR, I. M. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial.** (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas. 75 p. 2005.

KIM, D.-H.; MOON, Y.-S.; LEE, T.-H.; JUNG, J.-S.; SUH, H.-W.; SONG, D.-K. The inhibitory effect of ginseng saponins on the stress-induced plasma interleukin-6 level in mice. **Neuroscience Letters**, v. 353, n. 1, p. 13-16, 2003.

KO, T. F.; WENG, Y. M.; CHIOU, R. Y. Y. Squalene content and antioxidant activity of Terminalia catappa leaves and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5343-5348, Sep 2002.

KOTNIK, P.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Supercritical fluid extraction of chamomile flower heads: Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 2, p. 192-198, Dec 2007.

LEAL, P. F. **Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos vegetais obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor.** (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 275 p. 2008.

LEAL, P. F.; KFOURI, M. B.; ALEXANDRE, F. C.; FAGUNDES, F. H. R.; PRADO, J. M.; TOYAMA, M. H.; MEIRELES, M. A. A. Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 38-45, Jul 2010.

LEAL, P. F.; MAIA, N. B.; CARMELLO, Q. A. C.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; MEIRELES, M. A. A. Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction (SFE): Global Yields, Chemical Composition, Antioxidant Activity, and Estimation of the Cost of Manufacturing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 4, p. 326-338, Dec 2008.

MAGALHÃES, P. M. D. Agrotecnologia para el cultivo de fafia: o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J. V. E. A. (Ed.). **Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas.** Santafé de Bogotá: Convênio Andres Bello/ CYTED, 2000. p.323-332.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S. C. S.; GÓRNIK, S.; DAGLI, M. L. Z. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life Sciences**, v. 74, p. 473-579, 2003.

MCHUGH, M.; KRUKONIS, V. Supercritical Fluid Extraction, 2nd. **Stoneham, MA: Butterworth-Heinemann**, 1994.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process design data (2001–2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, n. 4, p. 321-330, 2003.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: MARTINEZ, J. (Ed.). **Supercritical Fluid Extraction of nutraceuticals and bioactive compounds** Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2008. p.243-274.

MING, L. C.; CORREA, C. Collection of Fafia *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen in northwestern state of Parana-Brazil. In: BERNATH, J.; ZAMBORINENEMETH, E., *et al* (Ed.). **Proceedings of the International Conference on Medicinal and Aromatic Plants Possibilities and Limitations of Medicinal and Aromatic Plant Production in the 21st Century**. Leuven 1: International Society Horticultural Science, 2002. p.29-32.

MONTANARI, J. I.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle in root productivity and tenors of beta ecdisone in *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Acta Horticulturae** v. 3, n. 502, p. 125-129, 1999.

NAKAMURA, S.; CHEN, G.; NAKASHIMA, S.; MATSUDA, H.; PEI, Y.; YOSHIKAWA, M. Brazilian natural medicines. IV. New Noroleanane-type triterpene and ecdysterone-type sterol glycosides and melanogenesis inhibitors from the roots of *Pfaffia glomerata*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 690-695, 2010.

NAVIGLIO, D.; PIZZOLONGO, F.; ROMANO, R.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, B.; SANTINI, A. An innovative solid-liquid extraction technology: use of the naviglio extractor^(R) for production of lemon liquor **African Journal of Food Science**, v. 1, p. 42-50, 2007.

NETO, A. G.; COSTA, J. M. L. C.; BELATI, C. C.; VINHÓLIS, A. H. C.; POSSEBOM, L. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K.; E SILVA, M. L. A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 87-91, 2005.

NETO, A. G.; DA SILVA FILHO, A. A.; COSTA, J. M. L. C.; VINHOLIS, A. H. C.; SOUZA, G. H. B.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. E.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J. K. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. **Phytomedicine**, v. 11, n. 7-8, p. 662-665, 2004.

NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 752-764, 2010.

NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 1, p. 139-142, 1984.

OLIVEIRA, F. D. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze: the Brazilian ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 86-92, 1986.

OSORIO-TOBÓN, J. F.; MEIRELES, M. A. A. Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. **Food and Public Health**, v. 3, n. 6, p. 289-303, 2013.

POIROT, R.; PRAT, L.; GOURDON, G.; DIARD, C.; AUTRET, J. M. Optimization of batch to continuous transposition: solid-liquid extraction from plants in an industrial contactor. **Chemical & Engineering Technology**, v. 29, n. 1, p. 46-51, 2006.

PRADO, J. M. **Estudo do aumento de escala do processo de extração supercrítica em leite fixo**. (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 283 p. 2010.

QI, L.-W.; WANG, C.-Z.; YUAN, C.-S. Isolation and analysis of ginseng: advances and challenges. **Natural product reports**, v. 28, n. 3, p. 467-495, 2011.

QIAO, C.; DEN, R.; KUDO, K.; YAMADA, K.; TAKEMOTO, K.; WATI, H.; KANBA, S. Ginseng enhances contextual fear conditioning and neurogenesis in rats. **Neuroscience Research**, v. 51, n. 1, p. 31-38, 2005.

QUISPE-CONDORI, S. **Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas do processo de extração supercrítica de produtos naturais: Artemisia annua, Cordia verbenacea, Ocimum selloi e Foeniculum vulgare**. (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. p. 2005.

RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 85-93, 2002.

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

RIZVI, S. S.; BENADO, A.; ZOLLWEG, J.; DANIELS, J. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology**, v. 40, p. 55-65, 1986.

RODRIGUES, V. M.; SOUSA, E. M. B. D.; MONTEIRO, A. R.; CHIAVONE-FILHO, O.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+solute+solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, n. 1, p. 21-36, 2002.

ROSA, P.; MEIRELES, M. Fundamentals of supercritical extraction from solid matrices. **Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Application**, CRC Press–Taylor & Francis Group, Boca Raton, p. 272-288, 2009.

ROUF, S. A.; DOUGLAS, S. A.; MOO-YOUNG, M.; SCHARER, J. M. Computer simulation for large scale bioprocess design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 229-234, 2001.

SANCHES, N. R.; GALLETTO, R.; OLIVEIRA, C. E.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante de *Pfaffia glomerata* (Sprengr.) Pedersen (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 613-617, 2001.

SANTOS, D. T.; ALBARELLI, J. Q.; MEIRELES, M. A. A. Simulation of an integrated sustainable production of extract from Brazilian ginseng roots with a cogeneration plant. **CHEMICAL ENGINEERING**, v. 29, 2012.

SANTOS, D. T.; BARBOSA, D. F.; VARDANEGA, R.; ALBARELLI, J. Q.; MEIRELES, A.; ANGELA, M. Experimental and Simulation Study on Formulation of Clove Essential Oil Products Using Alternative Surfactant. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 112-122, 2013.

SANTOS, D. T.; BARBOSA, D. F.; VARDANEGA, R.; SGOMES, M.; THEREZA, M.; MEIRELES, A.; ANGELA, M. Novel Method to Produce Emulsions Containing Essential Oils from Saponin-Rich Pressurized Aqueous Plant Extracts. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 93-99, 2013.

SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Optimization of bioactive compounds extraction from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO₂. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, p. 398-406, Jul 2011.

SANTOS, D. T.; VARDANEGA, R.; ALBARELLI, J. Q.; ENSINAS, A. V.; MARÉCHAL, F.; MEIRELES, M. A. A. Energy Consumption Versus Antioxidant Activity of Pressurized Fluid Extracts from *Pfaffia glomerata* Roots. **CHEMICAL ENGINEERING**, v. 35, 2013.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; DE OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.

SILVA, D. C. M. N. **Extração supercrítica de plantas aromáticas e medicinais (Lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), Quebra-pedra (*Phylanthus amarus*) e Ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*)): Dados experimentais, composição e avaliação da atividade biológica** (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 241 p. 2008.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SOUSA, E. M. B. D.; MARTÍNEZ, J.; CHIAVONE-FILHO, O.; ROSA, P. T. V.; DOMINGOS, T.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of volatile oil from *Croton zehntneri*

Pax et Hoff with pressurized CO₂: solubility, composition and kinetics. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 3, p. 325-333, 2005.

SRINIVAS, K.; KING, J. W.; MONRAD, J. K.; HOWARD, L. R.; ZHANG, D. PRESSURIZED SOLVENT EXTRACTION OF FLAVONOIDS FROM GRAPE POMACE UTILIZING ORGANIC ACID ADDITIVES. **Italian Journal of Food Science**, v. 23, n. 1, p. 90-105, 2011.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of separation science**, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

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

TAKEUCHI, T. M.; PEREIRA, C. G.; BRAGA, M. E. M.; MARÓSTICA, J., M. R.; LEAL, P. F.; MEIRELES, M. A. A. Low pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. In: MEIRELES, M. A. A. (Ed.). **Extracting Bioactive Compounds for Food Products**. Boca Raton, USA: CRC Press/ Taylor & Francis Group, 2009. p.137-218

UQUICHE, E.; DEL VALLE, J. M.; ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annum* L.) oleoresin. **Journal of Food Engineering**, v. 65, n. 1, p. 55-66, Nov 2004.

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

VEGGI, P. C. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: Estudo experimental e simulação de processos**. (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 165 p. 2009.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen-Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 46-49, 2003.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERE, M. A.; MARQUES, L. C. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius- Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 2, p. 7-19, 2004.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

WIJNGAARD, H. H.; BALLAY, M.; BRUNTON, N. The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids. **Food Chemistry**, n. 0, 2011.

WU, J. Y.; WONG, K.; HO, K. O.; ZHOU, L. G. Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 133-138, 2005.

ZAIBUNNISA, A. H.; NORASHIKIN, S.; MAMOT, S.; OSMAN, H. An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (*Curcuma domestica*) using pressurised liquid extraction (PLE). **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 233-238, 2009.

ZHENG, Y.; LIU, B.; CHEN, M.; CHEN, T. Supercritical fluid extraction of ecdysterone from the roots of *Achyranthes bidentata* BL. **Journal Separation Science**, v. 31, p. 1393-1398, 2008.

ZIMMER, A. R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V. L.; GOSMANN, G. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 2, p. 450-453, 2006.

**CAPÍTULO 2 – SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF BETA-
ECDYSONE FROM BRAZILIAN GINSENG (*Pfaffia glomerata*) ROOTS**

Isabel C. N. Debien e M. Angela A. Meireles

Artigo publicado no periódico *Food and Public Health* 4(2), 67-73 (2014)

ISSN: 2162-9412

AVISO DE DIREITO DE AUTOR

Este artigo é de propriedade da *Scientific & Academic Publishing*. Você pode baixar cópia do mesmo em um único computador, para fins pessoais ou não comerciais de uso temporário, levando em conta os direitos de autor e outros avisos da marca. No entanto, nenhum conteúdo do artigo baixado pode ser copiado, reproduzido, distribuído, republicado ou postado. Também é proibida a modificação do conteúdo do artigo para qualquer propósito, o que constitui uma violação dos direitos autorais da *Scientific & Academic Publishing* e / ou seus fornecedores.

Supercritical Fluid Extraction of Beta-ecdysone from Brazilian Ginseng (*Pfaffia glomerata*) Roots

Isabel C. N. Debien, M. Angela A. Meireles *

LASEFI/DEA (Department of Food Engineering) / FEA (School of Food Engineering) / UNICAMP (University of Campinas),
Rua Monteiro Lobato, 80; Campinas, SP; CEP: 13083-862, Brazil

Abstract Ecdysteroids have been found in a variety of plants and have several valuable biological properties. Beta-ecdysone is the major biologically active ecdysteroid that can be isolated from *Pfaffia glomerata* roots. *Pfaffia glomerata* is a medicinal plant known in Brazil as “Brazilian ginseng,” and this plant has been used as a substitute for “Asian” ginseng due their similar morphologies and bioactive properties. In this work, supercritical fluid extraction (SFE) using carbon dioxide (CO₂) was used to obtain beta-ecdysone-rich extracts from Brazilian ginseng roots. The effects of pressure (20 and 30 MPa) and cosolvent amount (10, 15, 75 and 90% of Ethanol, EtOH) on the behavior of the overall extraction curve (OEC) and beta-ecdysone content were studied. Larger amounts of beta-ecdysone were obtained in shorter processing times using CO₂: EtOH (85:15, v/v) as the extracting solvent at 20 MPa. Higher amounts of EtOH in the solvent mixture leads to increased extraction yield as well as increased beta-ecdysone content.

Keywords *Pfaffia glomerata*, Brazilian ginseng roots, Supercritical fluid extraction, Carbon dioxide, Ethanol, Beta-ecdysone

1. Introduction

Ecdysteroids are steroid hormones that are found in insects. Ecdysteroids have also been discovered in plants, and this discovery has initiated fruitful research. Thus far, ecdysteroids have been detected in over 120 plant families. In plants, the amount of ecdysteroids is an order of magnitude higher than in insects [1].

Plants and insects rarely have the same ecdysteroids; therefore, these bioactive compounds play different roles depending on their source. In insects, it is known that these steroids are present at all stages of development, regulating many biochemical and physiological process, whereas in plants, the function of ecdysteroids is still unknown. Ecdysteroids from plants, known as phytoecdysteroids, are apparently non-toxic to mammals and may have a number of beneficial pharmacological and medicinal applications [2]. The presence of phytoecdysteroids has been found in only approximately 2% of the world’s flora; approximately 5-6% of the species that have been tested have phytoecdysteroids, making up approximately 0.1% of the plant’s dry mass. Among the phytoecdysteroids, beta-ecdysone (Figure 1) is recognized as the major biologically active ecdysteroid in most invertebrate systems [3].

Beta-ecdysone is the major biologically active ecdysteroid isolated from *Pfaffia glomerata* roots, a species that belongs to the Amaranthaceae family [4]. *Pfaffia glomerata* is a medicinal plant known in Brazil as “Brazilian ginseng” and as “Suma” elsewhere; it has been used as a substitute for “Asian” ginseng due their similar morphologies and bioactive properties. However, “Asian” and “Brazilian” ginseng have different compositions, and ecdysteroids are present only in the latter genus. Beta-ecdysone is used as a good chemical marker for raw material quality due its adaptogen effect [5]. The term adaptogen is used to classify a group of substances that can improve the body’s nonspecific resistance after being exposed to various stressing factors, promoting a state of adaptation to the exceptional situation [6].

Several pharmacological and medicinal studies have demonstrated that Brazilian ginseng roots (BGR) extracts have potential analgesic, anti-inflammatory [7], gastroprotective [8], antinociceptive [9], anti-glycemic [10] and anti-microbial [11] properties. Additional studies have shown that BGR extracts may also act as a melanogenesis inhibitor [12] and as a central nervous system depressant [13]. Therefore, considering the health-promoting attributes of BGR extracts, their use as a food additive has great potential for nutraceutical food production. Nonetheless, beta-ecdysone might have estrogenic properties or activities and can cause an increase in estrogen production as this plant has been used traditionally to regulate menstrual processes, as well as to treat menopause and other hormonal disorders

* Corresponding author:
maameireles@gmail.com (M. Angela A. Meireles)
Published online at <http://journal.sapub.org/fph>
Copyright © 2014 Scientific & Academic Publishing. All Rights Reserved

[14]. There are some studies of beta-ecdysone showing significant anabolic effects [15, 16]. It is not a testosterone booster, but has a potential as an ergogenic aid. All those studies that report this benefit has limited details available to evaluate the experimental design. Thus is early to tell whether beta-ecdysone serve as safe and effective nutritional supplement for athletes [17]. Nevertheless, it is necessary more studies about anabolic and toxicity effects of beta-ecdysone.

There were reported two weaknesses of BGR, the BGR powder can cause asthmatic allergic reactions if inhaled, thus when handling or preparing the BGR avoid inhalation of the powder. The other weakness is that the ingestion of large amounts of saponins (naturally occurring chemicals in BGR) has shown to sometimes cause mild gastric disturbances including nausea and stomach cramping [4]. Therefore the dosages control is so important.

Extracts from several botanic matrices have found use in the health and food fields, mainly due the antioxidant properties. These botanic matrices include rice bran [18] [14], annatto [19], turmeric [20] and also BGR [21].

In addition, some Brazilian pharmaceutical manufacturers that produce phytopharmaceuticals and food supplements containing micronized roots and/or extracts of BGR report beta-ecdysone as the active compound [22].

Commercially, extracts from BGR-containing bioactive compounds are obtained by conventional solid liquid extraction methods, which use large quantities of extracting solvents [23]. Currently, more environmentally friendly methods, such as supercritical fluid extraction (SFE), are preferred. SFE has been successfully used to extract several bioactive compounds from different plants [24].

SFE using carbon dioxide (CO₂) as a solvent is an attractive alternative method for compound recovery because it is an environment safe process that yields high quality products. SFE has several advantages over conventional methods. One of the main characteristics of SFE is that changing the operating conditions allows the selective recovery of compounds without toxic residues [25].

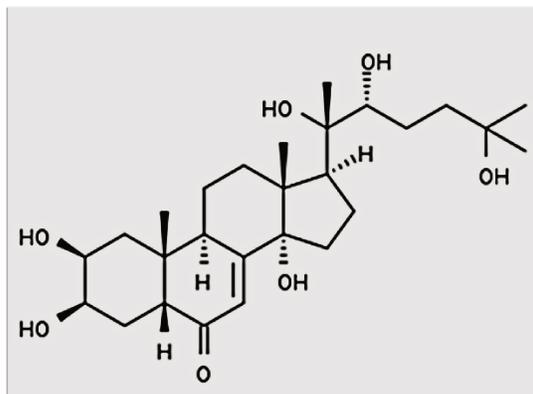


Figure 1. Chemical structure of beta-ecdysone

Carbon dioxide, even at high temperatures and pressures, has limited ability to dissolve polar molecules; however, the solubility of many compounds may be increased by adding miscible polar solvents, called modifiers or cosolvents, to CO₂ [26]. The limitations of pure supercritical CO₂ for extracting antioxidants from BGR and other ginseng species have already been demonstrated [27]. The addition of modifiers (methanol, dimethylsulfoxide or ethanol) to supercritical CO₂ greatly enhanced extraction yield compared to that obtained using pure CO₂. The use of pure CO₂ yielded negligible quantities of saponins, the most important antioxidant compounds class present in these species [28]. When high amounts of modifier are added, the formation of a gas-expanded liquid is observed. This extracting solvent combines the solvation properties of typical liquids and the transport properties of supercritical fluids into an intermediate process between SFE and Pressurized Liquid Extraction (PLE) called pressurized fluid extraction (PFE) [29].

The aim of this work was study the extraction of beta-ecdysone from BGR by SFE using ethanol as the cosolvent. The parameters evaluated were pressure (20 and 30 MPa) and cosolvent amount (10, 15, 75 and 90% ethanol) at a constant temperature of 333 K. The results were evaluated based on the behavior of the overall extraction curve (OEC) and the beta-ecdysone content in the extracts.

2. Materials and Methods

2.1. Raw Material Characterization and Preparation

BGR were cultivated in the experimental field of CPQBA (Campinas, Brazil) and were collected on November 17, 2008, after 7 years of cultivation. BGR were washed and dried in a forced air circulation dryer at 313 K for 5 days. The dried roots (8.9% moisture) were then comminuted in a pulse mill (Marconi, model MA 340, Piracicaba, Brazil) for a few seconds. Next, larger particles were milled a second time with a knife mill (Tecnal, model TE 631, Piracicaba, Brazil) for 2 s at 18,000rpm. Particles were then separated by size using sieves (Series Tyler, W.S. Tyler, Wheeling, USA). The milled BGR were stored in a freezer (Metalfrío, model DA 420, São Paulo, Brazil) at 263 K. For extraction assays, particles 8 μm in diameter, determined according to the ASAE methodology [30], were used. The moisture content of the dried roots was determined by the AOAC method (Method 4.1.03) [31].

2.2. Experimental Design

The temperature for all assays was 333 K. The effects of the following parameters on the OECs and beta-ecdysone content in the BGR extracts were evaluated: pressure (20 and 30 MPa) and solvent mixture of CO₂ and ethanol (EtOH) (% v/v). The experimental extraction conditions that were evaluated are shown in Table 1.

Table 1. Experimental extraction conditions

Assay	Pressure (MPa)	CO ₂ : EtOH (% v/v)
1	30	85:15
2	20	85:15
3	20	25:75
4	20	10:90

2.3. Extraction Procedure

A kinetic study was conducted using the SFE system shown in Figure 2 and described in detail Veggi et al. [32]. In short, the 415 cm³ extraction cell was heated by a jacket connected to a thermostatic bath until the desired temperature was reached. The supercritical solvent, CO₂, was pumped by a pneumatic pump (Maximator, model PP 111-VE MBR, Nordhausen, Germany) and the cosolvent, EtOH, was pumped by an HPLC pump (Thermoseparation Products, Model Consta Metric 3200 P/F, Florida, USA). Approximately 20 grams of BGR was placed in the extraction cell. The sample occupied approximately 4.4% of the cell's volume, and the empty space of the cell was filled with a Teflon column. After pressurization, the mixture of BGR, supercritical carbon dioxide and EtOH was kept

statically at the desired pressure for 30 minutes (static time). Thereafter, the block valve (Autoclave engineers, Model 10V2071 15000psi, Erie, USA) was opened, and the pressure was kept constant with the help of a backpressure valve (TESCOM model 2617-6-1-2-2-065, Elk River, USA) and a heated micrometric valve (Autoclave engineers, Modelo 10VRMM 11000PSI Erie, USA).

The flow rate of the supercritical solvent (CO₂) was fixed in 0.004 m³.min⁻¹ (approximately 1.11×10⁻⁴ kg.s⁻¹, considering a CO₂ density of 1.67 kg.m⁻³ at room temperature). The flow rate of cosolvent (EtOH) was calculated according to the amount desired in the solvent mixture (CO₂: EtOH %, v/v). Extracts were collected into glass vessels immersed in an ice bath at ambient pressure. Extract samples were collected at pre-determined time intervals until the end of the extraction. EtOH in the extracts was eliminated using a vacuum rotary evaporator (Heidolph, model Laborota 4001 WB, Viertrieb, Germany) at 323 K. The yield was calculated as the ratio between the total mass of extract and the initial mass of raw material (dry basis, d.b.) fed into the extractor. The OEC obtained was fitted to a spline of three straight lines according to Jesus et al [18].

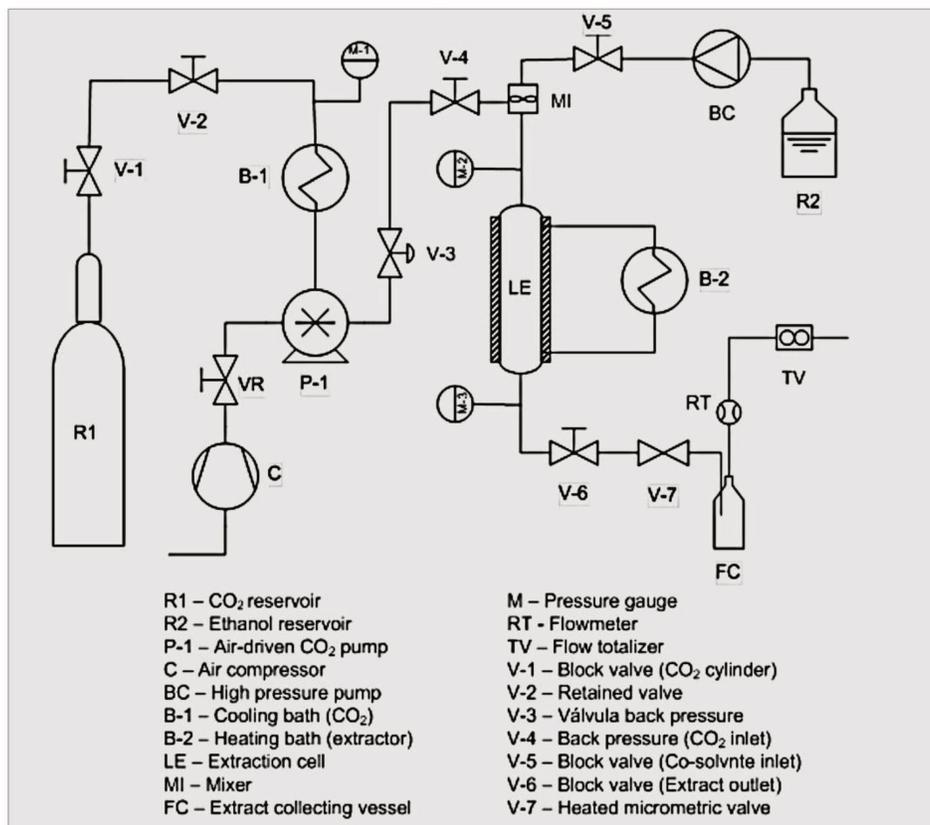


Figure 2. Schematic diagram of the supercritical CO₂ extraction unit (adapted to [28])

2.4. Beta-ecdysone Quantification

Beta-ecdysone quantification was performed according to the methodology described by Leal *et al.* [26] with modifications. The HPLC Agilent 1260 (Santa Clara, USA) system that was used included a quaternary pump (G1311A), photodiode array detector (G4214B), column oven (G1311A) and automatic injector (G1329B). A Zorbax Eclipse Plus column (C18, 5 μm , 150 \times 4.6 mm, Agilent, Santa Clara, USA) at 323 K was used. The mobile phases were water with acetic acid 0.1% (solvent A) and acetonitrile with acetic acid 0.1% (solvent B). Separation was achieved using a linear gradient of solvent B from 0 to 100% in 15 min and then from 100 to 0% in 10 min. Finally, solvent A was maintained at 100% for 5 min at a flow rate of 1.2 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Peaks were identified by comparing their retention times and UV-vis spectra with those of known standards. Quantification was based on peak area measurements at 246 nm. The linearity of the method was determined using a 20-hydroxyecdysone (beta-ecdysone) standard ($\geq 93\%$, Sigma). Dried extracts were diluted in 80% methanol to obtain a solution with a concentration of 10 $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, and the solution was filtered through a 0.45- μm membrane (Millipore) prior to injection.

3. Results and Discussion

The kinetics of the SFE process can be characterized empirically by OECs, and kinetic parameters can be calculated by fitting the experimental data to a linear spline [18]. Figures 3, 4, 5 and 6 show the OECs of BGR for different conditions. The three periods of a typical OEC [24] can be observed in the figures. The first line represents the constant extraction rate (CER) period, while the second line represents the falling extraction rate (FER) period. The third line represents the diffusion-controlled rate (DC) period. The duration of the CER period (t_{CER}) is determined by the interception of the first and second lines, and the duration of the FER period (t_{FER}) is determined by the interception of the second and third lines [18].

From Figure 3, the duration of the CER period at 30 MPa was 114 minutes, while the duration of the FER period was 254 minutes. The total yield of BGR extract obtained for the OEC was approximately 0.90% (d.b.) after 390 minutes of extraction. At the end of the CER period, approximately 60% of the total extraction yield was obtained. The DC period was not reached. For beta-ecdysone, 88% of the total beta-ecdysone yield was obtained at the end of the CER period, and the DC period was reached. Therefore, the process yield varied approximately from 95 – 100%.

From Figure 4, the duration of the CER at 20 MPa was 56 minutes, and the duration of the FER period was 153 minutes. The total BGR extract yield was approximately 1.03% (d.b.) after 390 minutes of extraction. At the end of the CER period, approximately 50% of the total extraction yield was obtained. For beta-ecdysone, 75% of the total beta-ecdysone was recovered at the end of the CER period. After approximately 150 min, when t_{FER} was reached, all of

the beta-ecdysone was recovered.

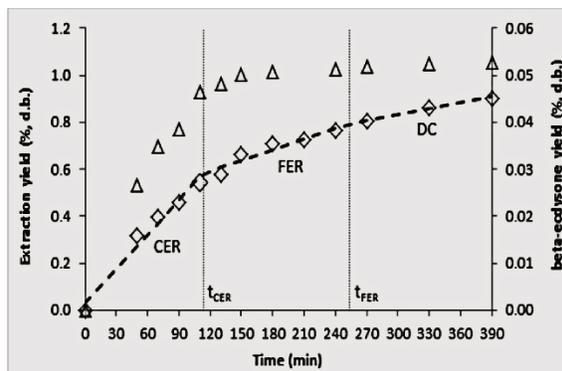


Figure 3. Overall extraction curve of BGR extracts (\diamond) and beta-ecdysone (Δ) obtained with CO_2 : EtOH (85:15, v/v) as the extracting solvent at 30 MPa and 333 K. The dotted line denotes the calculated yield using a spline of three straight lines. (CER: constant extraction rate period; FER: falling extraction rate period; DC: diffusional controlled rate period)

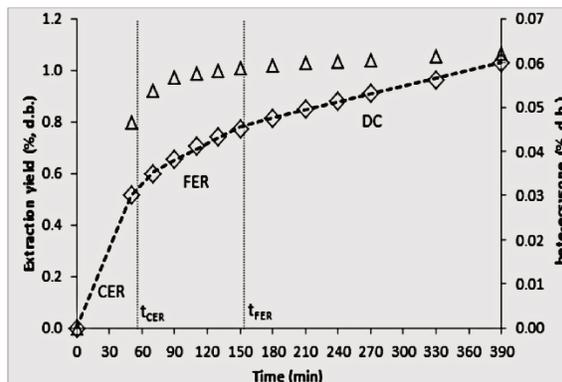


Figure 4. Overall extraction curve of BGR extracts (\diamond) and beta-ecdysone (Δ) obtained with CO_2 : EtOH (85:15, v/v) as the extracting solvent at 20 MPa and 333 K. The dotted line denotes the calculated yield using a spline of three straight lines. (CER: constant extraction rate period; FER: falling extraction rate period; DC: diffusional controlled rate period)

By comparing the behavior at 30 and 20 MPa, it can be observed that larger amounts of beta-ecdysone were obtained with a shorter processing time at 20 MPa. For example, after 1 h of processing at 30 MPa, 0.035% of beta-ecdysone was recovered. However, after 1 h of processing at 20 MPa, 0.06% of beta-ecdysone was recovered.

Figures 5 and 6 show the OECs of BGR extracts and beta-ecdysone obtained at 333 K and 20 MPa using the solvent mixtures CO_2 :EtOH (25:75, v/v) and CO_2 :EtOH (10:90, v/v) as extracting solvents, respectively. The dotted line denotes the calculated yield using a spline of three straight lines.

For the OEC obtained using CO_2 : EtOH (25:75, v/v), the duration of the CER period was 42 minutes, and the duration of the FER period was 72 minutes. The total extraction yield was approximately 2.35% (d.b.) after 90 minutes. In the CER period, approximately 64% of the total extraction yield and 61% of the total beta-ecdysone yield

were obtained. For this solvent mixture, the DC period was not observed for extraction yield but was reached after 90 min for beta-ecdysone content. 5.

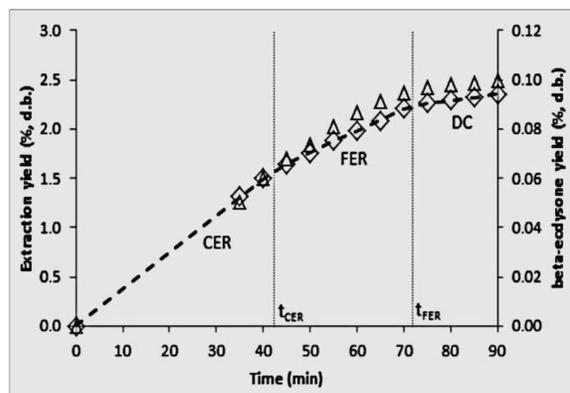


Figure 5. Overall extraction curve of BGR extracts (\diamond) and beta-ecdysone (Δ) obtained with CO_2 :EtOH (25:75, v/v) as the extracting solvent at 20 MPa and 333 K. The dotted line denotes the calculated yield using a spline of three straight lines. (CER: constant extraction rate period; FER: falling extraction rate period; DC: diffusional controlled rate period)

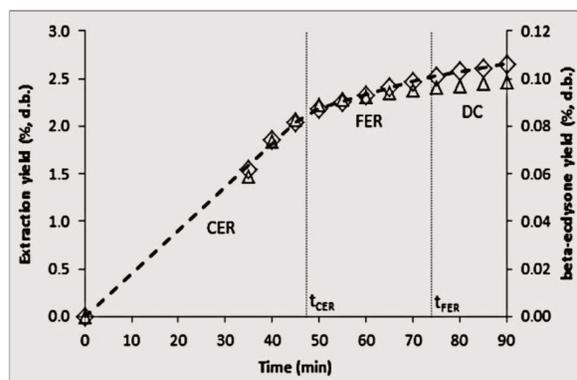


Figure 6. Overall extraction curve of BGR extracts (\diamond) and beta-ecdysone (Δ) obtained with CO_2 : EtOH (10:90, v/v) as the extracting solvent at 20 MPa and 333 K. The dotted line denotes the calculated yield using a spline of three straight lines. (CER: constant extraction rate period; FER: falling extraction rate period; DC: diffusional controlled rate period)

For the OEC determined using the solvent mixture CO_2 : EtOH (10:90, v/v), the duration of the CER and FER periods were 47 and 74 min, respectively. The total extraction yield was approximately 2.65% (d.b.) after 90 minutes, and 82% of the total extraction yield was obtained during the CER period. For beta-ecdysone content, the DC period was reached. During the CER period, approximately 89% of the total beta-ecdysone was recovered.

By comparing extraction processes run for the same amount of time, it can be observed that a higher proportion of EtOH in the mixture leads to a higher extraction yield. A higher proportion of EtOH results in a higher solvent mixture polarity, suggesting that BGRs are rich in polar compounds.

Leal et al. [26] were able to obtain a beta ecdysone yield of 0.013% (d.b.), 28 times higher than the yield reported in Patent US6224872 [30]. In this study, a yield of approximately 0.1% was obtained using a higher amount of EtOH, and this yield is 8-fold higher than the yield obtained by Leal et al [26]. Thus, EtOH was shown to be more selective for beta-ecdysone recovery than CO_2 .

The t_{CER} is usually a first indication of how long an industrial extraction batch will take [34]. To facilitate comparison of these processes in terms of t_{CER} , the results obtained in this study are summarized in Table 2. For the same solvent mixture of CO_2 : EtOH (% v/v), pressure was not found to affect extraction yield and beta-ecdysone content. A decrease in pressure leads to a decrease in t_{CER} , however. In addition, a higher proportion of EtOH in the mixture leads to an increase in extraction yield and beta-ecdysone content. However, the relative amount of beta-ecdysone in the extract decreased with higher amounts of EtOH. The target compound is therefore less concentrated in the extract obtained with higher amounts of EtOH due to the extraction of other compounds along with the target compound

Table 2. Comparison between extraction yield, S/F and beta-ecdysone content of each experimental condition at t_{CER}

Pressure (MPa)	CO_2 : EtOH (% v/v)	t_{CER} (min)	Extraction yield (%)	S/F	Beta-ecdysone content	
					(mg/g of extract)	(mg/g of BGR)
30	85:15	114	0.54	35.25	85.58	0.47
20	85:15	56	0.52	10.21	90.55	0.47
20	25:75	42	1.50	9.78	40.30	0.61
20	10:90	47	2.19	22.12	40.57	0.90

4. Conclusions

Supercritical fluid extraction with carbon dioxide and ethanol as a cosolvent is an alternative to organic solvent extraction for generating beta-ecdysone-rich extracts from BGR. Larger amounts of beta-ecdysone were obtained with shorter processing times using CO₂: EtOH (85:15, v/v) as the extracting solvent at 20 MPa. A higher proportion of EtOH in the mixture leads to an increase in extraction yield and an increase in beta-ecdysone content relative the raw material amount. These results show that EtOH is more selective for beta-ecdysone recovery than CO₂ for beta-ecdysone extraction from BGR.

Among the extraction conditions studied, the best condition in terms of beta-ecdysone recovery from BGR was 20 MPa with CO₂: EtOH (10:90, v/v) as the extracting solvent. These conditions produce approximately 82% of the total extraction yield and 89% of the total beta-ecdysone content after approximately one hour of extraction.

A scale-up and optimization study could further shorten the process time and increase yields of bioactive compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

Isabel C. N. Debien thanks CNPq for the Ph.D. assistantship (151165/2010 6). M. A. A. Meireles acknowledges the productivity grant (301301/2010 7) from CNPq. The authors acknowledge the financial support from CNPq and FAPESP (2009/17234-9; 2012/10685-8).

REFERENCES

- [1] M. Báthori, "Purification and characterization of plant ecdysteroids of *Silene* species", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol.17, no.6, pp.372-383, 1998.
- [2] R. A. Festucci-Buselli, L. A. Contim, L. C. A. Barbosa, J. J. Stuart, R. F. Vieira, W. C. Otoni, "Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol.20, no.4, pp.305-311, 2008.
- [3] L. Dinan, "Phytoecdysteroids: biological aspects", *Phytochemistry*, vol.57, no.3, pp.325-339, 2001.
- [4] Y. Shiobara, S.-S. Inoue, K. Kato, Y. Nishiguchi, Y. Oishi, N. Nishimoto, F. de Oliveira, G. Akisue, M. K. Akisue, G. Hashimoto, "A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*", *Phytochemistry*, vol.32, no.6, pp.1527-1530, 1993.
- [5] A. R. Zimmer, F. Bruxel, V. L. Bassani, G. Gosmann, "HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.40, no.2, pp.450-453, 2006.
- [6] F. R. Mendes, "Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.21, no.4, pp.754-763, 2011.
- [7] A. G. Neto, J. M. L. C. Costa, C. C. Belati, A. H. C. Vinholis, L. S. Possebom, A. A. Da Silva Filho, W. R. Cunha, J. C. T. Carvalho, J. K. Bastos, M. L. A. e Silva, "Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen", *Journal of Ethnopharmacology*, vol.96, no.1-2, pp.87-91, 2005.
- [8] C. S. Freitas, C. H. Baggio, J. E. Da Silva -Santos, L. Rieck, C. A. de Moraes Santos, C. C. Júnior, L. C. Ming, D. A. Garcia Cortez, M. C. A. Marques, "Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, *Amaranthaceae*, in rats", *Life Sci.*, vol.74, no.9, pp.1167-1179, 2004.
- [9] C. S. Freitas, C. H. Baggio, A. Twardowschy, A. C. d. Santos, B. Mayer, A. P. Luiz, C. A. M. d. Santos, M. C. A. Marques, A. R. S. d. Santos, "Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of *Pfaffia glomerata* in mice", *Journal of Ethnopharmacology*, vol.122, no.3, pp.468-472, 2009.
- [10] N. R. Sanches, R. Galletto, C. E. Oliveira, R. B. Bazotte, D. A. G. Cortez, "Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (*Amaranthaceae*)", *Acta Scientiarum*, vol.23, no.2, pp.613-617, 2001.
- [11] A. G. Neto, A. A. da Silva Filho, J. M. L. C. Costa, A. H. C. Vinholis, G. H. B. Souza, W. R. Cunha, M. L. A. E. Silva, S. Albuquerque, J. K. Bastos, "Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (*Amaranthaceae*) roots", *Phytomedicine*, vol.11, no.7-8, pp.662-665, 2004.
- [12] S. Nakamura, G. Chen, S. Nakashima, H. Matsuda, Y. Pei, M. Yoshikawa, "Brazilian natural medicines. IV. New Noroleanane-type triterpene and ecdysterone-type sterol glycosides and melanogenesis inhibitors from the roots of *Pfaffia glomerata*", *Chem. Pharm. Bull.*, vol.58, no.5, pp.690-695, 2010.
- [13] F. de-Paris, G. Neves, J. B. Salgueiro, J. Quevedo, I. Izquierdo, S. M. K. Rates, "Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (*Amaranthaceae*) in rodents", *Journal of Ethnopharmacology*, vol.73, no.1-2, pp.261-269, 2000.
- [14] Leslie Taylor, *Herbal secrets of the rainforest: the healing power of over 50 medicinal plants you should know about*, Prima Pub., 1998.
- [15] NS Chermnykh, NL Shimanovskii, GV Shutko, VN Syrov, "The action of methandrostenolone and ecdysterone on the physical endurance of animals and on protein metabolism in the skeletal muscles", *Farmakologiya i toksikologiya*, vol.51, no.6, pp.57-60, 1987.
- [16] Michael D Scheiber, Robert W Rebar, "Isoflavones and postmenopausal bone health: a viable alternative to estrogen therapy?", *Menopause*, vol.6, no.3, pp.233-241, 1999.
- [17] Tyler LeBaron, *Testosterone Booster Recommendation Report*. Muscle Feast, 2011.
- [18] Susana P. Jesus, Mauricio N. Calheiros, Haiko Hense, M. Angela A. Meireles, "A Simplified Model to Describe the Kinetic Behavior of Supercritical Fluid Extraction from a Rice Bran Oil Byproduct", *Food and Public Health*, vol. 3, no. 4, 215-222, 2013.
- [19] Moyses N. Moraes, Giovani L. Zabet, Juliana M. Prado, M. Angela A. Meireles, "Obtaining Antioxidants from Botanic Matrices Applying Novel Extraction Techniques", *Food and*

- Public Health, vol.3, no.4, pp.195-214, 2013.
- [20] J. Felipe Osorio-Tobón, M. Angela A. Meireles, "Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids", Food and Public Health, vol.3, no.6, pp.289-303, 2013.
- [21] Diego T. Santos, Dayane F. Barbosa, Ketllen Broccolo, M. Thereza M. S. Gomes, Renata Vardanega M. Angela A. Meireles, "Pressurized organic solvent extraction with on-line particle formation by supercritical anti solvent processes", Food and Public Health, vol.2, no.6, pp.231-240, 2012.
- [22] R. Flores, D. Brondani, Jr., V. Cezarotto, Jr., S. Giacomelli, F. Nicoloso, "Micropropagation and β ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*", In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant, vol.46, no.2, pp.210-217, 2010.
- [23] P. Matsuzaki, G. Akisue, S. C. S. Oloris, S. Górniak, M. L. Z. Dagli, "Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form", Life Sci., vol.74, pp.473-579, 2003.
- [24] M. Angela A. Meireles, Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants, in Supercritical Fluid Extraction of nutraceuticals and bioactive compounds J. Martinez. CRC Press - Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2008.
- [25] Camila G. Pereira, M. Angela A. Meireles, "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives", Food Bioprocess Technol., vol.3, no.3, pp.340-372, 2010.
- [26] Patrícia F. Leal, Marina B. Kfourri, Fábio C. Alexandre, Fábio H. R. Fagundes, Juliana M. Prado, Marcos H. Toyama, M. Angela A. Meireles, "Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity", J. Supercrit. Fluids, vol.54, no.1, pp.38-45, 2010.
- [27] H.-C. Wang, C.-R. Chen, C. J. Chang, "Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides", Food Chem., vol.72, no.4, pp.505-509, 2001.
- [28] J. A. Wood, M. A. Bernards, W.-k. Wan, P. A. Charpentier, "Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide", The Journal of Supercritical Fluids, vol.39, no.1, pp.40-47, 2006.
- [29] Diego T. Santos, Renata Vardanega, Juliana Q. Albarelli, Adriano V. Ensinas, François Maréchal, M. Angela A. Meireles, "Energy Consumption Versus Antioxidant Activity of Pressurized Fluid Extracts from *Pfaffia glomerata* Roots", CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS, vol.35, 2013.
- [30] ASAE, Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving, in American Society of Agricultural Engineers Standards, Vol. S319.3, 1998.
- [31] AOAC, Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- [32] P. riscilla C. Veggi, Juliana M. Prado, Giovana A. Bataglion, Marcos N. Eberlin, M. Angela A. Meireles, "Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction", The Journal of supercritical fluids, DOI [10.1016/j.supflu.2014.02.016](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.016).
- [33] T. Shibuya, T. Ario, S. Fukuda, "Composition ", **US Patent No. 6224872, 2001**.
- [34] M. Angela A. Meireles, "Supercritical extraction from solid: process design data (2001-2003)", Current Opinion in Solid State and Materials Science, vol.7, no.4, pp.321-330, 2003.

**CAPÍTULO 3 – PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION AS A PROMISING
ECONOMICALLY FEASIBLE TECHNIQUE FOR THE RECOVERY OF
BETA-ECDYSONE FROM BRAZILIAN GINSENG (*Pfaffia glomerata*) ROOTS**

Isabel C. N. Debien, Renata Vardanega, Diego T. Santos e M. Angela A. Meireles

Artigo submetido ao periódico *Separation Science and Technology*.

ISSN: 0149-6395

Abstract

In this work, pressurized liquid extraction (PLE) was used to obtain beta-ecdysone-rich extracts from Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) roots. The effects of temperature (333 – 393 K), pressure (8 – 30 MPa) and extracting solvent (Ethanol (EtOH) and Ethanol:Water (EtOH:H₂O) 80:20 v/v) on the global extraction yield, beta-ecdysone content and antioxidant activity of extracts were studied. Global extraction yield increased with increased temperature (333 – 393 K) up to 25 % (dry basis). As the temperature was increased, the selectivity of the extracting solvent decreased. The use of EtOH:H₂O (80:20 v/v) as the extracting solvent produced extracts with the highest antioxidant activity. Beta-ecdysone recovery was maximized when EtOH was used, but pressure did not affect recovery. From the overall extraction curve obtained using EtOH as extracting solvent at 8 MPa and 393 K, it was determined that in the first hour of extraction, approximately 70 % of the total yield and 74 % of the total beta-ecdysone mass is obtained. The cost of manufacturing (COM) was evaluated at the kinetic condition that yielded the highest beta-ecdysone content; increases in extractor capacity were found to significantly decrease the COM.

Keywords: *Pfaffia glomerata*, Brazilian ginseng roots, pressurized liquid extraction, bioactive compounds, antioxidant activity, beta-ecdysone

1. Introduction

Plants have been the basis of traditional medicines for thousands of years and continue to be considered valuable raw materials for medicines ^[1]. Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) is a medicinal plant that has been commercialized as a substitute for plants of the *Panax* genus due to its similar morphology and bioactive properties. *Pfaffia glomerata* is the most important species of the plants known as Brazilian ginseng because *P. glomerata* possesses ecdysteroids ^[2]. The main ecdysteroid of *P. glomerata* is beta-ecdysone, which exhibits an adaptogen effect and is used as a marker to differentiate among species from the *Pfaffia* genus ^[3,4].

Commercially, extracts from Brazilian ginseng roots (BGR) containing bioactive compounds are obtained using conventional solid-liquid extraction methods or low-pressure solvent extraction (LPSE), which uses large quantities of extracting solvents. Currently, more environmentally friendly methods such as pressurized liquid extraction (PLE) are preferred. PLE has been successfully used to extract several bioactive compounds from different plants ^[5]. A major advantage of PLE over conventional solvent extraction methods such as LPSE, which are conducted at atmospheric pressure, is that the pressurized solvents used in PLE remain in a liquid state well above their boiling points, thereby allowing for high-temperature extraction ^[6]. PLE can be performed at a wide range of conditions in the compressed liquid region. In this region, liquids are highly incompressible, and when solvents are subjected to pressure changes at a constant temperature, their density and solvation power are not significantly affected. Increased temperatures improve the extraction efficiency by enhancing the mass transfer and diffusion rates ^[7]. Despite these advantages, the use of high temperatures is not always

recommended. High temperatures are especially undesirable for starch-rich plants due to gelatinization and other reactions that can occur at high temperatures.

PLE is an attractive alternative to conventional extraction methods because it allows for fast extraction and reduced solvent consumption. PLE enables the rapid extraction of analytes in a closed and inert environment under high pressures (generally, not higher than 30 MPa) and temperatures in the range of 298–473 K, depending on the solvent. Extracting solvents that are inefficient at low temperatures may be much more efficient at the elevated temperatures used in PLE ^[8].

PLE has been successfully used for the extraction of several bioactive compounds such as flavonoids ^[9], phenolic compounds ^[10], antioxidant compounds ^[11] and other compounds ^[12, 13] from natural matrices. To extract anthocyanin and phenolic compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins, PLE was determined to be the most efficient extraction technique in terms of the global extraction yield, total phenolic compounds and anthocyanins obtained and economic feasibility ^[14, 15].

The aim of this work was to study the extraction of beta-ecdysone from BGR by PLE. The parameters evaluated were temperature, pressure and extracting solvent type. The results were evaluated based on the global extraction yield (X_0), content of beta-ecdysone, antioxidant activity and cost of manufacturing (COM).

2. Material and Methods

2.1. Raw material characterization and preparation

BGR characterization and preparation was conducted according to described by Debien and Meireles ^[16].

The moisture content of the dried roots was 10.8 %, determined according to AOAC method (Method 4.1.03) ^[17].

2.2. Experimental design

The effects of the following parameters on global extraction yield (X_0), content of beta-ecdysone and antioxidant activity of BGR extracts were evaluated: temperature (333, 363 and 393 K), pressure (8, 10, 15, 20, 25 and 30 MPa) and extracting solvent type (EtOH and EtOH:H₂O (80:20, v/v)). A fully randomized, full factorial design (3×6×2) was performed. Parameter influences were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using Minitab 16[®] (Minitab Inc., State College, PA, USA) with a 95 % confidence level (p-value ≤ 0.05).

2.3. Extraction procedure

The PLE flow diagram is shown in Figure 1. Approximately 10 grams of BGR was placed in the 415 cm³ extraction cell. The sample occupied approximately 4.4 % of the cell's volume, and the empty space of the cell was filled with a Teflon column. The cell (EB) containing the sample was heated to the selected operational temperature by a jacket connected to a thermostatted bath (TB). The extracting solvent (TS) was pumped by a

HPLC pump (P1) (Thermoseparation Products, Model ConstaMetric 3200 P/F, Florida, USA) into the extraction cell until the operational pressure was reached. After pressurization, the cell was kept at the desired pressure for 10 minutes. Thereafter, the block valve (V-2) (Autoclave engineers, Model 10V2071 15000psi, Erie, USA) was opened, and the pressure was kept constant with the help of a heated micrometering valve (V-3) (Autoclave engineers, Model 10VRMM 11000PSI Erie, USA).

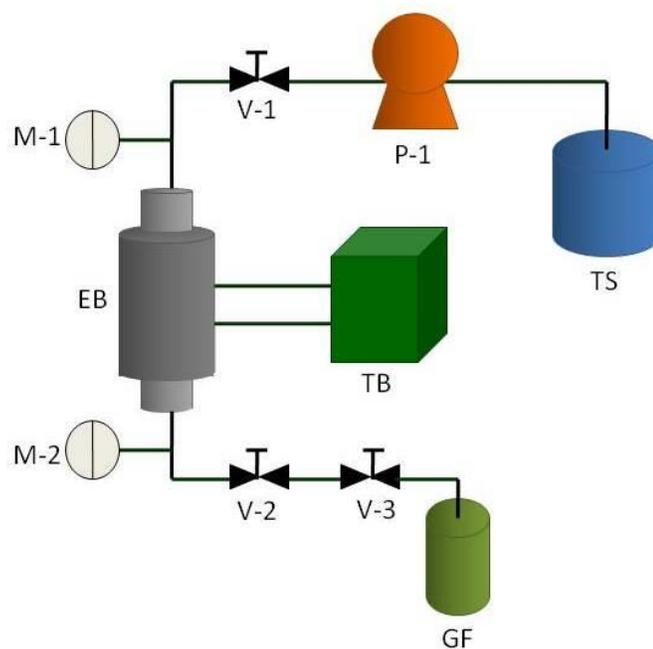


Figure 1. Flow diagram of the PLE unit. TS: Tank of solvent; P1: High pressure pump; V-1 and V-2: block valve; V-3: micrometric valve; M-1 and M-2: manometers; EB: extraction bed; TB: thermostatic bath; GF: glass flask.

The extracting solvent flow rate was fixed at $1.3 \times 10^{-4} \text{ kg.s}^{-1}$. The liquid extracts were collected in a glass flask (GF) and immersed in an ice bath at ambient pressure until a solvent mass to feed mass ratio (S/F) of 16 was reached (approximately 20 min). EtOH in

the extracts was eliminated using a vacuum rotary evaporator (Heidolph, model Laborota 4001 WB, Viertrieb, Germany) at 323 K. H₂O was eliminated by lyophilization (Liobras, model L101, São Carlos, SP, Brazil). The global yield (X_0) was calculated as the ratio between the mass of dry extract and the initial mass of raw material (dry basis, d.b.) fed into the extractor.

2.4. Antioxidant activity (AA)

The antioxidant activity (AA) of BGR extracts was evaluated using a coupled reaction of linolenic acid and beta-carotene as described by Leal et al.^[18]. Briefly, the reaction substrate was prepared by combining 10 mg of beta-carotene (Acros, 99 % purity, lot B0070864, New Jersey, USA), 10 cm³ of chloroform (Merck, 99.0 – 99.4 % purity, lot K31503045 301, Darmstadt, Germany), 60 mg of linolenic acid (Sigma – Aldrich, 99 % purity, lot 054K1214, St. Louis, USA) and 200 mg of Tween 40 (Sigma – Aldrich, 99 % purity, lot 032K0104, St. Louis, USA). This solution was concentrated in a vacuum rotary evaporator (Heidolph, model Laborota 4001 WB, Viertrieb, Germany) at 323 K and was then diluted in 50 cm³ of distilled water. The oxidation reaction was conducted using the following procedure: to 1 cm³ of substrate, 2 cm³ of distilled water and 0.05 cm³ of diluted extract (0.02 g of extract per cubic centimeter of EtOH) in EtOH (Dinâmica, 99.5 % purity, lot 52990, Diadema, SP, Brazil) were added. The mixture was placed in a thermal bath (Marconi, model MA127/BO, Piracicaba, Brazil) at 313 K, and the reaction product was monitored with an absorbance reading at 470 nm using a spectrophotometer (Femto, model 800XI, São Paulo, Brazil) after 2 hours of reaction. Antioxidant activity was determined in duplicate for each extract and calculated using Eq. (1), as proposed by Skaeget et al.^[19].

$$AA = 100 \times \left(1 - \frac{abs_{extract}^{t=0} - abs_{extract}^t}{abs_{control}^{t=0} - abs_{control}^t} \right) \quad (1)$$

where $abs_{extract}^{t=0}$ and $abs_{control}^{t=0}$ are the sample and control absorbances, respectively, at the beginning of the reaction and $abs_{extract}^t$ and $abs_{control}^t$ are the sample and control absorbances, respectively, after 2 h. The oxidation reaction in the control was conducted using the same procedure described but instead of diluted extract was used EtOH.

2.5. Beta-ecdysone quantification

Beta-ecdysone quantification was performed according to the methodology described by Rostagno et al. ^[20].

2.6. PLE extraction kinetics

Kinetic studies were conducted using the same unit described previously with approximately 20 grams of BGR (10.8 % moisture). The better extraction condition was selected according to the global yield isotherms and the highest beta-ecdysone content obtained in the extract. The experiment was conducted at 8 MPa and 393 K using EtOH as extracting solvent. The static period was 10 minutes (static time), the flow rate of extracting solvent was kept constant at $1.3 \times 10^{-4} \text{ kg.s}^{-1}$ and extract samples were collected every 5 minutes in the first hour and at every 10 minutes thereafter until the end of the extraction assay (total time 130 min or S/F = 48). EtOH and water were eliminated from the extract as

previously described. The overall extraction curve (OEC) was built using the cumulative extract mass (d.b.). The OEC was fitted to a spline of three straight lines, according to the methodology of Jesus et al. [21].

2.7. Process simulation: scale-up and economic evaluation

SuperPro Designer[®] version 8.5 was used to simulate the PLE process. This software allows the mass and energy balances to be estimated for all process streams; SuperPro also estimates purchase costs and reports stream and equipment data as well as capital and manufacturing costs.

The cost of manufacturing (COM) was estimated for the crude extract obtained by PLE along the OEC. The software used in this study estimates the COM using the Turton et al. (2003) [22] model, which considers the total capital investment cost, which in turn represents the fixed capital of investment (FCI), working capital and start-up costs. The FCI involves expenses related to equipment, installation, territorial taxes and engineering, while the working capital represents the operating liquidity required for a business. Finally, the start-up cost is associated with the start of operations and process validation. The operating cost represents costs that are directly dependent on the production rate and consists of the cost of raw materials (CRM) and the cost of solvent lost during the process as well as the cost of utilities (CUT), which represents the demand for steam and cooling water that are required for the evaporator and condenser, electricity and cost of operation labor (COL).

The PLE process was developed according to the flow diagram proposed by Santos et al. (2012) [15] and consists of a tank of solvent, one pump, two extractors (while one of the

vessels is under operation, the other undergoes cleaning and recharging) that operate semi-continuously, a flow controller and an evaporator (Figure 2).

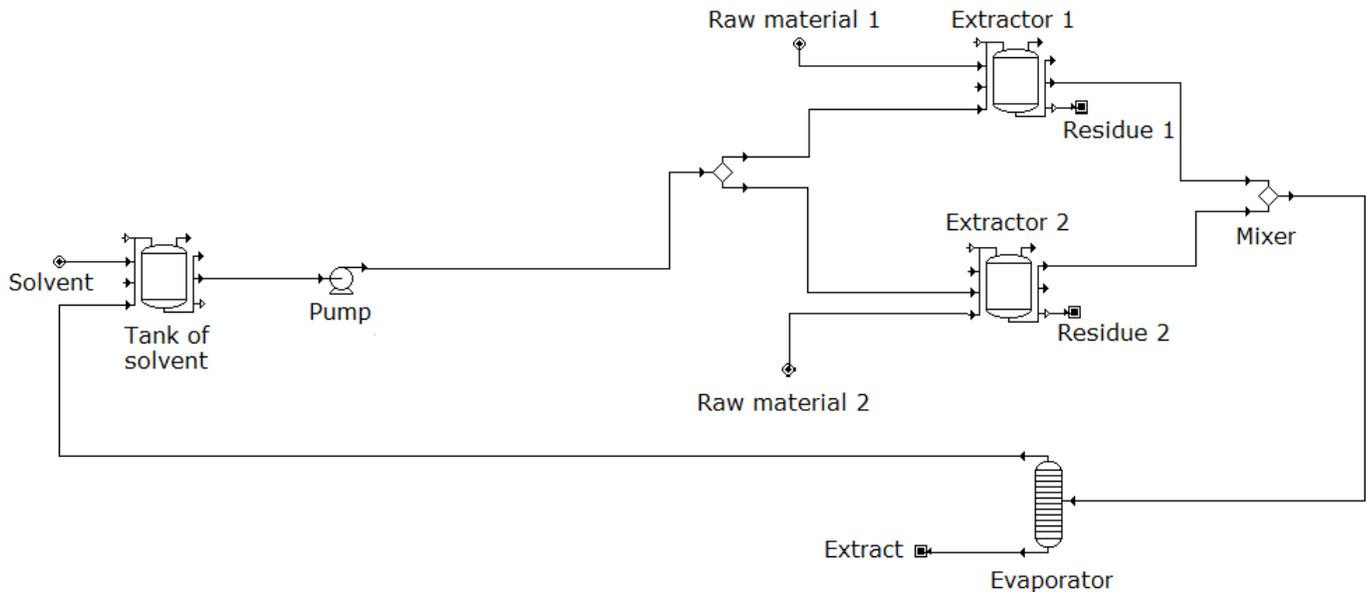


Figure 2. Flowchart of the pressurized liquid extraction process developed in SuperPro Designer[®].

For supercritical fluid extraction (SFE), scale-up studies assumed that the industrial-scale unit has the same performance as the laboratory-scale unit when the ratio between the mass of raw material and extracting solvent (S/F), the porosity of the extracting bed and the operating conditions are kept constant. The process was designed to run for 7920 hours per year, which corresponds to continuous, 24-hour shifts for 330 days per year^[23]. Although there are no studies of PLE scale-up, a scale-up procedure similar to that for SFE was used^[15].

The setup considered extractors with volumes of 0.005, 0.05 and 0.5 m³. The amount of BGR required for each industrial batch was determined for each extractor capacity and it

was determinate according to the apparent density. The apparent density of BGR ($550.0 \pm 0.3 \text{ kg.m}^{-3}$) was calculated using the mass of sample inside the extraction cell and its internal volume.

A sensitivity analysis was carried out to assess the impact of raw material cost on the economic feasibility of the process. The raw material costs considered were US\$ 46.08 kg^{-1} dry basis ^[24], US\$ 9.68 kg^{-1} dry basis ^[25] and US\$ 4.71 kg^{-1} (d.b.) ^[26]. EtOH can be purchased at US\$ 0.65 kg^{-1} . Commercial BGR extract is produced in pill form and packaged in boxes containing 45 units. Each box can be sold for US\$ 11.18 ^[27]. Each pill contains 300 mg dry extract with a beta-ecdysone content of 0.96 % (w.w⁻¹). Thus, the estimated selling price of BGR extract was US\$ 828.47 kg^{-1} of dry extract, which corresponds to a price of US\$ 86.29 g^{-1} of beta-ecdysone.

The economic data fed into the simulator are presented in Table 2. Considering that the beta-ecdysone content of the extract adds value, the specific cost was estimated for beta-ecdysone. According to Santos et al. ^[15], the COM estimation for beta-ecdysone was performed by accounting for the fact that the extract's cost is affected by its beta-ecdysone content.

Table 1. Economic parameters used for COM estimation.

		References
Industrial units		
2 Extractors of 0.005 m ³	US\$ 100,000	[28]
2 Extractors of 0.05 m ³	US\$ 234,000	[29]
02 Extractors of 0.5 m ³	US\$ 834,000	
Distiller column of 0.005 m ³	US\$ 20,000	
Distiller column of 0.05 m ³	US\$ 53,000	[29]
Distiller column of 0.5 m ³	US\$ 76,000	
Depreciation rate	10 % yr ⁻¹	
Labor		
2 Extractors of 0.005 m ³	US\$ 6,00 h ⁻¹	[30]
2 Extractors of 0.05 m ³	1 operator	
2 Extractors of 0.05 m ³	2 operator	[28]
2 Extractors of 0.5 m ³	3 operator	
Raw materials		
Dry Brazilian ginseng roots	US\$ 9.68 kg ⁻¹	[25]
Apparent density*	550.0 ± 0.3 kg.m ⁻³	-
EtOH	US\$ 0.65 kg ⁻¹	[26]
Utilities		
Electricity	US\$ 0.092 kWh ⁻¹	
Cooling water	US\$ 0.190 ton ⁻¹	[28]
Steam	US\$ 4.20 ton ⁻¹	

*determined experimentally

3. Results and Discussion

3.1. Global extraction yield (X_0)

The X_0 for BGR extracts obtained by PLE ranged from 1.5 to 25.0 % (d.b.). Table 2 shows the X_0 and the AA of the extracts obtained under different conditions with EtOH and EtOH:H₂O (80:20, v/v).

It can be observed that an increase in temperature leads to an increase in X_0 (Table 2). The effects of temperature, pressure and extracting solvent on X_0 were evaluated by an analysis of variance (ANOVA). The parameters that significantly influenced the X_0 were temperature (p-value = 0.041) and extracting solvent type (p-value = 0.000). Higher temperatures increase solvent diffusivity in the raw material and increase the solubility of the solute in the extracting solvent^[31, 32]. The combined effect of these factors increases the extracting solvent's ability to remove the solute from the cells, resulting in higher global extraction yields. It is important to note that raw materials such as annatto, turmeric and ginger are sensitive to high temperatures due to the presence of starch. Annatto extracts were dark brown in color at 393 K^[33]. Annatto is a starch-rich seed, so the dark color was likely due to Maillard and caramelization reactions. A similar behavior occurred with turmeric extracts above 473 K, which were rapidly degraded at this temperature. This degradation resulted in a poor global extraction yield^[34]. However, degradation was not observed for BGR.

Despite the pressure independence of X_0 , one and two crossover regions can be observed at pressures above 15 MPa. This behavior was observed by Leal et al.^[35] for a system consisting of sweet basil, CO₂ and water.

Table 2. Global yield (X_0), antioxidant activity (AA) and beta-ecdysone content for BGR extracts obtained by PLE.

Pressure (MPa)	Extracting solvent	X_0 (%)	AA (%)	beta-ecdysone content (mg.g ⁻¹ de extract)
Temperature: 333 K				
8	EtOH	1.5	15.9	24.2
10		1.7	35.6	28.6
15		1.7	26.6	27.0
20		2.3	23.1	27.5
25		1.8	29.4	28.8
30		1.8	21.3	30.3
8	EtOH:H ₂ O (80:20)	9.8	22.1	10.31
10		7.7	23.6	15.2
15		7.8	35.6	10.4
20		12.4	44.5	6.16
25		7.4	28.4	5.49
30		13.3	31.2	5.1
Temperature: 363 K				
8	EtOH	4.4	26.1	41.4
10		3.1	22.0	32.3
15		3.4	22.7	17.1
20		3.6	23.6	34.8
25		3.0	17.5	39.5
30		4.2	19.8	27.7
8	EtOH:H ₂ O (80:20)	10.8	25.2	3.8
10		16.3	31.2	4.0
15		16.2	32.8	3.7
20		7.9	30.6	2.4
25		19.5	34.5	3.4
30		11.4	43.1	3.1
Temperature: 393 K				
8	EtOH	6.4	24.6	43.3
10		6.1	24.4	49.7
15		6.2	27.2	31.2
20		6.1	16.4	39.0
25		5.5	23.1	40.5
30		6.0	20.1	25.8
8	EtOH:H ₂ O (80:20)	15.6	38.1	3.7
10		25.1	13.3	6.5
15		11.8	30.3	7.6
20		16.0	13.7	13.2
25		7.7	31.7	1.1
30		9.6	48.3	5.0

The highest X_0 was obtained using EtOH:H₂O (80:20, v/v) as the extracting solvent, likely due the solvent's polarity (5.96), which is slightly higher than that of pure EtOH (5.2). In a preliminary study of BGR extraction by PLE (Table 3), X_0 was determined for various solvents: water, EtOH:H₂O (70:30), EtOH, isopropanol, ethyl acetate, acetone and petroleum ether. The experiments were performed at 333 K and 12 MPa using 4.5 g of BGR and 20 cm³ of solvent with a static period of 4 minutes. The X_0 obtained ranged from 0.2 to 40.5 % (d.b.), and the highest value of X_0 was obtained using water as extracting solvent. These results suggest that polar components are abundant in BGR. In this work, only EtOH and water were tested as solvents because both are considered GRAS (Generally Recognized as Safe) solvents. In addition, EtOH is more selective for beta-ecdysone than the other solvents, as shown by the results in Table 2 and 3.

3.2. Beta-ecdysone quantification

The beta-ecdysone content of the BGR extracts ranged from 1.1 to 49.7 mg.g⁻¹ extract (Table 2). Analysis of variance (ANOVA) showed that the parameters that significantly influence beta-ecdysone content were the extracting solvent (p-value = 0.000) and the interaction between temperature and extracting solvent (p-value = 0.033). Table 2 shows clearly that the highest beta-ecdysone content was obtained using EtOH as extracting solvent. These results show that EtOH at higher temperature is more selective for beta-ecdysone recovery than is EtOH: H₂O (80:20, v/v).

While BGR extracts containing 5 % of beta-ecdysone were obtained at 393 K and 10 MPa with EtOH as the extracting solvent for an extraction time of approximately 20 minutes (S/F = 8), Leal et al ^[26] obtained extracts with similar beta-ecdysone content

(4.60%) by SFE using CO₂+ EtOH as the extracting solvent after 5 hours (S/F = 63). This results demonstrates that PLE is a better process than SFE for BGR extraction [26]. The beta-ecdysone yield in terms of raw material reported by other authors ranges from 0.35 to 0.43% (d.b.) [2, 3, 36]. Leal et al [26] observed a beta-ecdysone yield of 0.013% (d.b.), which is 28 times higher than the one presented in Patent US6224872 [37].

Table 3. BGR extraction yields obtained using polar and unpolar solvents; PLE performed at 12 MPa and 333 K.

Solvent	Polarity	Yield (%)
H ₂ O	9.0	40.5 ± 0.6
EtOH:H ₂ O (70:30, v/v)	6.3	21.8 ± 0.9
EtOH	5.2	2.2 ± 0.04
Acetone	5.1	0.500 ± 0.002
Ethyl acetate	4.4	0.250 ± 0.005
Isopropanol	3.9	0.70 ± 0.03

3.3. Antioxidant activity (AA)

The AA for BGR extracts obtained by PLE ranged from 13.3 to 48.3 % (Table 2). The highest AAs were obtained with EtOH:H₂O (80:20, v/v) as the extracting solvent. Santos et al. [38] obtained extracts from BGR using EtOH and EtOH:H₂O (70:30, v/v) by low pressure solvent extraction (LPSE) and observed that extracts with higher AA were obtained when a hydroalcoholic mixture was used as the extracting solvent.

The influence of temperature, pressure and extracting solvent on AA was evaluated by ANOVA. The parameter that significantly affected the AA was the extracting solvent

(p-value = 0.008). The highest AAs were obtained using EtOH:H₂O (80:20, v/v) as the extracting solvent.

The optimum PLE conditions to obtain an extract with high AA is different from the optimum conditions that are used to obtain a beta-ecdysone-rich extract. Because no correlation between beta-ecdysone content and AA could be established, the complete chemical composition of the extracts should be determined to better understand the problem. Such a determination would allow the compounds that are responsible for AA to be identified.

3.4. Extraction kinetics

An efficient extraction should maximize both the recovery of the target component and the target component's purity. The PLE conditions that maximized recovery of beta-ecdysone were a temperature of 393 K and using EtOH as the extracting solvent. Because pressure was not found to significantly affect beta-ecdysone recovery, the system pressure was set to the lowest value studied (8 MPa) for the kinetic experiments to save energy. It is important to note that the X₀ experiments were used to select the best operational conditions (temperature, pressure and extracting solvent). The extraction yields obtained in these experiments cannot be compared with those obtained in the kinetic experiments because, in general, GYI assays are not performed as an exhaustive extraction but instead occur at a fixed ratio of S/F^[39].

The kinetics of the extraction process with PLE can be empirically characterized by an OEC, and kinetic parameters can be calculated by adjusting a linear spline model similar to that used in supercritical fluid extraction^[7]. Figure 3 shows the OEC of BGR, which was

fitted to a spline of three straight lines ^[21]. The first line represents the constant extraction rate (CER) period, the second line represents the falling extraction rate (FER) period and the third line represents the diffusion-controlled rate period (DC). The duration of the CER period (t_{CER}), determined by the intercept of the first and second lines, was 26 minutes. At this time, approximately 50 % of the total extraction yield was obtained. The total BGR extraction yield obtained on the OEC was approximately 7 % (d.b.) after 130 minutes. This value is 12.5-fold higher than that obtained by SFE (0.56 %) using CO₂ + EtOH as an extracting solvent after 5 hours of process ^[26].

It can be observed that the DC was not reached in this process. The interaction between the liquid extracting solvent and vegetable matrix as well as the use of moderate to elevated temperatures promotes reactions such as hydrolysis in addition to extraction of target compounds. As a result, the slope of the third line for PLE represents a reactive extraction period instead of the DC period.

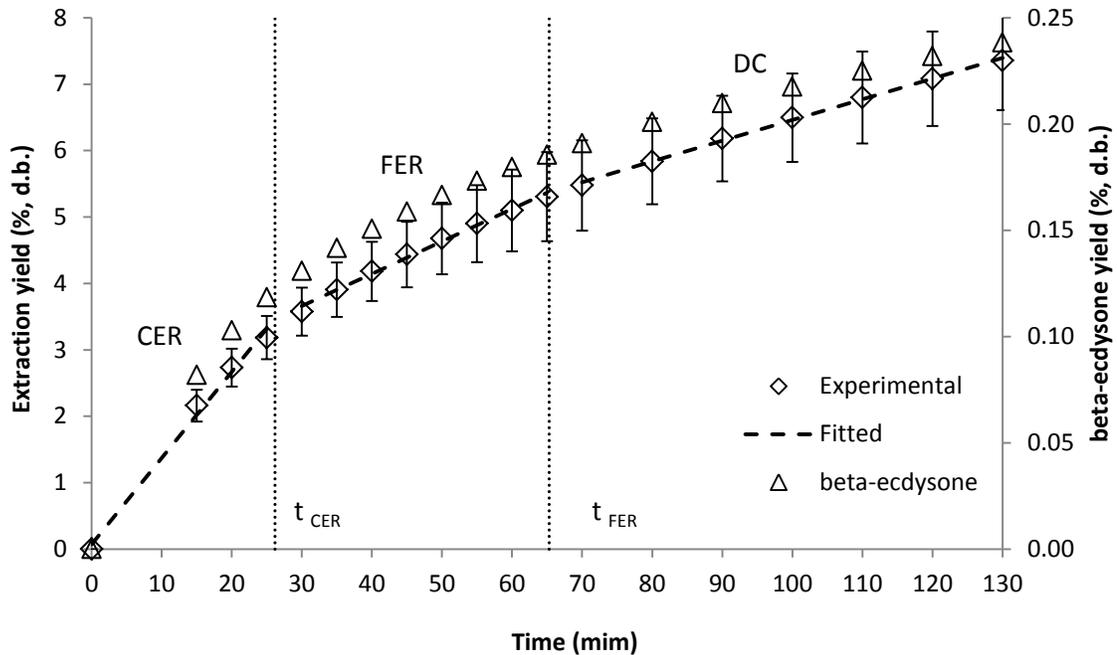


Figure 3. Overall extraction curve for the BGR + EtOH system at 8 MPa and 393 K; the experimental data were fitted to a spline of three straight lines.

Figure 3 shows the cumulative beta-ecdysone yield as a function of extraction time. From 20 grams of BGR (10.8 % moisture), approximately 42 mg of beta-ecdysone ($0.24 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ of raw material) was recovered. This yield is 16-fold higher than the yield obtained by Leal et al ^[26] using SFE with $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ (20 MPa / 303 K). In addition, 74 % of the total beta-ecdysone mass was obtained in the first hour of extraction.

3.5. Economic Evaluation

3.5.1. Sensitivity analysis

The effect of raw material cost on the estimated COM was evaluated, considering the extraction yield (7 %) and beta-ecdysone content ($24 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of raw material) at 130 min for 0.005, 0.05 and 0.5 m^3 extractors.

The COM for beta-ecdysone ranged to US\$ 2.59 from US\$ 24.10 per kg of extract. Such variation is due to varying raw material costs and the different extractor volumes considered. For a raw material cost of US\$ 46.08 kg⁻¹ [24], the COM of beta-ecdysone was US\$ 24.10, 20.81 and 20.10 per kg of extract for 0.005, 0.05 and 0.5 m³ extractors, respectively. For raw material costs of US\$ 9.68 kg⁻¹ [25] and US\$ 4.71 kg⁻¹ [26], the COMs for beta-ecdysone were US\$ 8.75, 5.40 and 4.70 per kg of extract and US\$ 6.65, 3.30 and 2.59 per kg of extract for 0.005, 0.05 and 0.5 m³ extractors, respectively.

All calculated COMs for beta-ecdysone are lower than the selling price of BGR extracts (US\$ 86.30 g⁻¹ of extract) (Herbarium Laboratório Botânico LTDA, Colombo-PR, Brazil), suggesting that PLE is economically feasible even when raw materials are purchased at the highest price. A raw material price of US\$ 9.86 kg⁻¹ [25], which is the most recently reported value, was used for further process analysis.

3.5.2. COM as a function of the extraction time

The COMs for BGR crude extract as a function of the extraction time for 0.005, 0.05 and 0.5 m³ extractors, as estimated by the SuperPro Design[®] software, are shown in Figure 4. It can be observed that increasing the extractor capacity from 0.005 to 0.05 m³ significantly decreases the COM. However, the COMs for extractor vessels of 0.05 and 0.5 m³ are very similar. The availability of raw materials and several other factors should thus be accounted for when considering extractors with larger capacities.

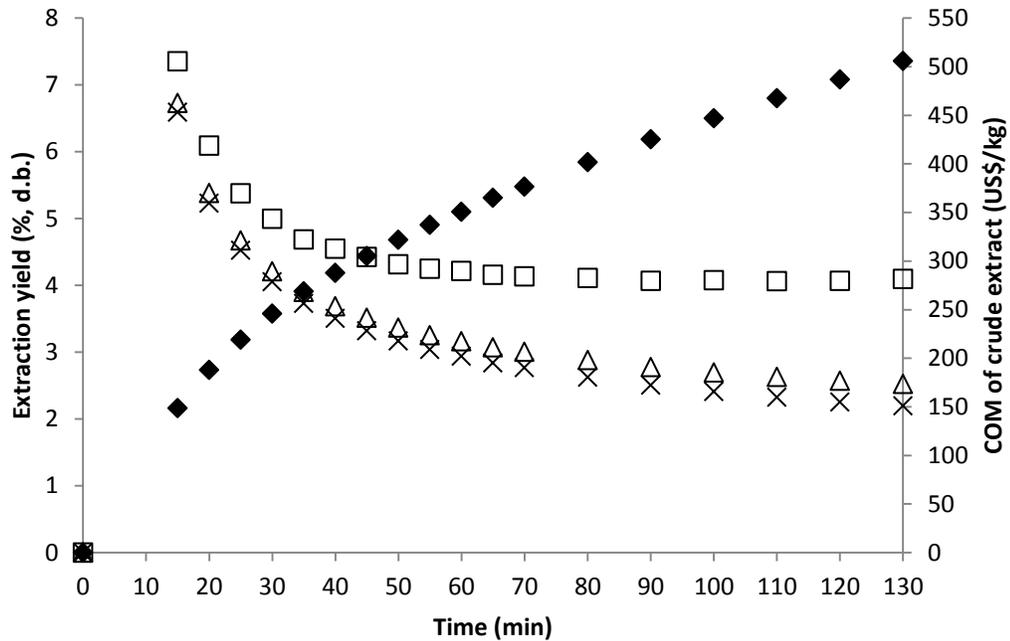


Figure 4. COMs of crude extract estimated for PLE in extraction units containing 0.005 (□), 0.05 (△) and 0.5 (×) m³ extractor vessels and extraction yield (◆).

Based on an annual operating time of 7920 h and a minimum cycle time of 2 h, the annual production for the process was calculated as 3960 batches (during a batch, one vessel is under operation, while the other vessel is cleaned and recharged). The amount of BGR required for each batch (2 h) for extractor capacities of 0.005, 0.05 and 0.5 m³ (considering raw material with 10.8 % moisture and fresh raw material with 67% moisture^[40]) and the dry BGR extract produced per year (employing the experimentally determined extraction yield of 7 % d.b.) are shown in Table 4. In Brazil, it is currently not possible to obtain the quantity of BGR required for 0.05 and 0.5 m³ extractor vessels. In 2008, Corrêa Jr. et al^[41] estimated that BGR production reached 60 t per month, which corresponds to 700 t per year. Considering the apparent density of BGR, an industrial unit containing 0.5

m³ extractors would consume 410 t per year, or approximately 70 % of the total BGR production.

Table 4. Input and output of raw material and product needed for the production beta-ecdysone-rich extract from Brazilian ginseng roots (BRG) for different scales.

Extractor volume (m³)	Amount of BGR (kg/batch)	Amount of BGR 10.8 % moisture (t.yr⁻¹)	Amount of BGR 67 % moisture (t.yr⁻¹)	BGR extract (t.yr⁻¹)
0.005	2.75	10.89	29.44	0.79
0.05	27.5	108.90	294.36	7.92
0.5	275.00	1089.00	2943.60	79.20

The contribution of each component to the COM as a function of extraction time in a 0.05 m³ extractor is shown in Table 5. It can be observed that the extraction time is an important process parameter: an increase in the contributions of FCI, cost of utilities (CUT) and cost of operation labor (COL) in addition to a decrease in the contribution of the cost of raw material (CRM) is observed for high extraction times. The same behavior can be observed for pressurized liquid extraction of jabuticaba skins [15]. It is interesting to note that the CRM is responsible for 70 to 98 % of the COM, which justifies the previously performed sensitivity analysis for the raw material costs.

Table 5. Contribution of each component in COM of PLE with a 0.05 m³ extractor.

Extraction time (min)	Extraction yield (%)	FCI (%)	CRM (%)	CUT (%)	COL (%)
15	2.16	1.08	98.28	0.16	0.49
30	4.18	6.08	90.91	0.28	2.74
60	5.47	11.36	83.13	0.40	5.11
90	6.49	16.01	76.26	0.51	7.21
120	7.35	20.11	70.20	0.64	9.06

The results obtained by Leal et al.^[26] are summarized in Table 6 to facilitate a comparison with the results obtained in this study. The COM for the PLE process was 14-fold lower than that for the SFE process, while the COM for beta-ecdysone obtained via PLE was 8-fold lower than that obtained by SFE. In addition, while the CRM is the most important factor for the COM of SFE, the contribution of CRM to the COM of PLE is even higher. PLE thus has advantages over SFE in the form of a lower COM and initial investment.

An SFE unit composed of two 0.4 m³ extractors costs between US\$ 1,500,000 and 2,625,000^[42], and a PLE unit composed of two 0.4 m³ extractors costs approximately US\$ 730,000 (estimated using the Chilton methodology^[22]). This difference is significant and occurs due to the SFE unit's requirement of two high-pressure pumps, a flash tank, a heat exchange system for CO₂ and a compressor. In contrast, the PLE unit requires only one high-pressure pump. Thus, in terms of FCI, the PLE process is more economical than SFE process.

Table 6. Comparison between of COM for crude extract, beta-ecdysone and the contribution of each components estimated for PLE (this work) and SFE^[26] processes using 0.4 m³ extractors with the same extraction yield (70 %).

Process	t (min)	COM for crude extract (US\$/kg)	COM for beta- ecdysone (US\$/g)	FCI (%)	CRM (%)	CUT (%)	COL (%)
PLE	60	202.59	9.31	4.36	92.28	2.33	1.03
SFE*	135	2766.0	72.56	12.0	75.0	7.0	5.0

*Leal et al.^[26].

PLE is a highly selective process that uses short periods of extraction and small amounts of organic solvents ^[7]. PLE is presented as an excellent alternative to other extraction techniques such as SFE with cosolvent. The PLE process requires a shorter extraction period to obtain a particular amount of beta-ecdysone compared with SFE ^[26]. In terms of scale up, it is possible to conclude that extraction of BGR using PLE is a viable alternative to SFE (Table 4).

4. Conclusion

It was demonstrated that PLE is an alternative and very promising process to generate beta-ecdysone-rich BGR extracts. The extracting solvent type was found to significantly affect the global extraction yield (X_0), beta-ecdysone content and antioxidant activity of BGR extracts, while temperature was found to only affect the extraction global yield. Interactions between temperature and extracting solvent were found to only affect the beta-ecdysone content. Pressure was not found to influence the response variables analyzed under the conditions studied. It is possible that even lower pressures (< 8 MPa) do not significantly affect the process. Further experiments will be performed to investigate lower pressures because COM can be reduced by reducing pressure.

Among the extraction conditions studied, the best condition in terms of beta-ecdysone recovery was 393 K, EtOH as extracting solvent and a pressure of 8 MPa. This condition resulted in extracts containing approximately 5 % (w/w) beta-ecdysone. From the overall extraction curve, it was determined that after 26 min (t_{CER}), approximately 50 % of the extraction yield and 54 % of the total beta-ecdysone mass were obtained. The COMs for the

crude extract and beta-ecdysone obtained by this novel process were 14- and 8-fold lower than that for the SFE process, respectively.

Acknowledgements

I. C. N. Debien and R. Vardanega thank the CNPq (151165/2010-6 and 131260/2011-1 for the Ph.D. and MSc assistantships, respectively). Diego T. Santos and R. Vardanega thank FAPESP (2010/16485-5 and 2012/19304-7, and 2013/17260-5, for the postdoctoral fellowship and doctoral assistantship, respectively). M. A. A. Meireles thanks CNPq (301301/2010-7) for the productivity grant. The authors acknowledge the financial support from CNPq and FAPESP (2009/17234-9; 2012/10685-8).

References

1. Qi, L.-W.; Wang, C.-Z.; Yuan, C.-S. (2011) Isolation and analysis of ginseng: advances and challenges. *Nat. Prod. Rep.*, 28: 467-495.
2. Freitas, C.S.; Baggio, C.H.; Da Silva-Santos, J.E.; Rieck, L.; de Moraes Santos, C.A.; Júnior, C.C.; Ming, L.C.; Garcia Cortez, D.A.; Marques, M.C.A. (2004) Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. *Life Sci.*, 74(9): 1167-1179.
3. Zimmer, A.R.; Bruxel, F.; Bassani, V.L.; Gosmann, G. (2006) HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(2): 450-453.
4. Vigo, C.L.S.; Narita, E.; Marques, L.C. (2003) Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen-Amaranthaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13(2): 46-49.
5. Petersson, E.V.; Liu, J.; Sjoberg, P.J.R.; Danielsson, R.; Turner, C. (2010) Pressurized hot water extraction of anthocyanins from red onion: a study on extraction and degradation rates. *Analytica Chimica Acta*, 663: 27-32.
6. Richter, B.E.; Jones, B.A.; Ezzell, J.L.; Porter, N.L. (1996) Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68: 1033-1039.
7. Osório-Tobón, J.F.; Meireles, M.A.A. (2013) Recent applications of pressurized fluid extraction: curcuminoids extraction with pressurized liquids. *Food and Public Health*, 3(6): 289-303.
8. Ju, Z.Y.; Howard, L.R. (2003) Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *J. Agric. Food Chem.*, 51(18): 5207-5213.
9. Søltoft, M.; Christensen, J.H.; Nielsen, J.; Knuthsen, P. (2009) Pressurised liquid extraction of flavonoids in onions. Method development and validation. *Talanta*, 80(1): 269-278.
10. Çam, M.; Hışıl, Y. (2010) Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123(3): 878-885.
11. Wijngaard, H.H.; Ballay, M.; Brunton, N. (2012) The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids. *Food Chemistry*, 133(4): 1123-1130.
12. Hu, J.; Guo, Z.; Glasius, M.; Kristensen, K.; Xiao, L.; Xu, X. (2011) Pressurized liquid extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) with bioethanol: An efficient and sustainable approach. *J Chromatogr A*, 1218(34): 5765-5773.

13. Cheah, E.L.C.; Heng, P.W.S.; Chan, L.W. (2010) Optimization of supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of active principles from *Magnolia officinalis* using the Taguchi design. *Separation and Purification Technology*, 71(3): 293-301.
14. Veggi, P.C.; Santos, D.T.; Meireles, M.A.A. (2011) Anthocyanin extraction from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. *Procedia Food Science*, 1(0): 1725-1731.
15. Santos, D.T.; Veggi, P.C.; Meireles, M.A.A. (2012) Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *J. Food Eng.*, 108(3): 444-452.
16. Debien, I.C.N.; Meireles, M.A.A. (2014) Supercritical Fluid Extraction of Beta-ecdysone from Brazilian Ginseng (*Pfaffia glomerata*) Roots. *Food and Public Health*, 4: 67-73.
17. AOAC, Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists. In 1995.
18. Leal, P.F.; Braga, M.E.M.; Sato, D.N.; Carvalho, J.E.; Marques, M.A.; Meireles, M.A.A. (2003) Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction *J Agr Food Chem*, 51: 2520-2525.
19. Skaeget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A.R.; Simonic, M.; Knez, Z. (2005) Phenols proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89: 191-198.
20. Rostagno, M.A.; Debien, I.C.; Vardanega, R.; Nogueira, G.C.; Barbero, G.F.; Meireles, M.A.A. (2014) Fast analysis of β -ecdysone in Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) extracts by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytical Methods*, 6(8): 2452-2459.
21. Jesus, S.P.; Calheiros, M.N.; Hense, H.; Meireles, M.A.A. (2013) A Simplified Model to Describe the Kinetic Behavior of Supercritical Fluid Extraction from a Rice Bran Oil Byproduct. *Food and Public Health*, 3(4): 215-222.
22. Turton, R.; Bailie, R.C.; Whiting, W.B.; Shaiwits, J.A. (2003) *Analysis, synthesis and design of chemical process*; Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ
23. Prado, J.M.; Prado, G.H.C.; Meireles, M.A.A. (2011) Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugarcane residue. *J. Supercrit. Fluids*, 56(3): 231-237.
24. CPQBA. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas. <http://www.cpqba.unicamp.br/>, Paulínea(SP): Brazil.
25. Santosflora. <http://www.santosflora.com.br/>, São Paulo(SP): Brazil.

26. Leal, P.F.; Kfour, M.B.; Alexandre, F.C.; Fagundes, F.H.R.; Prado, J.M.; Toyama, M.H.; Meireles, M.A.A. (2010) Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. *J. Supercrit. Fluids*, 54(1): 38-45.
27. Herbarium Laboratório Botânico LTDA. <http://www.herbarium.net/pt/Default.aspx>, Colombo(PR): Brazil.
28. Prado, J.M.; Albuquerque, C.L.C.; Cavalcanti, R.N.; Meireles, M.A.A., Use of comercial process simulator to estimate cost of manufacturing (COM) of carotenoids obtained via supercritical technology from palm and buriti trees. In *9th International Symposium on Supercritical Fluids*, Arcachon, France, 2009; p 136.
29. Cavalcanti, R.N., Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática. In *Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas: Campinas, 2013; Vol. Doutorado, p 235*
30. Santos, D.T.; Veggi, P.C.; Meireles, M.A.A. (2010) Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. *J. Food Eng.*, 101(1): 23-31.
31. Pereira, C.G.; Meireles, M.A.A. (2010) Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Technol.*, 3(3): 340-372.
32. Brunner, G. (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J. Food Eng.*, 67(1-2): 21-33.
33. Rodrigues, L.M.; Alcázar-Alay, S.C.; Petenate, A.J.; Meireles, M.A.A. (2014) Bixin extraction from defatted annatto seeds. *Comptes Rendus Chimie*.
34. Osorio-Tobón, J.F.; Meireles, M.A.A. (2013) Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. *Food and Public Health*, 3(6): 289-303.
35. Leal, P.F.; Maia, N.B.; Carmelo, Q.A.C.; Catharino, R.R.; Eberlin, M.N.; Meireles, M.A.A. (2008) Sweet basil (*Ocinum basilicum*) extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE): Global yields, chemical composition, antioxidant activity, and estimation of cost of manufacturing. *Food Bioprocess Tech*, 1: 326-338.
36. Flores, R.; Nicoloso, F.T.; Brondani, D.; Maldaner, J.; Cezarotto, V.; Giacomelli, S.R. (2009) Extraction of ecdysterone from roots of Brazilian ginseng. *Ciencia Rural*, 39(4).
37. Shibuya, T.; Ario, T.; Fukuda, S. Composition. 2001
38. Santos, D.T.; Vardanega, R.; Debien, I.C.N.; Meireles, M.A.A., Extração de compostos bioativos de raízes de ginseng brasileiro em percolador de leito fixo assistido por ultrassom:

validação do processo. In *9th Simposio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas, Brazil, 2011.

39. Meireles, M.A.A. (2008) Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants in Martinez, J. (Ed) *Supercritical Fluid Extraction of nutraceuticals and bioactive compounds* CRC Press - Taylor & Francis Group: Boca Raton

40. Júnior, I.M., Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial. In Instituto Agronômico de Campinas: Campinas, 2005; Vol. Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical, p 75.

41. Correa, C.; Ming, L.C.; Cortez, D.A.G. (2008) Seasonal variation in root production and beta-ecdysone content in *pfaffia* accessions. *Hortic. Bras.*, 26(3): 393-397.

42. Prado, I.M.; Prado, G.H.C.; Prado, J.M.; Meireles, M.A.A. (2013) Supercritical CO₂ and low-pressure solvent extraction of mango (*Mangifera indica*) leaves: Global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing. *Food Bioprod. Process.*, 91(C4): 656-664.

PARTE 2: Estudo do Equilíbrio de Fases de Sistemas Complexos

CAPÍTULO 4 – EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES

1 INTRODUÇÃO

O estudo do equilíbrio de fases é a base para o conhecimento dos fenômenos que ocorrem a altas pressões, sejam em processos de extração ou de reações de polimerização, impregnação ou encapsulamento de materiais. O equilíbrio de fases termodinâmico pode apontar certos limites para a transferência de massa entre diferentes fases, as quais estão envolvidas em diversos processos. O equilíbrio de fases revela a composição das fases no equilíbrio, incluindo a solubilidade dos compostos extraídos no solvente supercrítico e a solubilidade do solvente supercrítico na fase pesada; as quantidades das fases em equilíbrio; a distribuição dos componentes individuais entre as fases em equilíbrio e a variação dessas quantidades à determinadas temperatura e pressão; e a concentração dos vários componentes (Brunner, 1994).

A etapa de separação do processo de extração a altas pressões consiste na despressurização da solução (solvente + extrato) na saída do extrator. Para essa operação, a utilização de vários destiladores tipo flash, possibilitando o ajuste de diferentes condições de temperatura e pressão em cada um deles, permite que o extrato seja fracionado. Esse fracionamento depende da solubilidade dos compostos que constituem o extrato no solvente em questão, em cada uma das condições aplicadas aos ciclones de separação. Desta forma, a etapa de separação pode ser analisada através do estudo de equilíbrio de fases que ocorre dentro do separador. O entendimento desse fenômeno permite a utilização de condições ótimas de operação nesta etapa do processo de extração, sendo que a determinação dessas condições está relacionada a três fatores: i) minimização da perda de extrato junto à fração

leve (solvente na forma gasosa), que pode acarretar aumento do custo de manufatura tanto em decorrência do menor rendimento do processo quanto do incremento do custo de reciclagem do solvente; ii) minimização da perda de solvente junto à fração pesada (extrato), que pode também acarretar um incremento do custo de manufatura devido à necessidade de uma maior taxa de reposição de solvente ao processo; iii) minimização da demanda energética proveniente da necessidade de re-pressurização do solvente para que o mesmo possa ser reutilizado (Rozzi e Singh, 2002; Carvalho *et al.*, 2006; Takeuchi *et al.*, 2008).

2 METODOS EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES

O levantamento de dados experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões podem ser obtidos empregando diferentes metodologias experimentais, sendo que a seleção da técnica mais adequada depende basicamente de três fatores: custo, propriedades físico-químicas dos componentes e condições de operação dos experimentos. Medidas diretas de dados de equilíbrio de fases representam uma importante fonte de informação, no entanto é difícil e cara a obtenção destes dados experimentais (Dohrn e Brunner, 1995)

As técnicas usadas para investigar o equilíbrio multifásico podem ser classificadas de acordo com o método empregado para analisar a composição das fases ou com a maneira pela qual uma fase se desloca em relação à outra (Dohrn e Brunner, 1995; Dariva, 2000). A seguir é apresentada a classificação de tais técnicas, sendo essas divididas em três categorias (Melo, 1997):

- Métodos Dinâmicos: Extrativo (Saturação) e Contínuo;

- Métodos Estáticos: Sintéticos e Analíticos;

- Métodos com recirculação.

Métodos dinâmicos são aqueles em que pelo menos uma das fases do sistema está sujeita a um deslocamento em relação à outra. Os dois métodos dinâmicos apresentados distinguem-se quanto ao contato entre as fases envolvidas no sistema. Os métodos estáticos, por sua vez, têm como principal característica o fato do sistema ser fechado. No método estático analítico a identificação da composição é feita diretamente pela retirada de amostra das fases em equilíbrio, enquanto que no método estático sintético, a análise é realizada através de técnicas não intrusivas (Dariva, 2000).

Alguns autores classificam o método com recirculação como dinâmico (uma vez que ocorre escoamento de uma das fases), enquanto outros o consideram como estático devido às semelhanças na etapa de retirada de amostras das fases em equilíbrio. Historicamente, pode-se dizer que o método com recirculação surgiu como melhoria aos métodos estáticos; porém, devido as suas semelhanças com os métodos dinâmicos, muitos autores preferem classificá-lo como tal (Corazza, 2002).

A seguir será realizada uma breve descrição do método experimental para medida do equilíbrio de fases utilizado neste trabalho destacando suas características, vantagens, limitações e aplicabilidade.

2.1 MÉTODO ESTÁTICO SINTÉTICO

Nesse método a principal característica é que a célula de equilíbrio, uma vez carregada, permanece fechada até o equilíbrio ser atingido. A composição das fases em equilíbrio é determinada indiretamente, sem necessidade de amostragem.

No início do experimento a composição global da mistura é conhecida, uma vez que são introduzidas na célula quantidades pré-determinadas de cada componente. A fim de que se forme uma solução homogênea, as condições de pressão e temperatura são previamente ajustadas. A célula de equilíbrio possui uma janela de safira, que permite a visualização do seu interior, e um pistão, que permite a variação gradual das condições de pressão.

Geralmente o sistema é imerso num banho termostático, com a finalidade de manter a temperatura constante.

Esse método consiste, inicialmente, no aumento da pressão do sistema até que seja atingida uma única fase, e posteriormente a manipulação da pressão até o surgimento de uma segunda fase, detectada visualmente através da formação de bolhas ou turvamento da solução. Assim é possível identificar as regiões de transição de fases e traçar as curvas de ponto de bolhas e/ou orvalho para os sistemas líquido – vapor, líquido – líquido e sólido – fluido. Dessa forma, a pressão no instante onde ocorre a formação do ponto de orvalho ou de bolha a uma determinada temperatura corresponde à condição em que a composição global do sistema é igual a da fase vapor ou líquida, respectivamente.

Resumindo, o método estático sintético pode ser aplicado a qualquer sistema envolvendo equilíbrio de fases fluido-fluido ou sólido-fluido. Suas principais vantagens são: não é necessária amostragem, não há perturbação do sistema, fazendo com que o procedimento experimental seja simplificado e o custo de construção do equipamento é relativamente baixo. A desvantagem é que é um método de difícil aplicação em sistemas multifásicos.

3 COMPORTAMENTO DE FASES EM FLUIDOS PRESSURIZADOS

Um solvente constituído por moléculas pequenas e simples, que a temperatura e pressão ambiente são gasosas, quando colocado em contato com solutos, esses constituídos por moléculas mais complexas e menos voláteis, e submetidos a condições de temperatura e pressão utilizadas em aplicações industriais, geralmente bem próximas do ponto crítico do solvente, acarreta em um complicado comportamento de fases. Sendo assim, o sucesso das tecnologias que empregam fluidos pressurizados depende em grande parte do estudo e compreensão das variadas e complexas transições de fase comumente observadas (Charin, 2010).

As propriedades termodinâmicas da mistura normalmente são expressas em termos das coordenadas pressão, temperatura e composição, com as projeções Pressão *versus* Temperatura (P-T), Temperatura *versus* Composição (T-x) e Pressão *versus* Composição (P-x).

Uma ênfase geral da termodinâmica de equilíbrio de fases a altas pressões é dada para sistemas de misturas binárias, com uma representação nos planos Pressão *versus* Temperatura (P-T) e Pressão *versus* Composição (P-x), a fim de introduzir uma variedade de transições de fases que não são observadas para fluidos puros (Bertucco e Vetter, 2001).

A classificação dos diagramas de equilíbrio de fases a altas pressões para sistemas binários foi dada utilizando a equação cúbica de estado de van der Waals com o objetivo de determinar as linhas críticas dos sistemas em coordenadas de pressão, temperatura e composição. As diferenças no comportamento de fase que ocorrem em misturas binárias podem ser qualitativamente discutidas em termos de mudanças nas propriedades termodinâmicas próximas aos pontos críticos. Os diagramas podem ser agrupados pela

presença ou não de linhas trifásicas de equilíbrio líquido-líquido-vapor e pela forma como as linhas críticas são conectadas (Van Konynenburg e Scott, 1980).

Na literatura, para o entendimento dos vários diagramas de equilíbrio de fases, são empregados alguns conceitos: transições do tipo UCST (Upper Critical Solution Temperature) e transições do tipo LCST (Lower Critical Solution Temperature).

Uma transição de fase do tipo UCST ocorre quando um sistema líquido bifásico torna-se monofásico com o incremento da temperatura a pressão constante, ou seja, a região de imiscibilidade líquido-líquido diminui com o aumento da temperatura (Folie e Radosz, 1995). Esse tipo de transição é caracterizado pela diminuição da pressão de transição com o aumento da temperatura, isto é, $(\partial P / \partial T)_x < 0$. Para um decréscimo da temperatura as soluções exibem uma região de solubilidade limitada, devido às diferenças entre as interações energéticas do soluto com o solvente (Kontogeorgis *et al.*, 1995).

Uma transição do tipo LCST ocorre quando uma mistura monofásica líquida se separa em duas fases líquidas com um incremento de temperatura a uma pressão constante. Nesse caso, um aumento da temperatura provoca um aumento da região de imiscibilidade líquido-líquido (Folie e Radosz, 1995). Esse tipo de transição é caracterizado pelo aumento da pressão de transição com o aumento da temperatura, isto é, $(\partial P / \partial T)_x > 0$. Essa transição pode ser atribuída ao fato de que as diferenças entre o volume livre de soluto e de solvente são diminuídas com o aumento da pressão, fazendo com que os mesmos tornem-se mais “compatíveis” (Kontogeorgis *et al.*, 1995).

As transições UCST e LCST são delimitadas por pontos críticos terminais. Sendo a existência desses tipos de transições de fases diretamente interpretadas por assimetria molecular. Em baixas temperaturas e altas pressões, as interações entre moléculas semelhantes (solvente – solvente e soluto – soluto) são mais fortes que as interações soluto

– solvente (Folie e Radosz, 1995). Como resultado, o sistema se divide em duas fases líquidas distintas. À medida que aumenta a temperatura as interações solvente-soluto ficam mais fortes e a temperatura limite em que as duas fases líquidas podem coexistir é chamada Upper Critical End Point (UCEP). Em temperaturas próximas à temperatura crítica do solvente, existe o efeito do volume livre do solvente, que tem como consequência uma movimentação mais rápida das moléculas do solvente que tendem a se separar da solução e constituir uma segunda fase líquida. A menor temperatura que corresponde ao surgimento desta segunda fase é chamada de Lower Critical End Point (LCEP) (Prausnitz, Lichtenthaler e De Azevedo, 1999).

Os tipos de diagramas de equilíbrio de fases de acordo com a classificação de Van Konynenburg e Scott (1980) são mostrados na Figura 4.1.

O Tipo I é caracterizado pela linha crítica contínua e a ausência de imiscibilidade líquido-líquido. Trata-se do comportamento mais simples que pode ocorrer, uma linha crítica une os dois pontos críticos dos dois componentes puros. Este tipo de diagrama é obtido quando os fluidos da mistura binária têm natureza química similar e possuem propriedades críticas de mesma magnitude. Apenas poucos sistemas envolvendo substâncias polares são conhecidos por exibirem comportamento do Tipo I (Rowlinson e Swinton, 1982; Prausnitz, Lichtenthaler e De Azevedo, 1999).

Os diagramas do Tipo II apresentam uma linha crítica adicional correspondente ao equilíbrio líquido-líquido a baixas temperaturas (temperaturas inferiores à temperatura crítica do componente mais volátil), ou seja, uma curva de transição do tipo UCST com um ponto crítico terminal superior (Prausnitz, Lichtenthaler e De Azevedo, 1999).

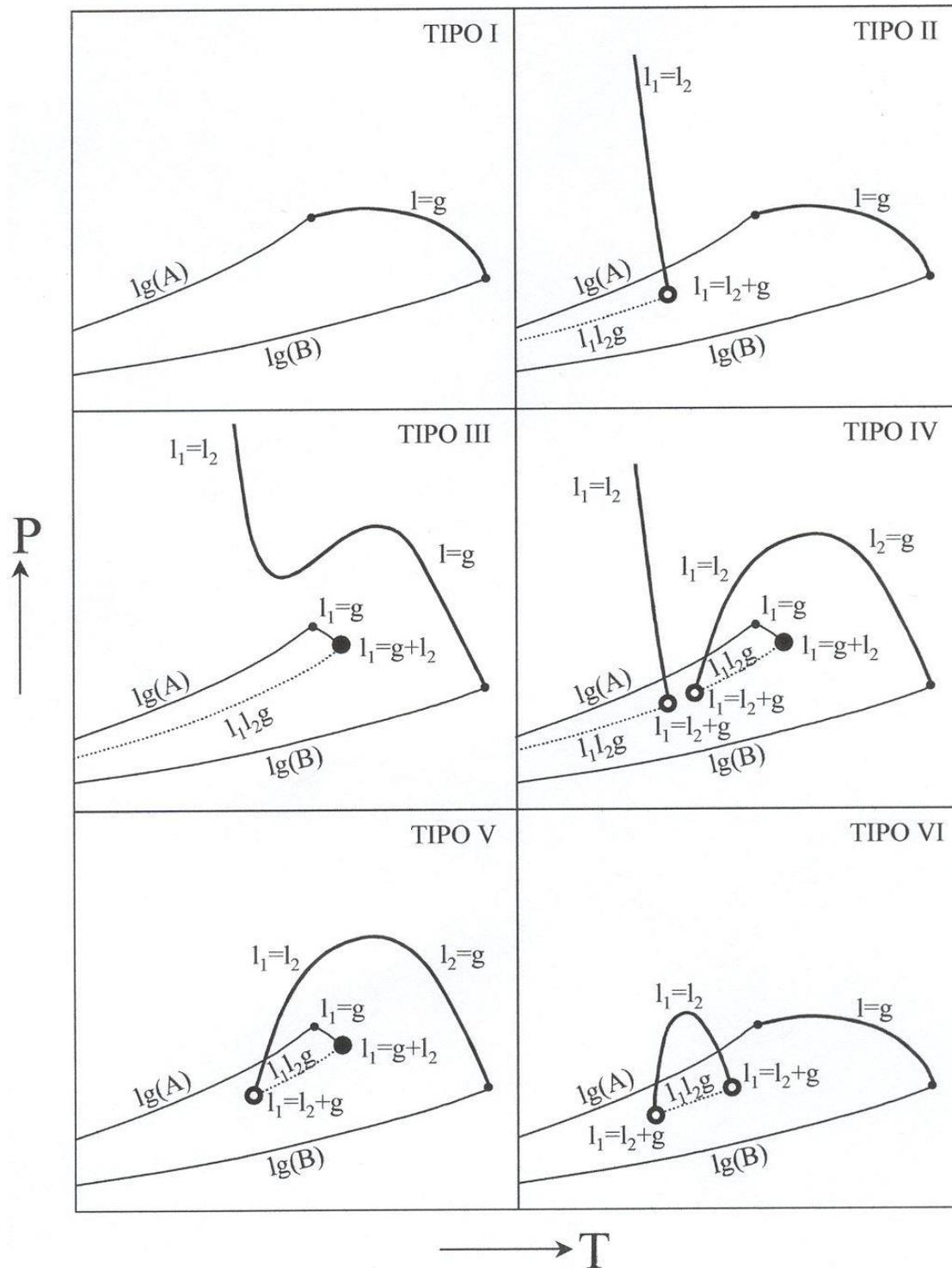


Figura 4.1. Diagramas de fases para sistemas binários (Espinoza, 2001).

Os diagramas do Tipo III não apresentam uma linha crítica unindo os pontos críticos dos dois componentes. Estes diagramas se caracterizam pela interseção de regiões de

coexistência de fases e por apresentarem uma linha divergente de pontos críticos. Uma linha crítica se estende do ponto crítico do componente menos volátil até a zona de alta pressão e outra linha crítica parte do ponto crítico do composto mais volátil e termina no UCEP.

Nos diagramas do Tipo IV, a linha crítica do componente menos volátil não se estende até a zona de alta pressão como no diagrama do Tipo III. Assim os diagramas do Tipo IV resultam da interseção de regiões de coexistência de fases e se caracterizam por exibirem uma linha crítica que parte do ponto crítico do composto menos volátil e converge para a linha de equilíbrio trifásico líquido-líquido-vapor com uma transição contínua de líquido-vapor e líquido-líquido.

O Tipo V difere do tipo IV pela ausência de uma linha crítica líquido-líquido nas regiões de baixa temperatura. Os diagramas de fases do Tipo V são, na verdade, diagramas do Tipo IV com o LCEP de baixa temperatura oculto devido à presença de uma fase sólida. Isto significa que diagramas desta natureza são difíceis de se obter experimentalmente, uma vez que, a solidificação ocorre por debaixo do LCEP ou em alguns casos até acima deste (Ndiaye, 2004).

Os diagramas do Tipo VI são caracterizados por duas linhas críticas, uma conecta os pontos críticos dos componentes da mistura e a outra conecta o UCEP com o LCEP, formando uma parábola côncava que dá origem a lacunas fechadas de imiscibilidade líquido-líquido. Este tipo de comportamento de fase é encontrado em misturas binárias nas quais as moléculas dos componentes possuem ligações do tipo ligação de hidrogênio, por esta razão vários sistemas aquosos pertencem a este grupo (Espinosa, 2001).

4 MODELAGEM TERMODINÂMICA DE EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES

Os cálculos de equilíbrio de fases consistem, basicamente, em determinar as condições de temperatura, pressão e composição para as quais ocorre o equilíbrio. Para um sistema multifásico e multicomponente que se encontra em equilíbrio mecânico e térmico, o critério necessário de equilíbrio termodinâmico é a igualdade das fugacidades de cada componente em todas as fases. Os cálculos das fugacidades são feitos através de modelos termodinâmicos.

Os modelos termodinâmicos utilizados na literatura para o estudo do comportamento de fases de sistemas a altas pressões podem ser divididos em três grupos: equações de estado (EDE) cúbicas tipo van der Waals, modelos de redes compressíveis e equações de estado derivadas da teoria de perturbação (Ndiaye, 2004).

Das EDE's cúbicas destaca-se a equação de Peng-Robinson (PR) (Equação 4.1) (Peng e Robinson, 1976), extremamente simples e eficiente para a correlação de dados experimentais, representando um dos modelos mais usados na representação do equilíbrio de fases a altas pressões.

$$P = \frac{RT}{v - b} - \frac{a}{[v(v + b) + b(v - b)]} \quad \text{Eq. (4.1)}$$

Onde P é a pressão absoluta do sistema; T a temperatura absoluta; v o volume molar; a , chamado de parâmetro de energia, fornece uma medida das forças de atração intermoleculares e b , chamado de parâmetro de covolume, é uma medida do tamanho da molécula (Prausnitz, Lichtenthaler e De Azevedo, 1999).

A extensão da equação de PR para mistura multicomponentes requer o uso de regras de misturas. Para os cálculos dos coeficientes a e b da Equação 4.1 pode ser empregada a regra de mistura quadrática de van der Waals (vdW2) (Orbey e Sandler, 1998):

$$a = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j a_{ij} \quad \text{Eq. (4.2)}$$

$$b = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j b_{ij} \quad \text{Eq. (4.3)}$$

Na Equação 4.2 a_{ij} é conhecido como o parâmetro atrativo presente na EDE em relação às moléculas dos componentes i e j , enquanto que na Equação 4.3 b_{ij} é o parâmetro que representa a repulsão entre as moléculas dos componentes do sistema. Para o cálculo de a_{ij} e b_{ij} , as seguintes regras de combinação são comumente utilizadas (Orbey e Sandler, 1998):

$$a_{ij} = (a_{ii} a_{jj})^{1/2} (1 - k_{ij}) \quad \text{Eq. (4.4)}$$

$$b_{ij} = \frac{1}{2} (b_{ii} + b_{jj}) (1 - l_{ij}) \quad \text{Eq. (4.5)}$$

Onde k_{ij} e l_{ij} são parâmetros de interação binária entre os componentes de uma mistura. O parâmetro k_{ij} está associado à energia de atração entre as moléculas (a_{ij}) e o parâmetro l_{ij} é associado à energia de repulsão entre tais moléculas (b_{ij}). Na literatura, para algumas misturas os parâmetros k_{ij} e l_{ij} são bem definidos. Entretanto quando seus valores

não estiverem disponíveis, eles podem ser obtidos a partir do ajuste do modelo termodinâmico a dados experimentais (Ndiaye, 2004).

Outro tipo de regra de misturas que pode ser empregado para os cálculos dos coeficientes a e b da Equação 4.1 é a regra de energia livre em excesso. Essa regra se baseia no fato de que modelos de propriedades em excesso, tais como a energia de Gibbs, representam bem o efeito da composição em soluções líquidas em baixas pressões. A ideia fundamental consiste em conectar as EDE e os modelos de energia em excesso, usando a relação existente entre o coeficiente de fugacidade, obtido a partir da EDE, e o coeficiente de atividade, obtido através do modelo de energia em excesso. Existem várias versões de regras de mistura deste tipo na literatura, uma das mais conhecidas é a de Wong-Sandler (WS) (Wong e Sandler, 1992).

Utilizando a regra de WS, os coeficientes a e b da Equação 4.1 são dados por:

$$\frac{a}{RT} = Q \frac{D}{1 - D} \quad \text{Eq. (4.6)}$$

$$b = \frac{Q}{1 - D} \quad \text{Eq. (4.7)}$$

Onde,

$$Q = \sum_i \sum_j x_i x_j \left(b_{ij} - \frac{a_{ij}}{RT} \right) \quad \text{Eq. (4.8)}$$

$$D = \sum_i x_i \frac{a_i}{b_i RT} + \frac{G^{EX}(T, P, \mathbf{x})}{CRT} \quad \text{Eq. (4.9)}$$

Para a equação de PR a constante C é dada por:

$$C = -\frac{1}{\sqrt{2}} \ln(1 + \sqrt{2}) \quad \text{Eq. (4.10)}$$

5 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, a demanda por produtos de alta qualidade, associada à busca intensa pela utilização de tecnologias “verdes” vem atraindo grande interesse em diferentes setores. Essa nova situação reflete diretamente nos processos industriais, uma vez que a qualidade do produto final está associada à tecnologia empregada na sua produção.

No que tange aos processos industriais, a tecnologia de fluidos pressurizados tem-se apresentado como promessa de alternativa economicamente viável e ecologicamente correta em vários processos. Exemplos podem ser citados na indústria farmacêutica, alimentícia e biomédica, onde a exigência por produtos de alta pureza e qualidade faz com que esses fluidos sejam progressivamente empregados para a extração de ingredientes ativos, em substituição às técnicas de separação convencionais. Outro avanço importante da utilização de fluidos comprimidos, do ponto de vista de engenharia, é a possibilidade de combinar reação e separação dentro de um processo integrado (Bertucco e Vetter, 2001; Xu, Huang e He, 2008).

Nesse sentido, o estudo do equilíbrio de fases é fundamental para o conhecimento dos fenômenos que ocorrem a altas pressões.

O L-ácido láctico foi escolhido para a realização dessa parte do trabalho porque através desse monômero é realizada a síntese do polímero biodegradável Poli (L-lactídeo) que pode ser utilizado como agente encapsulante de extratos, por apresentar biocompatibilidade e biodegradabilidade. É uma alternativa viável para a utilização de extratos vegetais em alimentos, uma vez que se pode garantir uma liberação contínua de extrato ocasionando uma ação mais prolongada e eficaz dele, proporcionando um maior *shelf-life* de produtos alimentícios. Apesar da síntese de biopolímeros não fazer parte do objetivo do presente projeto, os dados de equilíbrio de fases de sistemas com o L-ácido láctico obtidos podem ser de grande valia para estudos posteriores.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo do equilíbrio de fases a altas pressões dos sistemas complexos L-ácido láctico + (propano + etanol) e L-ácido láctico + (CO₂ + etanol) a altas pressões.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar os dados de equilíbrio de fases dos sistemas complexos L-ácido láctico + (propano + etanol) e L-ácido láctico + (CO₂ + etanol) em temperaturas de 323,15 a 353,15 K e pressões até 25 MPa.

Realizar a modelagem termodinâmica dos dados de equilíbrio de fases obtidos.

REFERÊNCIAS

BERTUCCO, A.; VETTER, G. **High Pressure Process Technology: fundamentals and applications**. Elsevier, Amsterdam, 2001.

BRUNNER, G. **Gas extraction**. Ed. Techniques Ingénieur, 1994.

CARVALHO, R. N.; CORAZZA, M. L.; CARDOZO-FILHO, L.; MEIRELES, M. A. A. Phase equilibrium for (camphor+ CO₂), (camphor+ propane), and (camphor+ CO₂+ propane). **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 51, n. 3, p. 997-1000, 2006.

CHARIN, R. M. **Equilíbrio de fases do DMF e NMP em Propano**. (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 87 p. 2010.

CORAZZA, M. L. **Equilíbrio de Fases do Sistema Reacional para a Oxidação do Limoneno em CO₂-SC**. (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. p. 2002.

DARIVA, C. **Equilíbrio de fases a altas pressões em sistemas com polipropilenos: dados experimentais e modelagem SAFT**. (Doutorado). Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia-COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 190 p. 2000.

DOHRN, R.; BRUNNER, G. High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (1988–1993). **Fluid Phase Equilibria**, v. 106, n. 1–2, p. 213-282, 1995.

ESPINOSA, S. N. **Procesamiento supercrítico de productos naturales modelado, análisis y optimización**. (Doutorado). Planta Piloto de Ingeniería Química, Universidad Nacional Del Sur, Bahia Blanca/Argentina. p. 2001.

FOLIE, B.; RADOSZ, M. Phase equilibria in high-pressure polyethylene technology. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 34, n. 5, p. 1501-1516, 1995.

KONTOGEORGIS, G. M.; SARAIVA, A.; FREDENSLUND, A.; TASSIOS, D. P. Prediction of liquid-liquid equilibrium for binary polymer solutions with simple activity coefficient models. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 34, n. 5, p. 1823-1834, 1995.

MELO, S. A. B. V. D. **Desterpenação do Óleo Essencial da Laranja Usando CO₂ Supercrítico**. (Doutorado). Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p. 1997.

NDIAYE, P. M. **Equilíbrio de fases de óleos vegetais e de biodiesel em co₂, propano e n-butano**. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p. 2004.

ORBEY, H.; SANDLER, S. I. **Modeling vapor-liquid equilibria: cubic equations of state and their mixing rules**. Cambridge University Press, 1998.

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.

PRAUSNITZ, J. M.; LICHTENTHALER, R. N.; DE AZEVEDO, E. G. **Molecular Theory of Fluid-Phase Equilibria**. Third Edition. Prentice Hall: Upper Saddle River, N. J., 1999.

ROWLINSON, J.; SWINTON, F. **Liquids and liquids mixtures**. Third edition. Butterworth & Co, London, 1982.

ROZZI, N. L.; SINGH, R. K. Supercritical Fluids and the Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 1, p. 33-44, 2002.

TAKEUCHI, T. M.; LEAL, P. F.; FAVARETO, R.; CARDOZO-FILHO, L.; CORAZZA, M. L.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Study of the phase equilibrium formed inside the flash tank used at the separation step of a supercritical fluid extraction unit. **The Journal of supercritical fluids**, v. 43, n. 3, p. 447-459, 2008.

VAN KONYNENBURG, P.; SCOTT, R. Critical lines and phase equilibria in binary van der Waals mixtures. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences**, v. 298, n. 1442, p. 495-540, 1980.

WONG, D. S. H.; SANDLER, S. I. A theoretically correct mixing rule for cubic equations of state. **AIChE Journal**, v. 38, n. 5, p. 671-680, 1992.

XU, H.-N.; HUANG, W.-N.; HE, C.-H. Modeling for extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi using n-butanol/water two-phase solvent system. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 3, p. 590-595, 2008.

**CAPÍTULO 5 – HIGH-PRESSURE PHASE EQUILIBRIUM DATA FOR THE
SYSTEMS L-LACTIC ACID + (PROPANE + ETHANOL) AND L-LACTIC
ACID + (CARBON DIOXIDE + ETHANOL)**

Isabel C. N. Debien, Aline A. Rigo, Marcio A. Mazutti, J. Vladimir Oliveira, M. Angela A.
Meireles

Artigo publicado no periódico *The Journal of Supercritical Fluids*, 79, 27-31, 2013.

ISSN: 0896-8446. DOI: 101016.2013.01.013

AVISO DE DIREITO DE AUTOR

Este artigo é de propriedade da *Elsevier*. Você pode baixar cópia do mesmo em um único computador, para fins pessoais ou não comerciais de uso temporário, levando em conta os direitos de autor e outros avisos da marca. No entanto, nenhum conteúdo do artigo baixado pode ser copiado, reproduzido, distribuído, republicado ou postado. Também é proibida a modificação do conteúdo do artigo para qualquer propósito, o que constitui uma violação dos direitos autorais da *Elsevier* e / ou seus fornecedores.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu



High-pressure phase equilibrium data for the L-lactic acid + (propane + ethanol) and the L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) systems

Isabel C.N. Debien^a, Aline A. Rigo^b, Marcio A. Mazutti^c, J. Vladimir Oliveira^d, M. Angela A. Meireles^{a,*}

^a DEA/FEA (School of Food Engineering)/UNICAMP, Campinas, 13083-862 SP, Brazil

^b Department of Food Engineering, URI – Erechim Campus, Erechim, RS 99700-000, Brazil

^c Department of Chemical Engineering, UFSM, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^d Department of Chemical and Food Engineering, UFSC, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2012

Received in revised form 29 January 2013

Accepted 29 January 2013

Keywords:

L-lactic acid
Carbon dioxide
Propane
Phase equilibrium
Ethanol

ABSTRACT

Biodegradable polymers have received increased attention due to their potential applications in the medicine and food industries; in particular, poly(L-lactic acid) (PLA) is of primary importance because of its biocompatibility and resorbable features. Recently, the synthesis of this biopolymer through the enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of L-lactic acid in a compressed fluid has been considered promising. The aim of this work was to report the phase equilibrium data (cloud points) of the L-lactic acid + (propane + ethanol) and the L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) systems. The phase equilibrium experiments were conducted in a variable-volume view cell employing the static synthetic method. These experiments were conducted in the temperature range of 323.15–353.15 K and at pressures up to 25 MPa; the mass ratio of ethanol to either CO₂ or propane was maintained at 1:9. The L-lactic acid + (propane + ethanol) system exhibited vapor–liquid, liquid–liquid and vapor–liquid–liquid transitions, whereas the L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) system only exhibited liquid–liquid type transitions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The production of high-purity biodegradable polymers is an important issue because of the relevant applications of these polymers in the medicine and food industries. In particular, poly(L-lactic acid) (PLA) is of primary importance mainly due to the biocompatibility and resorbable features of this polymer [1]. Lactic acid, which is used as a raw material in the synthesis of PLA, is one of the simplest chiral molecules and is usually found as a mixture of two stereoisomers (L- and D-lactic acid) [2,3].

Another route for PLA synthesis comprises the ring-opening polymerization of lactide, which is the cyclic diester of lactic acid, i.e., 2-hydroxypropionic acid, at high pressures [4,5]. In fact, high-pressure (supercritical fluid) technology has recently gained increased attention in the design of processes that produce biodegradable polymers, such as the synthesis of polyesters [6] and poly(L-lactide) microspheres [7], the lipase-catalyzed synthesis of poly(L-lactide) [8], the polymerization of ϵ -caprolactone [9–11], the chemoenzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone-block-methyl methacrylate) [12] and the production of PDLLA/HA composite foams [13].

Knowledge of the phase equilibria of the reaction system, which is composed of the monomer, the biodegradable polymer and the supercritical/compressed solvent, as well as the possible presence of a co-solvent, plays a crucial role in the development and optimization of the polymerization reaction because the location of the phase boundary of the system is important for the establishment of appropriate reaction conditions [14,15].

The use of compressed gases as solvents for enzyme-catalyzed reactions may be a promising route for the complete elimination of solvent traces from reaction products and can be advantageous in terms of energy consumption, easier product recovery, adjustable solvation ability and the reduction of side reactions. It is well known that carbon dioxide is used as the solvent in many applications, but its non-polarity may lead to a very poor solubility of monomers and polymers. In addition, the hydrophilic characteristics of CO₂ over wide pressure ranges may negatively affect the activity of enzymes [16–20]. Nevertheless, it has been shown that pressurized propane may be suitable as a reaction medium for enzyme-catalyzed bioconversions because near-critical propane presents a dielectric constant that is comparable to that of CO₂ [21] and because the phase transition pressures that are generally found in systems composed of high-molecular-weight compounds and propane are much lower than those found in systems that include CO₂ [22,23].

Phase equilibrium data of the L-lactide monomer and of L-lactic-acid-based polymers of low molecular weight in supercritical

* Corresponding author. Tel.: +55 19 35214033; fax: +55 19 35214027.
E-mail address: meireles@fea.unicamp.br (M.A.A. Meireles).

carbon dioxide have been reported [24,25]. However, to our knowledge, data on the phase behavior of L-lactic acid and carbon dioxide in the presence of a co-solvent are not found in the literature. Taking into account the fact that the addition of a co-solvent may considerably decrease the phase transition pressures and enhance the mass transfer of the system, ethanol was used as a co-solvent in this work because it is a “green”, food-grade GRAS solvent that can be produced from renewable sources. Consequently, this study investigates the phase equilibrium behavior of the L-lactic acid + (propane + ethanol) and the L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) systems.

2. Experimental

2.1. Materials

L-lactic acid (CAS # 79-33-4) was purchased from Sigma–Aldrich (minimum purity of 98%), used without further purification and stored under a nitrogen atmosphere. The monomer water content was measured using the Karl Fischer titration method (Mettler Toledo Model DL 50) and found to be 1.068 wt.%. The solvents used were carbon dioxide (mass fraction purity of 99.9% in the liquid phase) and propane (99.5% purity), both of which were purchased from White Martins S.A. Ethanol was used as a co-solvent (Vetec, 99.8% purity).

2.2. Phase equilibrium apparatus and procedure

The phase equilibrium experiments were conducted employing the static synthetic method in a high-pressure variable-volume view cell. The experimental apparatus and procedure have been described in detail in a variety of studies [14,15,26–31] and extensively validated [32–34]. The experimental apparatus was employed to conduct the experiments in the temperature range of 323.15–353.15 K and at pressures up to 25 MPa; the mass ratio of ethanol to either CO₂ or propane was maintained constant at 1:9. The overall mass fraction of the (CO₂ + ethanol) mixture was varied from 0.930 to 0.990 at intervals of 0.010, whereas the overall mass fraction of the (propane + ethanol) mixture was varied from 0.950 to 0.990 at intervals of 0.005. The uncertainty in the pressure measurements was approximately 0.03 MPa, whereas the uncertainty in the temperature of the mixture inside the cell was 0.1 K. Based on the uncertainty in the CO₂ and propane loadings and in the heaviest weighing of the compounds, the uncertainty in the global composition of the mixture was estimated to be lower than 0.5% of the total weight.

3. Results and discussion

Fig. 1 presents the pressure–temperature diagram obtained for the (propane + ethanol) + L-lactic acid system for overall mass fractions of the (ethanol + propane) mixture of 0.950 and 0.955. As shown in the figure, this system was found to exhibit both vapor-liquid-liquid (VLE) and liquid-liquid (LLE) phase transitions (Table 1). In addition, an increase in the temperature clearly leads to a reduction in the LLE immiscibility region and the transition pressure values with a progressive disappearance of the three-phase VLE coexistence curve. This behavior is characteristic of UCST (Upper Critical Solution Temperature) phase transitions, in which an increase in the temperature leads to a decrease in the pressure transition values. Moreover, some scattering in the VLE data is expected because uncertainties in the pressure measurements are unavoidable.

Fig. 2 shows the pressure–temperature diagram of the (propane + ethanol) + L-lactic acid system for overall mass fractions

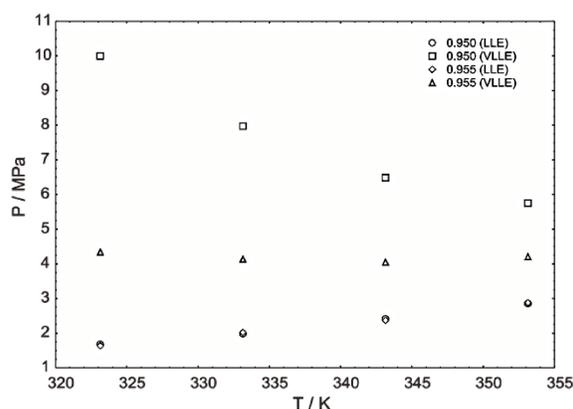


Fig. 1. Pressure–temperature diagram of the (propane + ethanol) + L-lactic acid system for overall mass fractions of the (propane + ethanol) mixture of 0.950 and 0.955.

of the (ethanol + propane) mixture between 0.960 and 0.990. As shown in the figure, vapor–liquid bubble point (VLE-BP) transitions (Table 1), which are characterized by the formation of bubbles from the mixture in the top of the equilibrium cell during depressurization, were recorded. The figure also shows that an increase in the temperature results in an increase in the system pressure.

Fig. 3 depicts the pressure–composition diagram for the (propane + ethanol) + L-lactic acid system in the temperature range of 323.15–353.15 and at pressures up to 10 MPa. As shown, all of the overall mass fraction of the solvent mixture (propane + ethanol) exhibits the presence of a vapor–liquid bubble point (VLE-BP) phase transition. An acceptable scattering of the pressure values was also observed in the VLE data.

As shown in Figs. 4 and 5, the behavior of the (carbon dioxide + ethanol) + L-lactic acid system was also investigated in the temperature range of 323.15–353.15 K and at pressures up to approximately 25 MPa. As shown, the liquid–liquid phase separation (Table 2) is characterized by a carbon dioxide-rich phase, which is thus poor in monomer, and an organic-solvent-rich phase (monomer-rich phase). In this system, which exhibits LCST behavior, an increase in the temperature results in the expansion of the system. In simple terms, the anti-solvent action of carbon dioxide

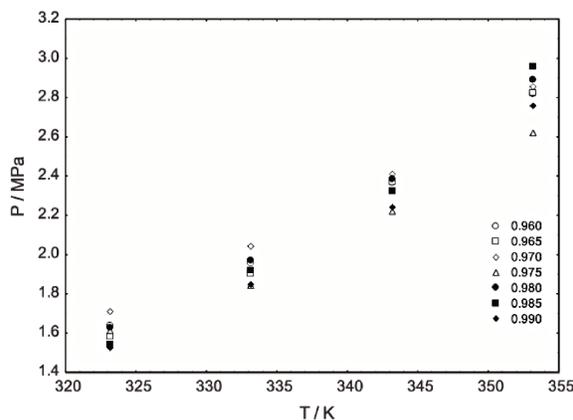


Fig. 2. Pressure–temperature diagram of the (propane + ethanol) + L-lactic acid system for overall mass fractions of the (propane + ethanol) mixture of 0.960 and 0.990 (VLE-BP).

Table 1
Phase equilibrium data for the system (propane + ethanol) (1)/L-lactic acid (2).

T (K)	P (MPa)	Transition type	T (K)	P (MPa)	Transition type
$w_1 = 0.9499$		$w_2 = 0.0501$	$w_1 = 0.9729$		$w_2 = 0.0271$
323.15	1.676	VLE	323.15	1.710	VLE-BP
333.15	1.983	VLE	333.15	2.045	VLE-BP
343.15	2.408	VLE	343.15	2.415	VLE-BP
353.15	2.855	VLE	353.15	2.860	VLE-BP
$w_1 = 0.9499$		$w_2 = 0.0501$	$w_1 = 0.9747$		$w_2 = 0.0253$
323.15	9.998	LLE	323.15	1.615	VLE-BP
333.15	7.973	LLE	333.15	1.845	VLE-BP
343.15	6.480	LLE	343.15	2.225	VLE-BP
353.15	5.750	LLE	353.15	2.620	VLE-BP
$w_1 = 0.9553$		$w_2 = 0.0447$	$w_1 = 0.9801$		$w_2 = 0.0199$
323.15	1.635	VLE	323.15	1.630	VLE-BP
333.15	2.020	VLE	333.15	1.975	VLE-BP
343.15	2.370	VLE	343.15	2.385	VLE-BP
353.15	2.875	VLE	353.15	2.895	VLE-BP
$w_1 = 0.9553$		$w_2 = 0.0447$	$w_1 = 0.9850$		$w_2 = 0.0150$
323.15	4.343	LLE	323.15	15.43	VLE-BP
333.15	4.140	LLE	333.15	1.920	VLE-BP
343.15	4.045	LLE	343.15	2.325	VLE-BP
353.15	4.203	LLE	353.15	2.960	VLE-BP
$w_1 = 0.9604$		$w_2 = 0.0396$	$w_1 = 0.9900$		$w_2 = 0.0100$
323.15	1.640	VLE-BP	323.15	1.530	VLE-BP
333.15	1.955	VLE-BP	333.15	1.850	VLE-BP
343.15	2.365	VLE-BP	343.15	2.245	VLE-BP
353.15	2.820	VLE-BP	353.15	2.760	VLE-BP
$w_1 = 0.9653$		$w_2 = 0.0347$			
323.15	1.585	VLE-BP			
333.15	1.907	VLE-BP			
343.15	2.370	VLE-BP			
353.15	2.825	VLE-BP			

T, temperature (K); P, pressure (MPa); w stands for the mass fraction of components 1 and 2, V, vapour phase; L, liquid phase; E, equilibrium; BP, bubble point.

tends to swell and dissolve the organic solvent, thereby reducing its solvent strength. As a consequence, greater pressures are necessary to attain a one-phase-system region. In the case of a strong organic solvent, the increase in the monomer mass fraction has a less pronounced effect because a smaller amount of organic solvent is needed for the dissolution of the monomer in the organic-solvent-rich liquid phase. Thus, the expansion of the system, either due to an increase in the temperature or an increase in the carbon dioxide mass fraction, has a smaller effect compared to that observed in the case in which the organic solvent is not a strong solvent for the monomer.

Safe measurements for overall compositions of the (propane+ethanol) and the (carbon dioxide+ethanol) mixtures of less than 0.950 and 0.930, respectively, were attempted. However, no dissolution (solubilization) was observed within the pressure operation limit of the phase equilibrium apparatus (30 MPa). It is likely that mass transfer limitations, which were experimentally verified and visually observed through the sapphire windows, hindered the formation of translucent phases or the attainment of a one-phase homogeneous region, even after a 1-h agitation of the solution at constant temperature and pressure [31].

Table 2
Phase equilibrium data for the system (carbon dioxide + ethanol) (1)/L-lactic acid (2).

T (K)	P (MPa)	Transition type	T (K)	P (MPa)	Transition type
$w_1 = 0.9337$		$w_2 = 0.0663$	$w_1 = 0.9714$		$w_2 = 0.0286$
323.15	20.585	LLE	323.15	10.475	LLE
333.15	22.295	LLE	333.15	12.805	LLE
343.15	23.690	LLE	343.15	14.870	LLE
353.15	25.230	LLE	353.15	16.765	LLE
$w_1 = 0.9411$		$w_2 = 0.0589$	$w_1 = 0.9801$		$w_2 = 0.0199$
323.15	17.495	LLE	323.15	9.910	LLE
333.15	19.760	LLE	333.15	11.935	LLE
343.15	21.655	LLE	343.15	13.975	LLE
353.15	23.240	LLE	353.15	15.695	LLE
$w_1 = 0.9515$		$w_2 = 0.0485$	$w_1 = 0.9895$		$w_2 = 0.0105$
323.15	15.030	LLE	323.15	8.865	LLE
333.15	17.475	LLE	333.15	10.775	LLE
343.15	19.385	LLE	343.15	12.570	LLE
353.15	20.435	LLE	353.15	13.750	LLE
$w_1 = 0.9604$		$w_2 = 0.0396$			
323.15	14.035	LLE			
333.15	16.830	LLE			
343.15	18.030	LLE			
353.15	20.570	LLE			

T, temperature (K); P, pressure (MPa); w stands for the mass fraction of components 1 and 2; L, liquid phase; E, equilibrium.

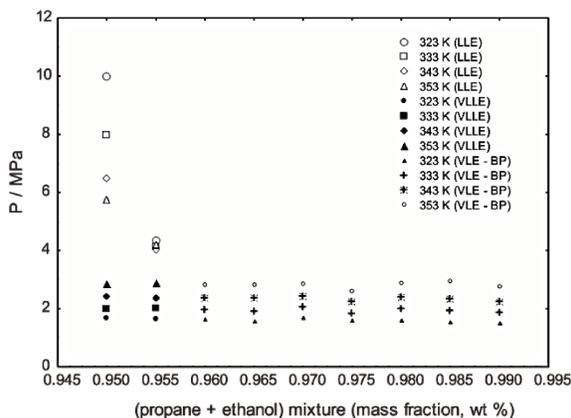


Fig. 3. Pressure–composition diagram of the system (propane + ethanol) + L-lactic acid system.

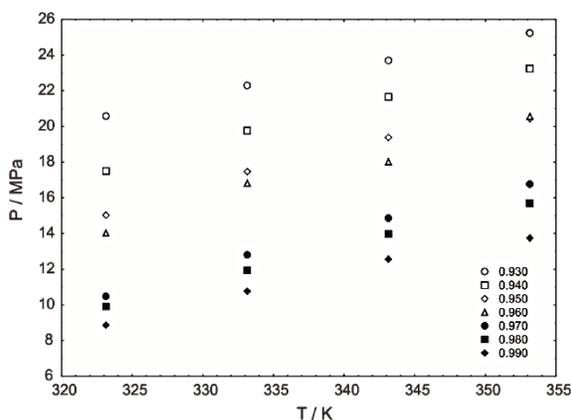


Fig. 4. Pressure–temperature diagram of the (carbon dioxide + ethanol) + L-lactic acid system (LLE).

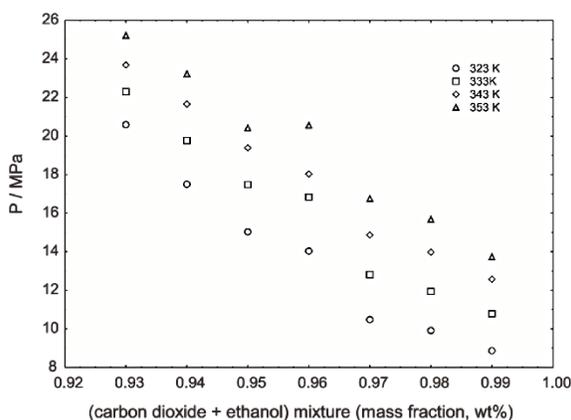


Fig. 5. Pressure–composition diagram of the (carbon dioxide + ethanol) + L-lactic acid system (LLE).

4. Conclusions

In this work, the phase behavior of the (propane + ethanol) + L-lactic acid and the (carbon dioxide + ethanol) + L-lactic acid systems were investigated in the temperature range of 323.15–353.15 K, at a solvent (mixture) composition range of 0.930–0.990 and at phase transition pressures up to 10 MPa and 25 MPa, respectively. The results show that the (propane + ethanol) + L-lactic acid system exhibits a UCST type transition and UCEP behavior, whereas the (carbon dioxide + ethanol) + L-lactic acid system exhibits LCST behavior. The phase equilibrium data reported in this work provide useful information for the development and optimization of polymer synthesis because it allows the understanding of the phenomena that occur at high pressures and may be valuable for appropriate reaction system design.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge CAPES/PROCAD 244/2007 and CNPq for the financial support and scholarships.

References

- [1] C.C. Chen, J.Y. Chueh, H. Tseng, H.M. Huang, S.Y. Lee, Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends, *Biomaterials* 24 (2003) 1167–1173.
- [2] S. Dutkiewicz, D. Lapienis, W. Tomaszewski, Synthesis of poly (L-lactic acid) by polycondensation method in solution, *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 11 (2003) 66–70.
- [3] J. Lunt, Large-scale production, properties and commercial applications of poly-lactic acid polymers, *Polymer Degradation and Stability* 59 (1998) 145–152.
- [4] R.A. Auras, B. Harte, S. Selke, R. Hernandez, Mechanical, physical and barrier properties of poly (lactic acid) films, *Journal of Plastic Film & Sheeting* 19 (2003) 123–125.
- [5] V.N. Emel'yanenko, S.P. Verevkin, A.A. Pimerzin, The thermodynamic properties of D,L- and L-lactides, *Chemical Thermodynamics and Thermochemistry* 83 (2009) 2211–2220.
- [6] I.K. Varma, A.C. Albertsson, R. Rajkhowa, R.K. Srivastava, Enzyme catalyzed synthesis of polyesters, *Progress in Polymer Science* 30 (2005) 949–981.
- [7] C.S. Yoon, H.D. Park, S.Y. Kim, High molecular weight poly(L-lactide) and its microsphere synthesized in the supercritical dimethyl ether, *Macromolecular Symposia* 249–250 (2007) 515–520.
- [8] R. García-Arrazola, D.A. Guerrero, M. Gimeno, E. Bárzano, Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 51 (2009) 197–201.
- [9] F.C. Loeker, C.J. Duxbury, R. Kumar, W. Gao, R. Gross, S.M. Howdle, Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide, *Macromolecules* 37 (2004) 2450–2453.
- [10] V. Bergeot, T. Tassaing, M. Besnard, F. Cansell, A.F. Mingotaud, Anionic ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide: parameters influencing the reactivity, *Journal of Supercritical Fluids* 28 (2004) 249–255.
- [11] F. Stassin, O. Halleux, R. Jérôme, Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide, *Macromolecules* 34 (2001) 775–781.
- [12] J. Zhou, S. Villarroja, W. Wang, M.F. Wyatt, C.J. Duxbury, K.J. Thurecht, S.M. Howdle, One-step chemoenzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone-block-methyl methacrylate) in supercritical CO₂, *Macromolecules* 39 (2006) 5352–5358.
- [13] X. Teng, J. Ren, S. Gu, Preparation and characterization of porous PDLA/HA composite foams by supercritical carbon dioxide technology, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterial* 81B (2006) 185–193.
- [14] J.P. Bender, M. Feitein, E. Franceschi, M.L. Corazza, J.V. Oliveira, Phase behaviour of binary systems of lactones in carbon dioxide, *Journal of Chemical Thermodynamics* 42 (2010) 48–53.
- [15] J.P. Bender, M. Feitein, M.A. Mazutti, E. Franceschi, M.L. Corazza, J.V. Oliveira, Phase behaviour of the ternary system {poly(ϵ -caprolactone)+carbon dioxide+dichloromethane}, *Journal of Chemical Thermodynamics* 42 (2010) 229–233.
- [16] Z. Knez, M. Habulin, Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review, *Journal of Supercritical Fluids* 23 (2002) 29–34.
- [17] R. Kumar, S. Madras, J. Modak, Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide, *Industrial & Engineering Chemical Research* 43 (2004) 1568–1573.
- [18] P.G. Jessop, W. Leitner, *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*, Wiley-VCH, Weinheim, USA, 1999.
- [19] J.V. Oliveira, D. Oliveira, Kinetics of enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in SC-CO₂, *Industrial & Engineering Chemical Research* 39 (2000) 4450–4455.

- [20] H. Nakaya, O. Miyawaki, G. Nakamura, Determination of log P for pressurized carbon dioxide and its characterization as a medium for enzyme reaction, *Enzyme and Microbial Technology* 28 (2006) 176–180.
- [21] M. Habulin, Z. Knez, Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76 (2002) 1260–1265.
- [22] M. Lanza, W.L. Priamo, J.V. Oliveira, C. Dariva, D. Oliveira, The effect of temperature, pressure, exposure time and depressurization rate on lipase activity in SC-CO₂, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113 (2005) 181–188.
- [23] P.M. Ndiaye, E. Franceschi, D. Oliveira, C. Dariva, F.W. Tavares, J.V. Oliveira, Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures, *Journal of Supercritical Fluids* 37 (2006) 29–33.
- [24] J. Gregorowicz, Phase behaviour of L-lactide in supercritical carbon dioxide at high pressures, *Journal of Supercritical Fluids* 46 (2008) 105–111.
- [25] J. Gregorowicz, P. Bernatowicz, Phase behaviour of L-lactic acid based polymers of low molecular weight in supercritical carbon dioxide at high pressures, *Journal of Supercritical Fluids* 51 (2009) 270–277.
- [26] P.M. Ndiaye, E. Franceschi, D. Oliveira, C. Dariva, F.W. Tavares, J.V. Oliveira, Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures, *Journal of Supercritical Fluids* 37 (2006) 29–37.
- [27] F.M. Ferreira, L.P. Ramos, P.M. Ndiaye, M.L. Corazza, Phase behavior of (CO₂ + methanol + lactic acid) system, *Journal of Chemical Thermodynamics* 43 (2011) 1074–1082.
- [28] S.R. Rosso, E. Franceschi, G.R. Borges, M.L. Corazza, J.V. Oliveira, S.R.S. Ferreira, Phase equilibrium measurements of ternary systems formed by linoleic acid and linolenic acids in carbon dioxide/ethanol mixtures, *Journal of Chemical Thermodynamics* 41 (2009) 1254–1258.
- [29] R.M. Charin, M.L. Corazza, P.M. Ndiaye, A. Rigo, M.A. Mazutti, J.V. Oliveira, Phase equilibrium data and thermodynamic modelling of the system (propane + DMF + methanol) at high pressures, *Journal of Chemical Thermodynamics* 43 (2011) 413–419.
- [30] F.V. Corrêa, S.R.S. Comim, A.M. Cesaro, A.A. Rigo, M.A. Mazutti, H. Hense, J.V. Oliveira, Phase equilibrium data for the ternary system (propane + chloroform + oryzanol), *Journal of Chemical Thermodynamics* 43 (2011) 34–38.
- [31] I. Dalmolin, M.A. Mazutti, E.A.C. Batista, M.A.A. Meireles, J.V. Oliveira, Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent, *Journal of Chemical Thermodynamics* 42 (2010) 797–801.
- [32] G.R. Stuart, C. Dariva, J.V. Oliveira, High-pressure vapor-liquid equilibrium data for CO₂-orange peel oil, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 17 (2000) 181–189.
- [33] G.R. Borges, A. Junges, E. Franceschi, F.C. Corazza, M.L. Corazza, J.V. Oliveira, C. Dariva, High-pressure vapor-liquid equilibrium data for systems involving carbon dioxide + organic solvent + β-carotene, *Journal of Chemical & Engineering Data* 52 (2007) 1437–1441.
- [34] M.C. Esmelindro, O.A.C. Antunes, E. Franceschi, G.R. Borges, M.L. Corazza, J.V. Oliveira, W. Linhares, C. Dariva, Phase behaviour of reactant and products of cyclohexane oxidation in compressed CO₂, *Journal of Chemical & Engineering Data* 53 (2008) 2050–2055.

**CAPÍTULO 6 - THERMODYNAMIC MODELING OF HIGH-PRESSURE
EQUILIBRIUM DATA FOR THE SYSTEMS L-LACTIC ACID + (PROPANE +
ETHANOL) AND L-LACTIC ACID + (CARBON DIOXIDE + ETHANOL)**

Isabel C. N. Debien, Aline A. Rigo, Marcos L. Corazza, Marcio A. Mazutti, J. Vladimir
Oliveira, M. Angela A. Meireles

Short communication submetido ao periódico *The Open Chemical Engineering Journal*.

ISSN: 1874-1231.

Abstract

This short communication reports the thermodynamic modeling of high-pressure equilibrium data (cloud points) for the systems L-lactic acid + (propane + ethanol) and L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) from 323.15 K to 353.15 K and at pressures up to 25 MPa. The experimental data were modeled using the Peng-Robinson equation of state with the classical van der Waals quadratic mixing rule (PR-vdW2) and with the Wong-Sandler mixing rule (PR-WS). It is shown that the PR-vdW2 and PR-WS models were both able to satisfactorily represent the phase behavior of the system L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol). However, for the system L-lactic acid + (propane + ethanol), the PR-vdW2 model was not able to appropriately describe its phase behavior.

Keywords: carbon dioxide; ethanol; L-lactic acid; phase equilibrium; propane; thermodynamic modeling

The production of high-purity biodegradable polymers is an important issue for their potential applications in medicine and food industry. Biodegradable lactic-acid based polymers have highly promising properties and are easily synthesized from components available from renewable sources [1]. Lactic acid is one of the simplest chiral molecules and is usually found as a mixture of two stereoisomers (L- and D-lactic acid). It is used as a raw material in the synthesis of poly (L-lactic acid) (PLA)[2, 3]. In particular, PLA is important for its biocompatibility and resorbability [4].

Knowledge of the phase equilibria of the reaction system, which consists of the monomer, the biodegradable polymer and the supercritical/compressed solvent along with the possible presence of a cosolvent, plays a crucial role in the development and optimization of the reaction because the location of the phase boundary of the system is important for establishing appropriate reaction conditions [5, 6].

The phase behavior of L-lactide was studied in supercritical carbon dioxide at high pressures. The L-lactide + carbon dioxide system exhibited the solid – fluid and the liquid – vapor equilibria, which were determined in the temperature range 275 – 355 K and in the pressure range 10 – 80 MPa. This system shows the type of phase behavior where the two branches of the solid L-lactide + liquid + vapor curve end with the first and second critical endpoints [7].

Another study [1] showed the phase behavior of L-lactic acid based polymers of low molecular weight in supercritical carbon dioxide at high pressures. This system also exhibited the solid – fluid and the liquid – vapor equilibria. Supercritical carbon dioxide was a poor solvent for low molecular weight L-lactic acid based polymers. The liquid-vapor equilibrium in this system depended to a great extent on the structure of the end

groups, while for the solid – fluid equilibrium, the effect of the molecular weight was more pronounced.

A previous study [8] reported the phase equilibrium data (cloud points) of L-lactic acid + (propane + ethanol) and L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol). The phase equilibrium experiments were conducted in a variable-volume view cell employing the static synthetic method from 323.15 K to 353.15 K and at pressures up to 25 MPa; the mass ratio of ethanol to carbon dioxide or propane was maintained at 1:9. The L-lactic acid + (propane + ethanol) exhibited vapor-liquid, liquid-liquid and vapor-liquid-liquid transitions, whereas the L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) exhibited only liquid-liquid type transitions. The L-lactic acid + (propane + ethanol) and L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) showed characteristic behavior of UCST (Upper Critical Solution Temperature) and LCST (Lower Critical Solution Temperature) phase transitions, respectively.

In addition to experimental data measurements, the development and application of thermodynamics models to represent the phase behavior of multicomponent mixtures plays a crucial role in elucidating the phenomena involved in the fractionation/separation step in the process design and optimization of, for instance, polymerization reactions performed at high pressures. The use of thermodynamics models is also relevant to establishing the process flow sheet of a chemical plant. For this purpose, cubic equations of state may be advantageously used to represent experimental phase equilibrium data, allowing process simulation to select appropriate operational conditions [9].

The thermodynamic modeling of the systems L-lactic acid + (propane + ethanol) and L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) in this work used the previously reported phase equilibrium data [8]. Based on the description of these systems at high pressures, the Peng-Robinson equation of state [10] was employed with the classical van der Waals quadratic

mixing rule (PR-vdW2) and with the Wong-Sandler mixing rule (PR-WS) [11, 12] to represent the experimental values found. The calculation procedure for modeling the experimental data of the systems investigated in this work followed the same procedure described previously by Araújo et al. [13] and Pinto et al. [14].

As briefly presented in our previous works [9, 13-16] the mixture parameter for vdW2 can be summarized as

$$a = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j a_{ij} \quad (1)$$

$$b = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j b_{ij} \quad (2)$$

with

$$a_{ij} = (a_i a_j)^{1/2} (1 - k_{ij}) \quad (3)$$

and

$$b_{ij} = \frac{1}{2} (b_i + b_j) (1 - l_{ij}) \quad (4)$$

where a_i and b_i are the parameters of the pure compounds [10], and l_{ij} and k_{ij} are adjustable parameters.

The mixture parameters a and b for the WS mixing rule are given by [11, 12]

$$\frac{a}{RT} = Q \frac{D}{1-D} \quad (5)$$

$$b = \frac{Q}{1-D} \quad (6)$$

where

$$Q = \sum_i \sum_j x_i x_j \left(b_{ij} - \frac{a_{ij}}{RT} \right) \quad (7)$$

and

$$D = \sum_i x_i \frac{a_i}{b_i RT} + \frac{G^{Ex}(T, P, \mathbf{x})}{CRT} \quad (8)$$

For PR-EoS, the constant C is given by $C = -\frac{1}{\sqrt{2}} \ln(1 + \sqrt{2})$.

The combination rule was used considering the reformulated Wong-Sandler mixing rule, by rewriting the cross second virial coefficient in the following form, as presented by Orbey and Sandler [12]:

$$\left(b_{ij} - \frac{a_{ij}}{RT} \right) = \frac{1}{2} (b_{ii} - b_{jj}) - \frac{\sqrt{a_{ii} a_{jj}}}{RT} (1 - K_{ij}) \quad (9)$$

The Non-random two-liquid model (NRTL) [17] was used for the molar excess Gibbs free energy ($G^{Ex}(T, P, \mathbf{x})$) calculation. Thus, the binary interaction parameters fitted for PR-WS model were α_{ij} , Δg_{ij} , Δg_{ji} and K_{ij} .

The binary interaction parameters for both models (PR-vdW2 and PR-WS) were estimated by minimizing the least square objective function (Equation 10) using the stochastic Simulated Annealing method, and the optimization procedure was refined using the Simplex method. The saturation pressure (bubble or dew point) was calculated by

implementing an algorithm presented by Ferrari et al. [18] and Bender et al. [5], which is based on Michelsen's work [19]. The pure component properties of carbon dioxide, propane, ethanol and L-lactic acid are presented in Table 1, including the purity, supplier, critical properties and acentric factor of all components.

The objective function used in this work was

$$OF = \sum_{i=1}^{n_{obs}} (P_i^{exp} - P_i^{cal})^2 \quad (10)$$

Where P_i^{exp} and P_i^{cal} are the calculated and experimental saturation pressure values, respectively, and n_{obs} is the number of experimental observations.

Table 1

Characteristic parameters of the pure compounds.

Compound	P_c /MPa	T_c /K	ω	M_w /(g.gmol ⁻¹)
Propane ^a	4.248	369.83	0.1523	44,094
CO ₂ ^a	7.383	304.21	0.2236	44.010
Ethanol ^a	6.140	513.90	0.6440	46.0690
L-lactic acid ^b	5.960	675.00	1.022	90.790

P_c , critical pressure; T_c , critical temperature; ω , acentric factor; M_w , molar mass.

^a [20].

^b [21].

The binary interaction parameters were estimated by minimizing the least square objective function of the experimental and calculated pressures using the stochastic particle swarm optimization method [18], and the procedure was refined using the Modified

Simplex method [22]. For the binary system {CO₂ (1) + Ethanol (2)}, the interaction parameters were taken from the literature [13]. The binary interaction parameters of PR-vdW2 and PR-WS fitted to the experimental values for the systems investigated are shown in Table 2 and Table 3, respectively. For the system {Propane (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)}, when using the PR-WS model, the NRTL model was adopted to compute the molar excess Gibbs energy [14].

Table 2

Fitted binary interaction parameters of the PR-vdW2 model used in this work.

<i>T/K</i>	<i>i - j</i>	<i>k_{ij}</i>	<i>l_{ij}</i>	<i>RMSD/MPa</i>	<i>abs error/MPa</i>
System: {Propane (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)}					
303.15	1 - 2	- 0.1795	0.1218		
	1 - 3	0.4118	- 0.4534	0.0738	0.0542
	2 - 3	0.3244	- 0.1076		
to					
343.15	System: {CO ₂ (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)}				
	1 - 2 ^a	7.8332×10^{-2}	$- 3.0999 \times 10^{-2}$		
	1 - 3	$- 1.7287 \times 10^{-2}$	$- 2.5716 \times 10^{-2}$	0.6484	0.5319
	2 - 3	7.6125×10^{-2}	$- 2.6011 \times 10^{-2}$		

RMSD: Root Mean Square Deviation; abs error: absolute error.

a [13].

Table 3

Fitted binary interaction parameters of the PR-WS model used in this work.

<i>T</i> / K	<i>i</i> - <i>j</i>	<i>g</i> _{<i>ij</i>}	<i>g</i> _{<i>ji</i>}	<i>k</i> _{<i>ij</i>}	RMSD/ MPa	abs error/MPa
System: {Propane (1) + Ethanol (2) + <i>L</i> -lactic acid (3)}						
303.15	1 - 2	543.6266	218.1799	- 0.1949		
	1 - 3	537.8335	545.2472	- 0.1105	0.4316	0.2462
	2 - 3	1817.4491	776.5565	0.3284		
to						
System: {CO ₂ (1) + Ethanol (2) + <i>L</i> -lactic acid (3)}						
343.15	1 - 2 ^a	624.5500	-89.2000	8.1199×10^{-2}		
	1 - 3	135.8659	621.3313	8.0807×10^{-2}	0.7526	0.6409
	2 - 3	778.4239	1157.0365	$- 0.1544 \times 10^{-2}$		

RMSD: Root Mean Square Deviation; abs error: absolute error.

a [13].

Fig. 1 presents the pressure-temperature diagram obtained for the {Propane (1) + Ethanol (2) + *L*-lactic acid (3)} system, where it can be observed that the PR-vdW2 model (continuous line) only fitted the vapor-liquid bubble point (VLE-BP) transition data.

Fig. 2 presents the pressure-temperature diagram obtained for the {CO₂ (1) + Ethanol (2) + *L*-lactic acid (3)} system. This diagram shows the good performance of the PR-vdW2 model (continuous line) and the adequate strategy adopted for phase equilibrium data modeling, as corroborated in Table 2 by the low values of the absolute error (abs error) and the Root Mean Square Deviation (RMSD), hence showing the good agreement between the experimental and calculated pressure transition values [23].

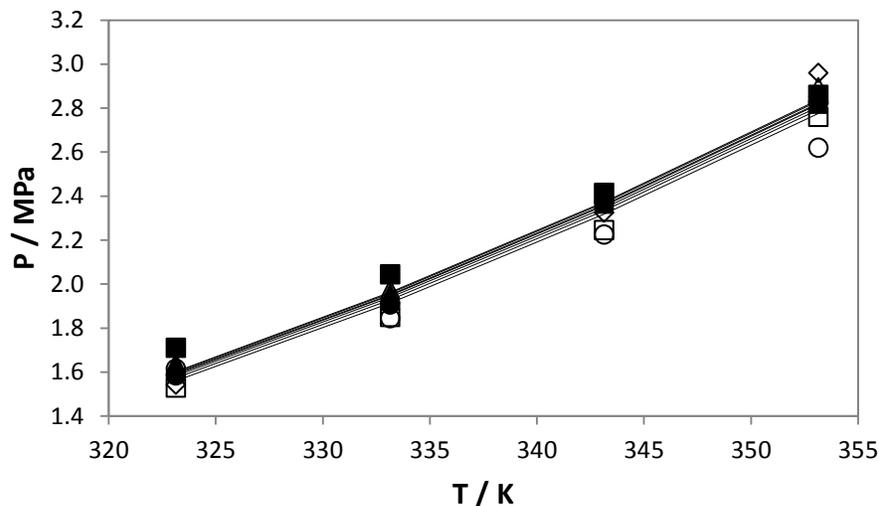


Fig. 1. Pressure-temperature diagram of the system {Propane (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)} (VLE-BP) (▲: $w_3 = 0.0396$; ●: $w_3 = 0.0347$; ■: $w_3 = 0.0271$; ○: $w_3 = 0.0253$; △: $w_3 = 0.0199$; ◇: $w_3 = 0.0150$; □: $w_3 = 0.0100$). The continuous line denotes the calculated values from PR-vdW2, using the fitted interaction parameters.

Figs. 3 and 4 present the pressure-temperature diagram obtained for the {Propane (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)} system for all overall mass fractions. These figures show that the PR-WS model (continuous line) was able to fit both the liquid-liquid (LLE) (Fig. 3) and the vapor-liquid bubble point (VLE-BP) (Fig. 4) transition data. These diagrams show the good performance of the PR-WS model (continuous line) and the adequate strategy adopted for all phase equilibrium data modeling.

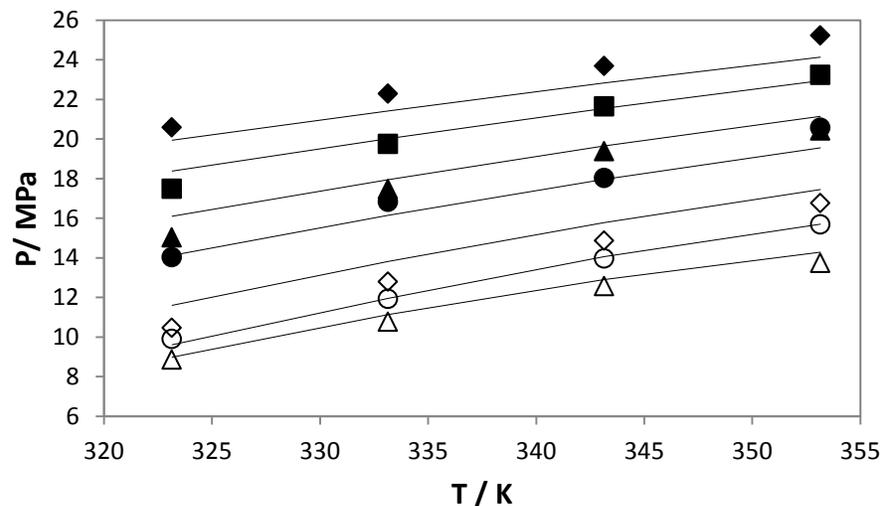


Fig. 2. Pressure-temperature diagram of the system {CO₂ (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)} (LLE) (♦: $w_3 = 0.0663$; ■: $w_3 = 0.0589$; ▲: $w_3 = 0.0485$; ●: $w_3 = 0.0396$; ◇: $w_3 = 0.0286$; ○: $w_3 = 0.0199$; △: $w_3 = 0.0105$). The continuous line denotes the calculated values from PR-vdW2, using the fitted interaction parameters.

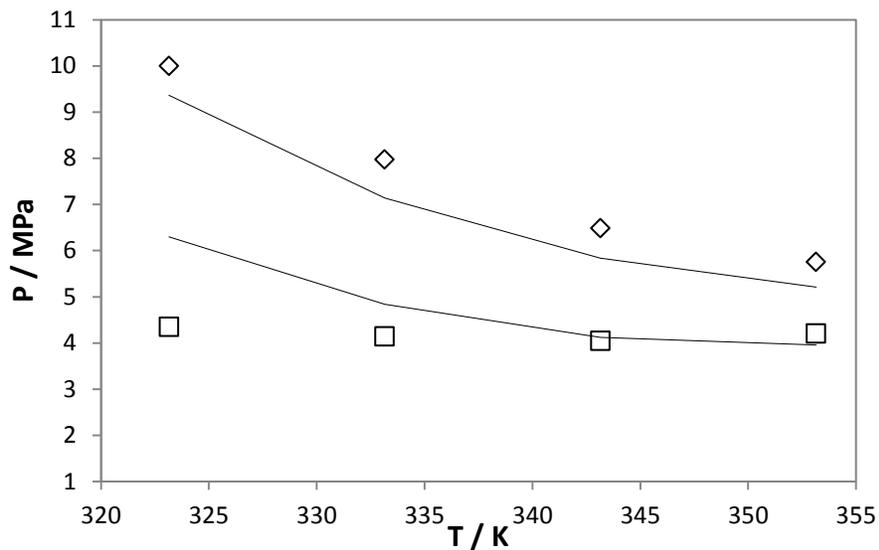


Fig. 3. Pressure-temperature diagram of the system {Propane (1) + Ethanol (2) + L-lactic acid (3)} (LLE) (◇: $w_3 = 0.0501$; □: $w_3 = 0.0447$). The continuous line denotes the calculated values from PR-WS, using the fitted interaction parameters.

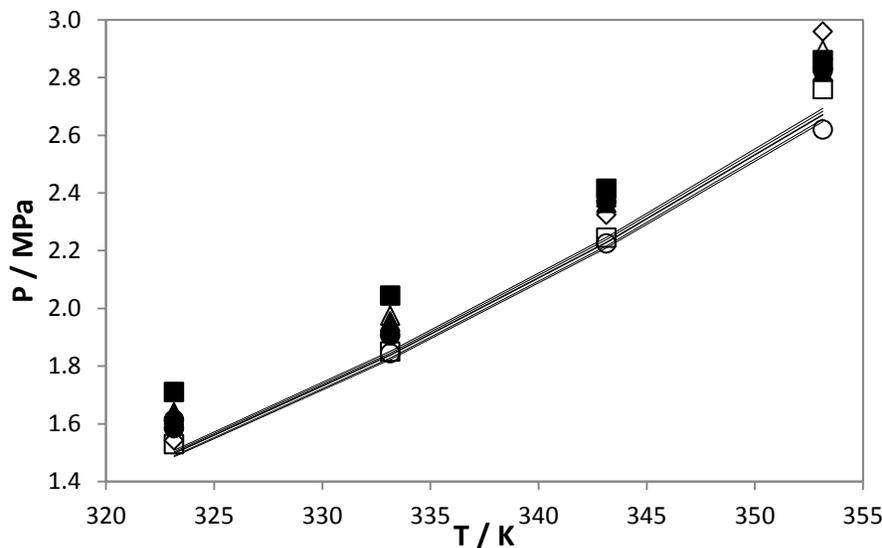


Fig. 4. Pressure-temperature diagram of the system {Propane (1) + Ethanol (2) + *L*-lactic acid (3)} (VLE-BP) (▲: $w_3 = 0.0396$; ●: $w_3 = 0.0347$; ■: $w_3 = 0.0271$; ○: $w_3 = 0.0253$; Δ: $w_3 = 0.0199$; ◇: $w_3 = 0.0150$; □: $w_3 = 0.0100$). The continuous line denotes the calculated values from PR-SW, using the fitted interaction parameters.

Fig. 5 presents the pressure-temperature diagram obtained for the system {CO₂ (1) + Ethanol (2) + *L*-lactic acid (3)}. Like the PR-vdW2 model, the PR-WS model (continuous line) showed good performance and demonstrated that the strategy adopted was adequate for the phase equilibrium data modeling. This determination can be verified by inspecting the absolute error (abs error) and Root Mean Square Deviation (RMSD) in Table 3, which are low for both systems, attesting the good agreement between the experimental and calculated (PR-WS model) pressure transition values [23].

This work reported the thermodynamic modeling of high-pressure phase equilibrium data for the systems *L*-lactic acid + (propane + ethanol) and *L*-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) in the temperature range of 323.15 K to 353.15 K and at pressures up to 25 MPa. In general, both systems investigated were modeled using the Peng-Robinson equation of

state coupled with the Wong-Sandler mixing rule. However, the Peng-Robinson equation of state with the classical van der Waals quadratic mixing rule was unable to represent the system *L*-lactic acid + (propane + ethanol), possibly due to the high asymmetry exhibited by this system in terms of the molecular size and intermolecular forces. The thermodynamic modeling performed in this work may be of great value for conducting polymerization reactions of such lactones in compressed carbon dioxide and propane.

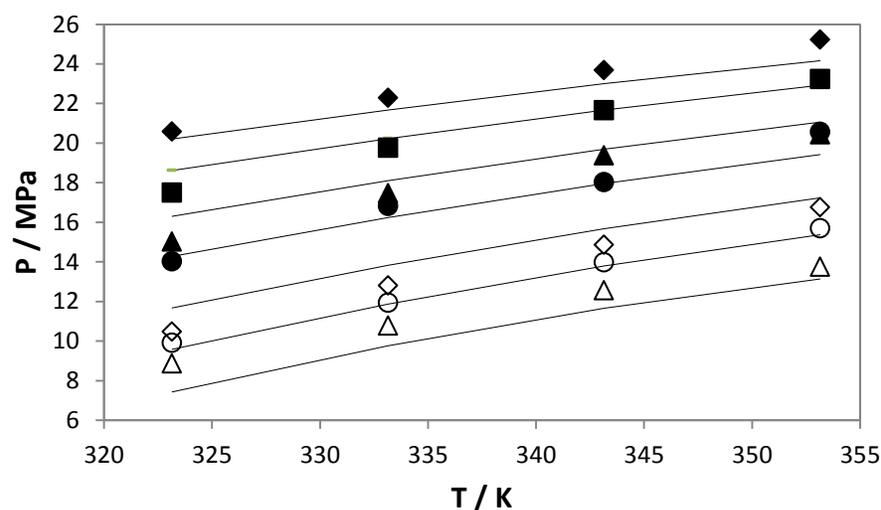


Fig. 5. Pressure-temperature diagram of the system {CO₂ (1) + Ethanol (2) + *L*-lactic acid (3)} (LLE) (◆: $w_3 = 0.0663$; ■: $w_3 = 0.0589$; ▲: $w_3 = 0.0485$; ●: $w_3 = 0.0396$; ◇: $w_3 = 0.0286$; ○: $w_3 = 0.0199$; △: $w_3 = 0.0105$). The continuous line denotes the calculated values from PR-SW, using the fitted interaction parameters.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge CAPES/PROCAD 244/2007 and CNPq grant number 151165/2010-6 for their financial support and scholarships.

List of Symbols

Abs error	absolute error
a_i and b_i	parameters of pure components
C	constant for PR-EoS
$\underline{G}^{\text{Ex}}$	molar excess Gibbs free energy
l_{ij} and k_{ij}	adjustable binary interaction parameters for PR-vdW2
LLE	liquid-liquid equilibria
M_w	molar mass
OF	objective function
P_c	critical pressure
P_i^{cal}	calculated saturation pressure
P_i^{exp}	experimental saturation pressure
PR-EoS	Peng-Robinson equation of state
PR-vdW2	Peng-Robinson equation of state with the classical van der Waals quadratic mixing rule
PR-WS	Peng-Robinson equation of state with the Wong-Sandler mixing rule
RMSD	root mean square deviation
T_c	critical temperature
VLE-BP	vapor-liquid (bubble point) equilibria
w3	mass fraction of L-lactic acid
x	molar fraction
α_{ij} , g_{ij} , g_{ji} and K_{ij}	adjustable binary interaction parameters for PR-WS
ω	acentric factor

References

- [1] J. Gregorowicz and P. Bernatowicz, "Phase behaviour of l-lactic acid based polymers of low molecular weight in supercritical carbon dioxide at high pressures," *The Journal of supercritical fluids*, vol. 51, pp. 270-277, 2009.
- [2] S. Dutkiewicz, *et al.*, "Synthesis of poly (L (+) lactic acid) by polycondensation method in solution," *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, vol. 11, pp. 66-70, 2003.
- [3] J. Lunt, "Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, pp. 145-152, 1998.
- [4] C.-C. Chen, *et al.*, "Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 1167-1173, 2003.
- [5] J. P. Bender, *et al.*, "Phase behaviour of binary systems of lactones in carbon dioxide," *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 42, pp. 48-53, 2010.
- [6] J. P. Bender, *et al.*, "Phase behaviour of the ternary system {poly(ϵ -caprolactone) + carbon dioxide + dichloromethane}," *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 42, pp. 229-233, 2010.
- [7] J. Gregorowicz, "Phase behaviour of l-lactide in supercritical carbon dioxide at high pressures," *The Journal of supercritical fluids*, vol. 46, pp. 105-111, 2008.
- [8] I. C. N. Debien, *et al.*, "High-pressure phase equilibrium data for the L-lactic acid + (propane + ethanol) and the L-lactic acid + (carbon dioxide + ethanol) systems," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 79, pp. 27-31, Jul 2013.
- [9] R. M. Charin, *et al.*, "Phase equilibrium data and thermodynamic modeling of the system propane plus NMP plus methanol at high pressures," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 55, pp. 662-670, Dec 2010.
- [10] D.-Y. Peng and D. B. Robinson, "A New Two-Constant Equation of State," *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, vol. 15, pp. 59-64, 1976.
- [11] D. S. H. Wong and S. I. Sandler, "A theoretically correct mixing rule for cubic equations of state," *AIChE Journal*, vol. 38, pp. 671-680, 1992.
- [12] H. Orbey and S. I. Sandler, *Modeling vapor-liquid equilibria: cubic equations of state and their mixing rules* vol. 1: Cambridge University Press, 1998.
- [13] O. A. S. Araújo, *et al.*, "Phase behaviour measurements for the system (carbon dioxide + biodiesel + ethanol) at high pressures," *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 47, pp. 412-419, 2012.

- [14] L. F. Pinto, *et al.*, "Phase equilibrium data and thermodynamic modeling of the system (CO₂ + biodiesel + methanol) at high pressures," *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 44, pp. 57-65, 2012.
- [15] P. S. Gaschi, *et al.*, "Phase equilibrium measurements and thermodynamic modelling for the system (CO₂+ethyl palmitate+ethanol) at high pressures," *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 57, pp. 14-21, 2013.
- [16] R. M. Charin, *et al.*, "Phase equilibrium data and thermodynamic modelling of the system (propane+ DMF+ methanol) at high pressures," *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 43, pp. 413-419, 2011.
- [17] H. Renon and J. M. Prausnitz, "Local compositions in thermodynamic excess functions for liquid mixtures," *AIChE Journal*, vol. 14, pp. 135-144, 1968.
- [18] J. C. Ferrari, *et al.*, "Application of stochastic algorithms for parameter estimation in the liquid–liquid phase equilibrium modeling," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 280, pp. 110-119, 2009.
- [19] M. L. Michelsen, "Saturation point calculations," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 23, pp. 181-192, 1985.
- [20] B. E. Poling, *et al.*, *The properties of gases and liquids*, Fifth ed. New York: McGraw-Hill, 2001.
- [21] R. Rowley, *et al.*, *DIPPR Data Compilation of Pure Chemical Properties*, 2006.
- [22] J. A. Nelder and R. Mead, "A simplex method for function minimization," *The computer journal*, vol. 7, pp. 308-313, 1965.
- [23] I. Dalmolin, *et al.*, "Phase behaviour and thermodynamic modelling for the system (grape seed oil + carbon dioxide + ethanol) at high pressures," *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 68, pp. 71-74, 2014.

CONCLUSÕES GERAIS

No estudo do comportamento cinético do processo SFE para a obtenção do extrato das raízes de Ginseng brasileiro utilizando como solvente o dióxido de carbono e etanol como cossolvente foi possível concluir que o aumento da quantidade de etanol favoreceu o processo de extração, não somente em termos de quantidade de extrato bruto obtido, como também em termos de recuperação do composto de interesse, no caso o ecdisteróide beta-ecdisona. Os resultados mostraram que o etanol possui maior seletividade que o dióxido de carbono para extrair esse composto. Dentre as condições estudadas, a que maximizou os rendimentos em termos do composto de interesse foi a pressão de 20 MPa usando como solvente de extração a mistura dióxido de carbono:etanol (10:90, v/v). Durante a primeira hora de processo foram obtidos 82 % do rendimento total e 89 % do teor de beta-ecdisona total.

No processo de PLE para a obtenção do extrato das raízes de Ginseng brasileiro o tipo de solvente afetou significativamente o rendimento global da extração (X_0), o teor de beta-ecdisona e a atividade antioxidante (AA). A temperatura e a interação temperatura e solvente afetaram significativamente o X_0 e o teor de beta-ecdisona, respectivamente. A pressão não demonstrou influência significativa para nenhum dos parâmetros avaliados.

Em termos de rendimento global o melhor desempenho da extração foi atingido à temperatura de 393 K, utilizando como solvente a mistura EtOH:H₂O (80:20, v/v). Para o teor de beta-ecdisona o melhor desempenho do processo foi obtido também a 393 K, porém utilizando o EtOH puro como solvente. Assim como para o X_0 , o solvente que resultou em maiores valores de AA dos extratos obtidos foi a mistura EtOH:H₂O (80:20, v/v).

De acordo com os resultados obtidos, a condição de PLE selecionada para o estudo da cinética de extração foi aquela em que maiores teores de beta-ecdisona foram obtidos: 393 K utilizando com solvente o etanol puro. Como a pressão não mostrou influência significativa, optou-se pelo menor valor (8 MPa) para redução do gasto de energia do processo.

A partir da curva global de extração foi possível verificar que após 26 minutos de processo (t_{CER}) aproximadamente 50 % do rendimento da extração e 67,7 % do teor de beta-ecdisona foram obtidos. O total de rendimento em termos de massa de matéria-prima obtido após 130 minutos de processo foi 7 % (base seca), sendo maior do que no processo de SFE. Foi possível observar também que na condição estudada pode estar ocorrendo uma extração reativa, uma vez que o período difusional não foi alcançado.

O custo de manufatura na condição da cinética em relação ao extrato puro e em relação a beta-ecdisona foi 11 e 8 vezes menor do que no processo SFE, respectivamente. Assim pode-se concluir que o PLE é uma alternativa e um processo promissor para a obtenção de extratos de raízes de Ginseng brasileiro ricos em beta-ecdisona.

Com relação ao estudo do equilíbrio de fases a altas pressões, o sistema L-ácido láctico + (propano + etanol) apresentou transições do tipo líquido-líquido-vapor (VLLE), líquido-líquido (LLE) e líquido-vapor ponto de bolha (VLE-BP). Seu comportamento é característico das transições de fase do tipo UCST (Upper Critical Solution Temperature). Já o sistema L-ácido láctico + (CO₂ + etanol) apresentou apenas transições de fase do tipo líquido-líquido (LLE). Seu comportamento é característico das transições de fase do tipo LCST (Lower Critical Solution Temperature).

Os resultados da modelagem termodinâmica dos dados de equilíbrio obtidos mostraram que os modelos Peng-Robinson com regra de mistura quadrática de van der

Waals (PR-vdW2) e com regra de mistura de Wong-Sandlre (PR-WS) foram capazes de representar satisfatoriamente o comportamento de fases do sistema L-ácido láctico + (dióxido de carbono + etanol). Entretanto, para o sistema L-ácido láctico + (propano + etanol), somente modelo PR-WS foi capaz de descrever apropriadamente o seu comportamento.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a caracterização fitoquímica das raízes do Ginseng brasileiro bem como dos extratos obtidos e desenvolver novos métodos de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Realizar o estudo da extração com fluido supercrítico (SFE) das raízes do Ginseng brasileiro com etanol como co-solvente em maiores proporções variando a temperatura do processo;
- Avaliar o efeito de pressões de operação menores tanto para SFE quanto para PLE das raízes do Ginseng brasileiro;
- Na condição cinética apresentada no Capítulo 3, avaliar o período de extração reativa do processo de PLE;
- Validar os resultados de simulação do processo de PLE das raízes do Ginseng brasileiro apresentados em escala piloto;
- Avaliar o efeito de diferentes vazões de solvente no processo de PLE das raízes do Ginseng brasileiro;
- Avaliar o efeito de diferentes tempos de extração estáticos no processo de PLE das raízes do Ginseng brasileiro;
- Realizar um estudo da etapa de separação processo de PLE das raízes do Ginseng brasileiro em escala piloto: dados de equilíbrio de fases a altas pressões utilizando sistemas com o extrato;
- Realizar o estudo de equilíbrio de fases a altas pressões de sistemas com biopolímeros, por exemplo, o poli (L-lactídeo);
- Realizar o estudo de síntese de biopolímeros a partir do monômero L-ácido láctico para o encapsulamento de extratos vegetais.

APÊNDICE

SUMÁRIO A

LISTA DE FIGURAS.....	149
LISTA DE TABELAS	151
APÊNDICE 1	153
1 UNIDADE DE EXTRAÇÃO	153
1.1 Preparo do leito de extração	159
2 RESULTADOS EXPERIMENTAIS	161
2.1 Experimentos cinéticos SFE: Capítulo 2	161
2.2 Experimentos PLE: Capítulo 3	163
2.2.1 Extrações para determinação de rendimento global (X_0)	163
2.2.2 Experimentos cinéticos.....	171
3 PROCEDIMENTO PARA O AJUSTE DOS DADOS OBTIDOS PELOS EXPERIMENTOS CINÉTICOS	173
4 AUMENTO DE ESCALA E AVALIAÇÃO ECONÔMICA	181
5 CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DO TEOR DE BETA-ECDISONA.....	183
APÊNDICE 2	185
1 DETERMINAÇÃO DOS DADOS DE EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES.....	185
1.1 Descrição do aparato experimental.....	185
1.2 Procedimento experimental	192
REFERÊNCIAS	197

LISTA DE FIGURAS

Figura A1. Diagrama esquemático da SFE-I (Unidade cossolvente e/ou PLE), adaptado de (Veggi, 2013).....	155
Figura A2. Unidade de extração SFE-I (Unidade cossolvente e/ou PLE).	158
Figura A3. Esquema do leito de extração (a) e Célula de nylon: esferas de vidro + matriz vegetal (b).....	160
Figura A4. Isotermas de rendimento global da PLE das raízes de ginseng brasileiro (<i>Pfaffia glomerata</i>) usando etanol puro como solvente.....	164
Figura A5. Isotermas de rendimento global da PLE das raízes de ginseng brasileiro (<i>Pfaffia glomerata</i>) usando etanol:água (80:20, v/v) como solvente.....	164
Figura A6. Análise gráfica dos efeitos principais das variáveis estatisticamente significativas sobre o rendimento global de extração com líquido pressurizado das raízes de ginseng brasileiro.....	166
Figura A7. Teores de beta-ecdisona (mg de beta ecdisona/ g de extrato) obtidos na extração com líquido pressurizado das raízes de ginseng brasileiro.....	167
Figura A8. Análise gráfica da interação entre as variáveis estatisticamente significativas sobre o teor de beta-ecdisona (mg de beta-ecdisona/ g de extrato) obtidos na extração com líquido pressurizado das raízes de ginseng brasileiro.....	168
Figura A9. Atividade antioxidante (%) dos extratos das raízes de ginseng brasileiro obtidos na extração com líquido pressurizado.	169
Figura A10. Análise gráfica dos efeitos principais da variável estatisticamente significativa sobre atividade antioxidante (%) dos extratos das raízes de ginseng brasileiro obtidos na extração com líquido pressurizado.	171

Figura A11. Cromatograma do primeiro ponto da cinética do Capítulo 3 (8 MPa/ 393 K/ etanol).	183
Figura A12. Diagrama esquemático do aparato experimental de equilíbrio de fases, adaptado de Lanza (2004) (Lanza, 2004).	186
Figura A13. Vista geral da célula de equilíbrio de volume variável do Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI, Campus Erechim; (a) somente a célula e (b) célula envolta pela camisa.....	188
Figura A14. Componentes da célula de equilíbrio: 1- rosca frontal; 2 – rosca do fundo; 4,5 e 6 – o-rings; 7 – janela de safira.....	188
Figura A15. Pistão montado e seus componentes (Fonte: Lanza, 2004).....	189
Figura A16. Detalhe da janela de safira mostrando o posicionamento do termopar.....	189
Figura A17. Posicionamento da janela de safira na célula de equilíbrio (Fonte: Lanza, 2004).....	190
Figura A18. Vista geral da unidade de equilíbrio de fases do Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI, Campus de Erechim.	192
Figura A19. Esquema da transição líquido-fluido em um diagrama P-x. PT = Pressão de transição; z_1 = composição global do componente 1; x_1 = composição do componente 1 na fase líquida.....	196

LISTA DE TABELAS

Tabela A1. Resultados obtidos no experimento cinético usando CO ₂ :Etanol (85:15, v/v) a 333 K e 30 MPa.....	161
Tabela A2. Resultados obtidos no experimento cinético usando CO ₂ :Etanol (85:15, v/v) a 333 K e 20 MPa.....	162
Tabela A3. Resultados obtidos no experimento cinético usando CO ₂ :Etanol (25:75, v/v) a 333 K e 20 MPa.....	162
Tabela A4. Resultados obtidos no experimento cinético usando CO ₂ :Etanol (10:90, v/v) a 333 K e 20 MPa.....	163
Tabela A5. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento global de extração das raízes de ginseng brasileiro.....	165
Tabela A6. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o teor de beta-ecdisona nos extratos obtidos a partir das raízes de ginseng brasileiro.....	167
Tabela A7. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre a atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir das raízes de ginseng brasileiro.....	170
Tabela A8. Resultados obtidos no experimento cinético usando etanol a 393 K e 8 MPa.	172
Tabela A9. Rotina de programação utilizada no SAS 9.0 (SAS Institute, Inc) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (393 K/ 8 MPa/ solvente:etanol puro) a um spline de três retas: procedimento PROC REG.....	174
Tabela A10. Dados de saída do procedimento PROC REG do software SAS (SAS Institute, Inc) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (393 K/ 8 MPa/ solvente:etanol puro) a um spline de três retas.	175
Tabela A11. Rotina de programação utilizada no SAS 9.0 (SAS Institute, Inc) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (393 K/ 8 MPa/ solvente:etanol puro) a um spline de três retas: procedimento PROC NLIN.	177

Tabela A12. Dados de saída do procedimento PROC NLIN do software SAS (SAS Institute, Inc) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (393 K/ 8 MPa/ solvente:etanol puro) a um spline de três retas.....	178
Tabela A13. Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados experimentais das OECs a um spline de três retas.	180
Tabela A14. Dados utilizados e obtidos na simulação do processo de extração com líquido pressurizado das raízes de ginseng brasileiro (<i>Pfaffia glomerata</i>) através do software SuperPro Design®.....	182

APÊNDICE 1

1 UNIDADE DE EXTRAÇÃO

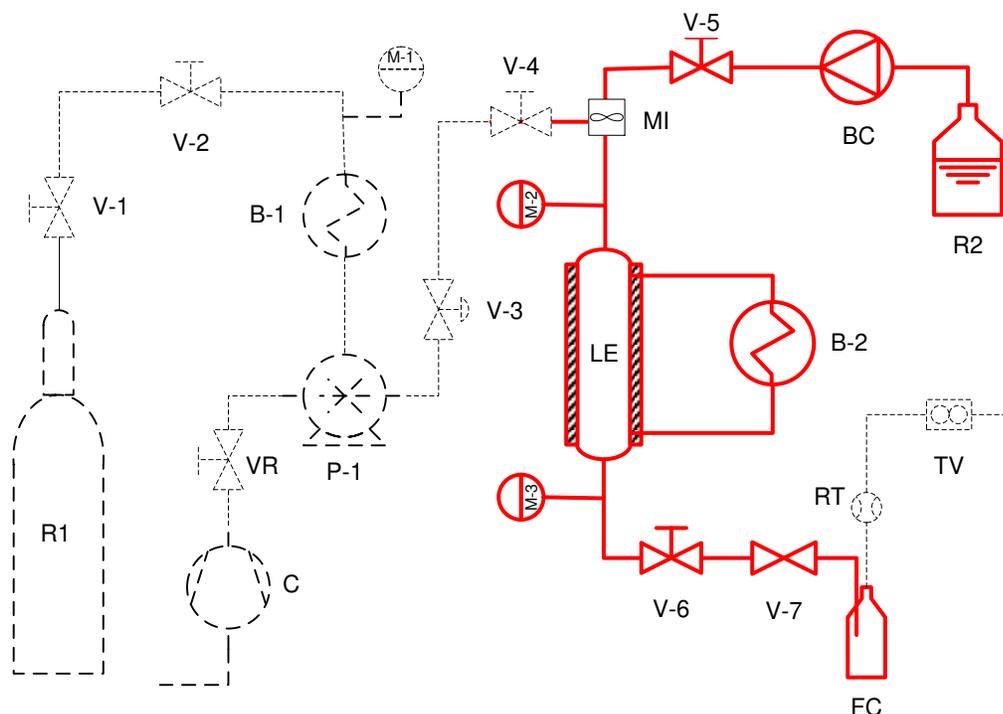
A unidade utilizada para a realização dos ensaios de extração supercrítica (SFE) com cossolvente (Capítulo 2) e de extração com líquido pressurizado (PLE) (Capítulo 3) foi a unidade SFE-I (Unidade cossolvente e/ou PLE) disponível no Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de extratos vegetais (LASEFI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A unidade de extração SFE-I (Figuras A1 e A2) é composta uma bomba pneumática – Booster (**P-1**) (Maximator, modelo PP111-VE MBR, Alemanha), uma bomba de alta pressão (**BC**) (Thermo Separation Products, modelo 3200 P/F, Flórida, EUA), dois banhos termostáticos programáveis (Marconi, modelo MA 159/300, Piracicaba, SP e Marconi, modelo MA-184, Piracicaba, SP) responsáveis pela manutenção da temperatura do extrator de aço inox (**B-2**) e do cabeçote do booster (**B-1**), respectivamente, uma válvula reguladora de pressão – Back pressure regulator (**V-3**) (Tescom, modelo n° 26176124161, Minnesota River, EUA), um rotâmetro, um totalizador de vazão (**TV**) (LAO, modelo G0,6 ± 0,001 m³, São Paulo, SP), termopares e três manômetros (**M**) (Record, 50 MPa ± 0,5, São Paulo, SP).

Nessa unidade pode ser realizado o processo de SFE, utilizando todas as partes da unidade apresentada na Figura A1 (pontilhada e destacada), utilizando um solvente (R1), geralmente CO₂ que é resfriado (B-1) a 263 K e posteriormente pressurizado (P-1). Essa unidade pode ainda operar com ou sem a utilização de cossolvente (R2) (Prado, 2010). Nesse caso, o solvente e o cossolvente são misturados (MI) antes da entrada do extrator. Em seguida, solvente ou mistura solvente/cossolvente passam pelo leito fixo (LE)

empacotado com a matéria-prima em estudo. O extrato e eventual cossolvente são recolhidos em frascos de vidro (da mesma forma que no processo PLE). O solvente, por sua vez, após expansão em válvula micrométrica aquecida (V7), passa através de um rotâmetro (RT) e um totalizador de vazão (TV), permitindo um maior controle da quantidade de solvente utilizado no processo, sendo assim liberado para o ambiente.

Para o processo de PLE, a unidade SFE-I é operada somente com a parte destacada na Figura A1. A matriz vegetal é empacotada em célula de nylon com as mesmas medidas do extrator de leite fixo (LE) antes de ser inserida nele. Uma coluna de teflon perfurada equivalente a aproximadamente 70 % do volume do extrator pode ser inserida na parte superior dele a fim de diminuir o seu volume, reduzindo o tempo de pressurização e a perda de carga do sistema (Pereira, 2005). O solvente (R2) é bombeado (BC) através do leito de extração (LE), sendo este envolto por uma camisa conectada a um banho termostático, o extrato + solvente são, então, coletados em frasco de vidro imerso em banho de gelo à pressão ambiente.



- | | |
|--|--|
| R1 – Reservatório de solvente (CO ₂) | M - Manômetros |
| R2 – Reservatório de co-solvente | RT - Rotâmetro |
| P-1 – Booster | TV – Totalímetro |
| C – Compressor | V-1 – Válvula de bloqueio (cilindro de CO ₂) |
| BC – Bomba de alta pressão | V-2 - Válvula de retenção |
| B-1 – Banho de resfriamento (CO ₂) | V-3 – Válvula back pressure |
| B-2 – Banho de aquecimento do extrator | V-4 - Válvula de bloqueio (entrada de CO ₂) |
| LE – Leito de extração | V-5 – Válvula de bloqueio (entrada de co-solvente) |
| MI – Misturador | V-6 - Válvula de bloqueio (saída de extrato) |
| FC – Frasco coletor | V-7 – Válvula micrométrica aquecida |

Figura A1. Diagrama esquemático da SFE-I (Unidade cossolvente e/ou PLE), adaptado de (Veggi, 2013).

Procedimento operacional da unidade SFE-I para SFE, adaptado de (Veggi, 2013):

- 1) Ligar os banhos de resfriamento (B-1) dos cabeçotes da bomba (P-1) e aquecimento (B-2) da camisa do extrator (LE) e aguardar até que as temperaturas de operação sejam atingidas: 263 K para o resfriamento e temperatura de operação, respectivamente;
- 2) Ligar o aquecimento da válvula micrométrica (V-7);

- 3) Empacotar a matriz vegetal em célula de nylon, se necessário completar o volume da mesma com esferas de vidro;
- 4) Verificar se as válvulas de bloqueio V-4, V-5 e V-6 estão fechadas;
- 5) Verificar se a válvula micrométrica V-7 está fechada;
- 6) Inserir a coluna de teflon na parte superior do extrator (LE) quando se deseja trabalhar com um volume menor de matéria-prima;
- 7) Inserir a célula de nylon com a matriz vegetal devidamente empacotada na parte inferior do extrator (LE);
- 8) Conectar toda a linha, ou seja, fechar as duas extremidades do extrator e conectá-las à tubulação do sistema;
- 9) Abrir a válvula V-1 do cilindro de CO₂ (R1) e fazer a leitura da pressão no manômetro M-1;
- 10) Abrir as válvulas V-2 e VR;
- 11) Regular a pressão do sistema através da válvula V-3;
- 12) Abrir a válvula V-5 para utilização de cossolvente;
- 13) Ajustar a vazão de cossolvente na bomba de alta pressão (B-2);
- 14) Assim que o sistema atingir a pressão de operação (M-3) iniciar o controle do tempo de extração estática;
- 15) Após o período estático, abrir cuidadosamente a válvula V-6;
- 16) Controlar a vazão do sistema através da válvula V-7, sendo a vazão mantida constante durante todo o período de extração e monitorada através do rotâmetro (RT) e do totalizador de vazão (TV);
- 17) Recolher o extrato em frasco de vidro (FC) imerso em banho de gelo;

- 18) Ao final do processo (após o tempo pré-estabelecido de extração), retirar o frasco coletor, fechar as válvulas V-4 e V-5 e desligar as bombas B-1 e B-2;
- 19) Abrir as válvulas V-6 e V-7 para despressurizar o sistema, desligar os banhos termostáticos (B-1 e B-2) e o aquecimento da válvula micrométrica.

Procedimento operacional da unidade SFE-I para PLE:

- 1) Ligar o banho de aquecimento (B-2) da camisa do extrator (LE) (temperatura do ensaio);
- 2) Empacotar a matriz vegetal em célula de nylon, se necessário completar o volume da mesma com esferas de vidro;
- 3) Verificar se as válvulas de bloqueio V-5 e V-6 estão fechadas;
- 4) Verificar se a válvula micrométrica V-7 está fechada;
- 5) Inserir a coluna de teflon na parte superior do extrator (LE) quando se deseja trabalhar com um volume menor de matéria-prima;
- 6) Inserir a célula de nylon com a matriz vegetal devidamente empacotada na parte inferior do extrator (LE);
- 7) Conectar toda a linha, ou seja, fechar as duas extremidades do extrator e conectá-las à tubulação do sistema;
- 8) Ajustar a vazão de solvente na bomba de alta pressão (B-2);
- 9) Abrir a válvula V-5 para liberar a entrada de solvente no extrator;
- 10) Ligar a bomba. O sistema é pressurizado a partir da entrada de solvente no extrator;
- 11) Assim que o sistema atingir a pressão de operação (M-3) desligar a bomba e fechar a válvula de bloqueio V-5;

- 12) Iniciar o controle do tempo de extração estática;
- 13) Após o período estático, abrir a válvula V-5, ligar a bomba de alta pressão, abrir cuidadosamente a válvula V-6 e controlar o escoamento de solvente com a válvula micrométrica V-7 monitorando a pressão do sistema (M-3);
- 14) Recolher o extrato em frasco de vidro (FC) imerso em banho de gelo;
- 15) Ao final do processo (após o tempo pré-estabelecido de extração), retirar o frasco coletor, desligar a bomba de alta pressão e fechar a válvula V-5;
- 16) Abrir as válvulas V-6 e V-7 para despressurizar o sistema, desligar o banho de aquecimento do extrator e o aquecimento da válvula micrométrica.



Figura A2. Unidade de extração SFE-I (Unidade cossolvente e/ou PLE).

1.1 Preparo do leito de extração

O preparo do leito seguiu um procedimento padrão para todos os ensaios de extração realizados para a determinação do rendimento global e estudo cinético dos Capítulos 2 e 3. Na extremidade inferior da célula de nylon (Figura A3), que está fechada, e possui mesmo diâmetro do extrator, foi depositada uma camada de lã de vidro e em seguida a matéria-prima foi cuidadosamente empacotada com o auxílio de um bastão de aço inoxidável, também com o mesmo diâmetro do extrator. Outra camada de lã de vidro foi depositada em cima da matéria-prima empacotada e por fim o volume da célula de nylon foi completado com esferas de vidro. Essa célula foi então fechada com barbante e inserida na parte inferior do extrator, lembrando que, também, foi introduzido no extrator, porém na parte superior, uma coluna de teflon que representa aproximadamente 70 % do volume dele. Um esquema do leito de extração pode ser visualizado na Figura A3.

A densidade aparente do leito foi mantida constante e a lã de vidro foi utilizada como um filtro para evitar que partículas pequenas obstruíssem a tubulação.

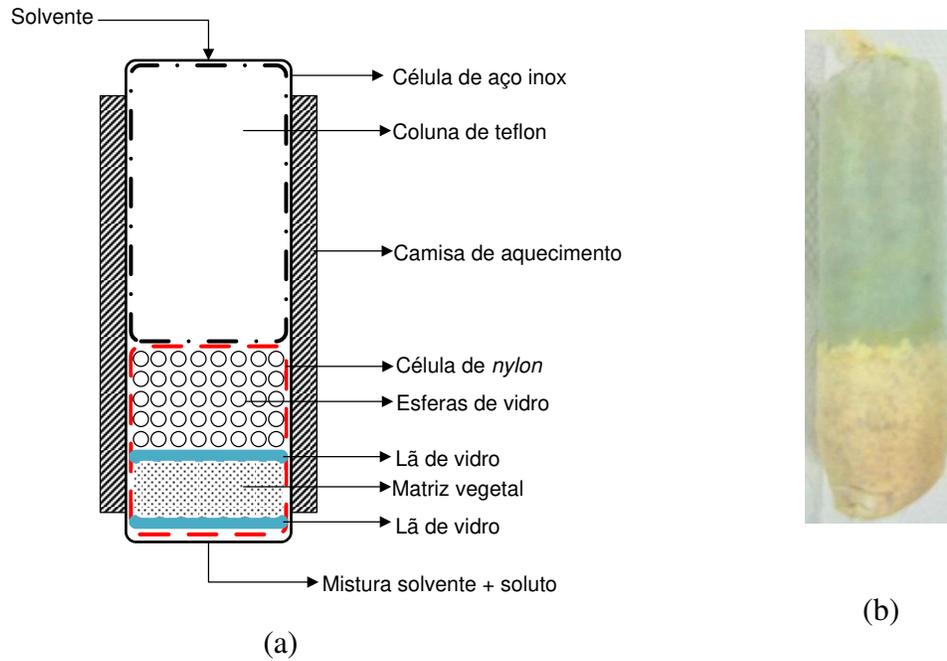


Figura A3. Esquema do leito de extração (a) e Célula de nylon: esferas de vidro + matriz vegetal (b)

2 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

2.1 Experimentos cinéticos SFE: Capítulo 2

A seguir estão apresentados os resultados experimentais (Tabelas A.1 a A.4) utilizando as raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) que resultaram no artigo apresentado no Capítulo 2.

Tabela A1. Resultados obtidos no experimento cinético usando CO₂:Etanol (85:15, v/v) a 333 K e 30 MPa.

Tempo (min)	Massa de extrato acumulada (g)	Rendimento acumulado (% , b.s)	S/F acumulado	Rendimento acumulado de beta -ecdisona (% , b.s.)	Teor de beta-ecdisona (mg/g de extrato)
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
50	0,0577	0,3160	7,4516	0,0408	84,6200
70	0,0726	0,3973	15,9080	0,0870	87,8906
90	0,0833	0,4562	24,7320	0,1353	84,3883
110	0,0993	0,5433	34,7000	0,1899	85,5768
130	0,1058	0,5786	45,7648	0,2504	83,1206
150	0,1215	0,6648	57,8283	0,3164	75,4472
180	0,1292	0,7067	76,2532	0,4172	71,9126
210	0,1330	0,7278	96,2777	-	-
240	0,1394	0,7626	117,6744	0,6439	67,2339
270	0,1473	0,8060	141,3133	0,7732	64,4359
330	0,1572	0,8602	177,8919	0,9733	60,9396
390	0,1651	0,9034	213,7694	1,1696	58,3673

- Nesse ponto a massa de amostra não foi suficiente para a realização da análise.

Tabela A2. Resultados obtidos no experimento cinético usando CO₂:Etanol (85:15, v/v) a 333 K e 20 MPa.

Tempo (min)	Massa de extrato acumulada (g)	Rendimento acumulado (% , b.s)	S/F acumulado	Rendimento acumulado de beta -ecdisona (% , b.s.)	Teor de beta-ecdisona (mg/g de extrato)
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
50	0,0942	0,5159	7,6248	0,0467	90,5542
70	0,1097	0,6008	16,2481	0,0539	89,6956
90	0,1196	0,6551	25,9607	0,0567	86,4837
110	0,1287	0,7049	36,8533	0,0577	81,8185
130	0,1353	0,7410	48,8351	0,0584	78,7584
150	0,1413	0,7739	61,3616	0,0588	75,9914
180	0,1486	0,8139	79,4251	0,0594	73,0270
210	0,1547	0,8473	98,8502	0,0599	70,7476
240	0,1603	0,8780	120,0000	0,0604	68,7640
270	0,1664	0,9114	142,7836	0,0608	66,6797
330	0,1760	0,9640	178,7291	0,0614	63,7030
390	0,1882	1,0308	218,0332	0,0621	60,2543

Tabela A3. Resultados obtidos no experimento cinético usando CO₂:Etanol (25:75, v/v) a 333 K e 20 MPa.

Tempo (min)	Massa de extrato acumulada (g)	Rendimento acumulado (% , b.s)	S/F acumulado	Rendimento acumulado de beta -ecdisona (% , b.s.)	Teor de beta-ecdisona (mg/g de extrato)
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
35	0,2412	1,3186	3,0890	0,0506	38,3524
40	0,2737	1,4963	7,4500	0,0603	40,3020
45	0,3017	1,6493	13,2645	0,0681	41,2722
50	0,3208	1,7537	19,9875	0,0736	41,9618
55	0,3441	1,8811	28,6183	0,0808	42,9476
60	0,3627	1,9828	38,3393	0,0865	43,6196
65	0,3798	2,0763	49,5139	0,0912	43,9089
70	0,4050	2,2141	62,0513	0,0945	42,6665
75	0,4136	2,2611	75,9514	0,0966	42,7404
80	0,4201	2,2966	91,2142	0,0979	42,6206
85	0,4252	2,3245	107,8398	0,0988	42,5015
90	0,4301	2,3513	125,7372	0,0996	42,3421

Tabela A4. Resultados obtidos no experimento cinético usando CO₂:Etanol (10:90, v/v) a 333 K e 20 MPa.

Tempo (min)	Massa de extrato acumulada (g)	Rendimento acumulado (% , b.s)	S/F acumulado	Rendimento acumulado de beta -ecdisona (% , b.s.)	Teor de beta-ecdisona (mg/g de extrato)
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
35	0,2808	1,5385	3,2216	0,0589	38,2594
40	0,3392	1,8585	8,1458	0,0734	39,5004
45	0,3731	2,0442	14,7724	0,0826	40,3992
50	0,3994	2,1882	23,0555	0,0888	40,5732
55	0,4124	2,2595	33,1333	0,0911	40,3041
60	0,4234	2,3197	44,6836	0,0926	39,9230
65	0,4385	2,4027	57,8443	0,0939	39,0974
70	0,4500	2,4655	72,6159	0,0950	38,5317
75	0,4608	2,5246	89,5038	0,0961	38,0833
80	0,4706	2,5783	107,7263	0,0971	37,6755
85	0,4770	2,6137	127,6517	0,0979	37,4731
90	0,4828	2,6455	149,1873	0,0987	37,2929

2.2 Experimentos PLE: Capítulo 3

A seguir estão apresentados os resultados experimentais das extrações com líquido pressurizado (PLE) utilizando as raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) que resultaram no artigo apresentado no Capítulo 3.

2.2.1 Extrações para determinação de rendimento global (X_0)

2.2.1.1 Rendimento global (X_0)

O rendimento global (X_0) dos extratos obtidos das raízes de Ginseng brasileiro usando PLE variou entre 1,5 e 25,0 % (b.s.). As figuras A4 e A5 apresentam as isotermas

de rendimento global obtidas nas diferentes condições avaliadas usando etanol puro e a mistura etanol:água (80:20, v/v) como solventes, respectivamente.

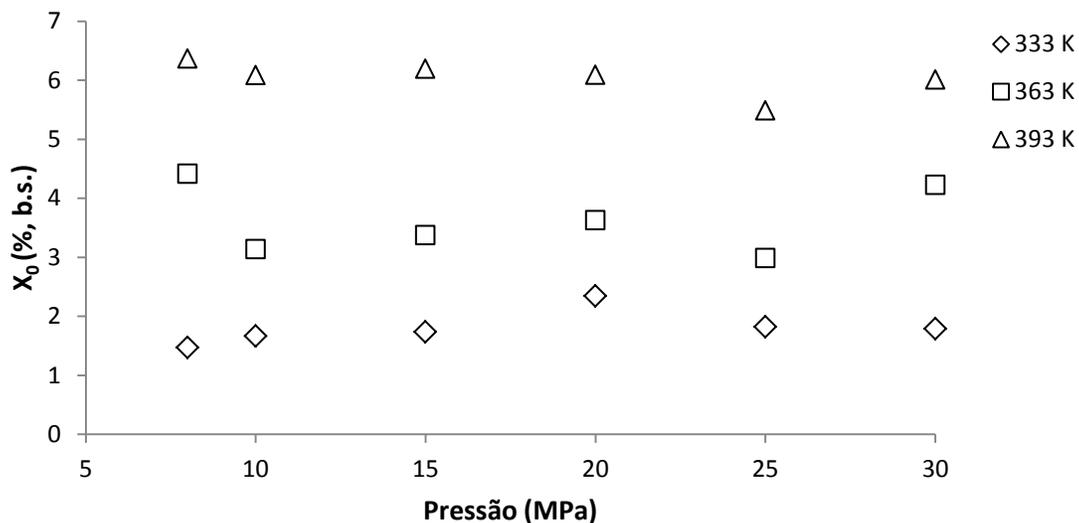


Figura A4. Isotermas de rendimento global dos extratos obtidos das raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) por PLE usando etanol puro como solvente.

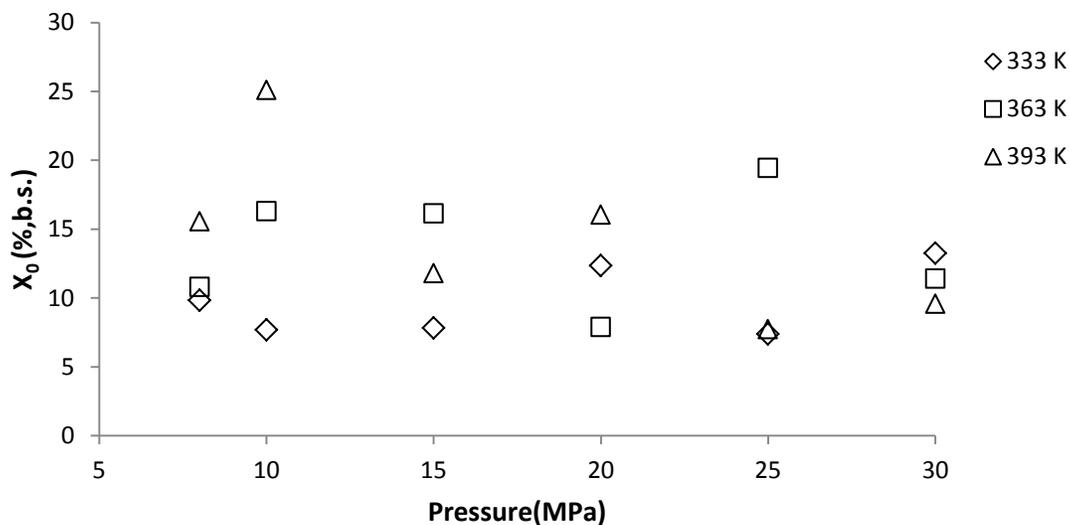


Figura A5. Isotermas de rendimento global dos extratos obtidos das raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) por PLE usando etanol:água (80:20, v/v) como solvente.

A influência da temperatura (333, 363 e 393 K), pressão (8, 10, 15, 20, 25 e 30 MPa) e tipo de solvente [etanol puro e etanol:água (80:20, v/v)] sobre o X_0 foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* MINITAB[®] 16 (Tabela A5).

Tabela A5. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento global de extração das raízes de Ginseng brasileiro.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	<i>p</i> -valor
Temperatura (K)	2	120,9	60,04	4,46	0,041
Pressão (MPa)	5	24,92	4,98	0,37	0,858
Solvente	1	688,65	688,35	51,17	0,000
Temperatura*Pressão	10	132,57	13,26	0,99	0,509
Temperatura*Solvente	2	7,75	3,87	0,29	0,756
Pressão*Solvente	5	29,29	5,86	0,44	0,814
Erro	10	134,53	13,45		
Total	35	1137,49			

A partir dos dados apresentados na Tabela A5, pode-se observar que as variáveis que exercem influência significativa sobre o rendimento global (X_0) são a temperatura (*p*-valor = 0,041) e o solvente (*p*-valor = 0,000), uma vez que os *p*-valores são menores que 0,05. Assim, com o objetivo de verificar quais os níveis dessas variáveis com efeitos significativos maximizam o X_0 , foram construídos os gráficos das médias desses efeitos principais (Figura A6).

A partir do gráfico apresentado na Figura A6, é possível observar que o processo de PLE apresentou melhor desempenho, em termos de X_0 , à temperatura de 393 K e utilizando como solvente a mistura etanol:água (80:20, v/v).

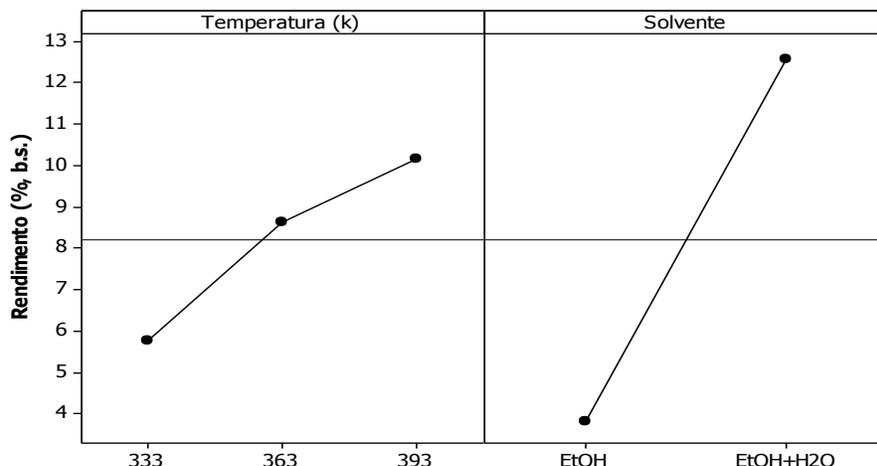


Figura A6. Análise gráfica dos efeitos principais das variáveis estatisticamente significativas sobre o rendimento global de extração com líquido pressurizado das raízes de Ginseng brasileiro.

2.2.1.2 Teor de beta-ecdisona

O teor de beta-ecdisona nos extratos obtidos através das extrações com líquido pressurizado das raízes de Ginseng brasileiro variou entre 1,1 e 49,7 mg/g (mg de beta-ecdisona por g de extrato) (Figura A.7).

A influência da temperatura (333, 363 e 393 K), pressão (8, 10, 15, 20, 25 e 30 MPa) e tipo de solvente [etanol puro e etanol:água (80:20, v/v)] sobre o teor de beta-ecdisona foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* MINITAB®16 (Tabela A6).

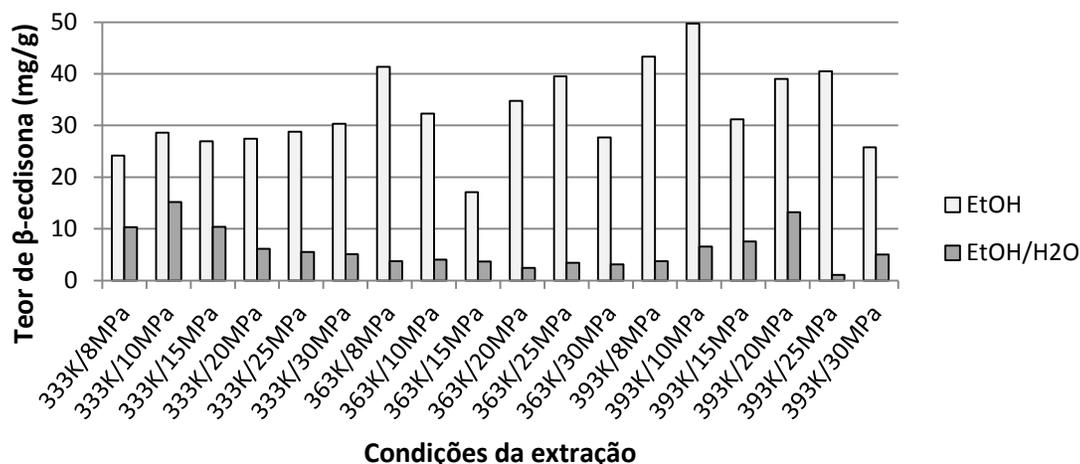


Figura A7. Teores de beta-ecdisona (mg de beta ecdisona/ g de extrato) obtidos na extração com líquido pressurizado das raízes de Ginseng brasileiro.

Tabela A6. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o teor de beta-ecdisona nos extratos obtidos a partir das raízes de Ginseng brasileiro.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	p-valor
Temperatura (K)	2	143,38	71,69	2,53	0,129
Pressão (MPa)	5	218,07	43,61	1,54	0,262
Solvente	1	6354,75	6354,75	224,33	0,000
Temperatura*Pressão	10	229,18	22,92	0,81	0,628
Temperatura*Solvente	2	278,80	139,40	4,92	0,033
Pressão*Solvente	5	214,16	42,83	1,51	0,270
Erro	10	283,28	28,33		
Total	35	7721,62			

A partir dos dados apresentados na Tabela A6, pode-se observar que as variáveis que exercem influência significativa sobre o teor de beta-ecdisona são o solvente (p -valor = 0,000) e a interação entre temperatura e solvente (p -valor = 0,033), uma vez que os p -

valores são menores que 0,05. Assim, com o objetivo de verificar quais os níveis dessas variáveis com efeitos significativos maximizam o teor de beta-ecdisona no extrato, foi construído o gráfico da interação entre a temperatura e solvente sobre o teor de beta-ecdisona (Figura A8).

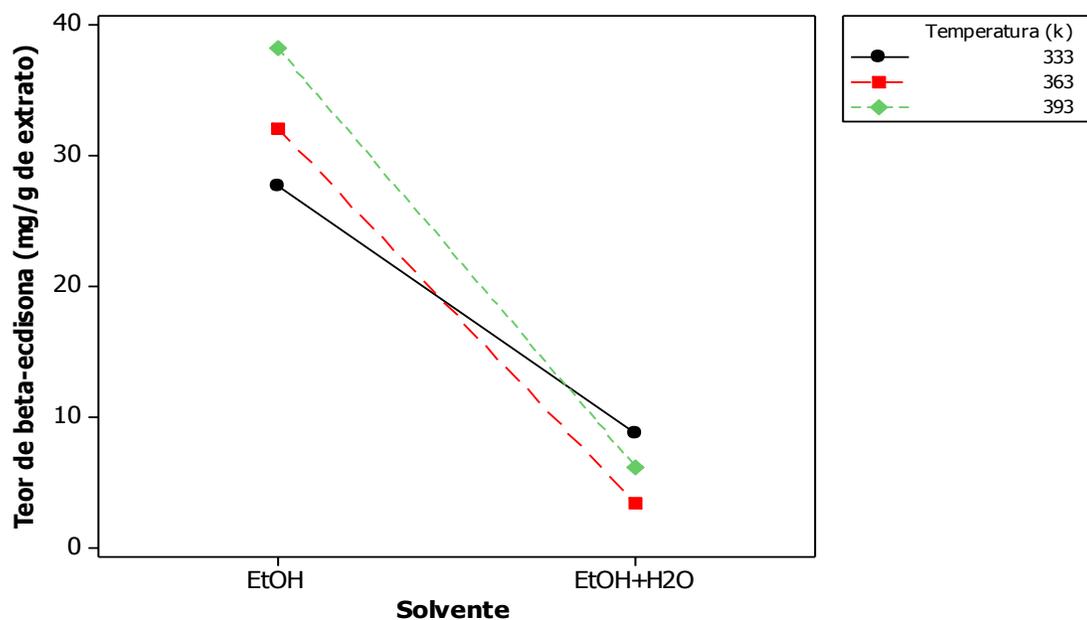


Figura A8. Análise gráfica da interação entre as variáveis estatisticamente significativas sobre o teor de beta-ecdisona (mg de beta-ecdisona/ g de extrato) obtidos na extração com líquido pressurizado das raízes de Ginseng brasileiro.

Avaliando a interação entre a temperatura e o solvente (Figura A8), observa-se que, assim como para o rendimento global (X_0), foram obtidos maiores teores de beta-ecdisona à 393 K. Porém nesse caso o solvente de melhor desempenho foi o etanol puro, mostrando que esse solvente apresentou maior seletividade para a obtenção de extratos com maiores teores de β -ecdisona.

2.2.1.3 Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante (AA) nos extratos obtidos através das extrações com líquido pressurizado das raízes de Ginseng brasileiro variou entre 13,3 e 48,3 % (Figura A9).

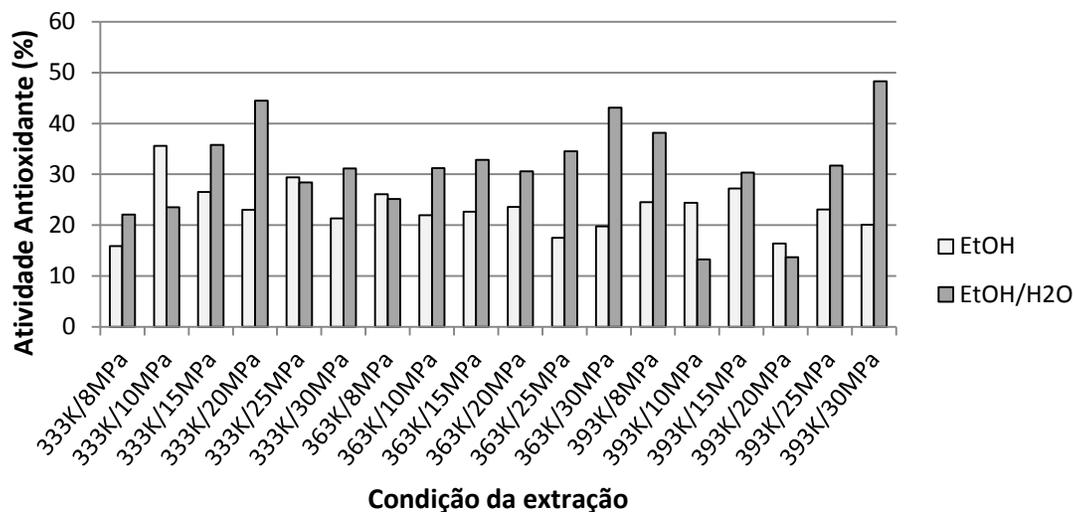


Figura A9. Atividade antioxidante (%) dos extratos das raízes de Ginseng brasileiro obtidos na extração com líquido pressurizado.

A influência da temperatura (333, 363 e 393 K), pressão (8, 10, 15, 20, 25 e 30 MPa) e tipo de solvente [etanol puro e etanol:água (80:20, v/v)] sobre atividade antioxidante foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* MINITAB® 16 (Tabela A7).

Tabela A7. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre a atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir das raízes de Ginseng brasileiro.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	<i>p</i> -valor
Temperatura (K)	2	29,65	14,83	0,31	0,742
Pressão (MPa)	5	166,82	33,36	0,69	0,641
Solvente	1	536,45	536,45	11,13	0,008
Temperatura*Pressão	10	690,95	69,10	1,43	0,290
Temperatura*Solvente	2	48,66	24,33	0,50	0,618
Pressão*Solvente	5	474,81	94,96	1,97	0,169
Erro	10	482,10	48,21		
Total	35	2429,45			

A partir dos dados apresentados na Tabela A7, pode-se observar que a variável que exerce influência significativa sobre a atividade antioxidante é o solvente (p -valor = 0,008), uma vez que o p -valor é menor que 0,05. Assim, com o objetivo de verificar quais os níveis dessa variável com efeito significativo maximiza a atividade antioxidante no extrato, foi construído o gráfico das médias desse efeito principal (Figura A10).

Na Figura A10 pode-se observar que o processo de PLE apresentou melhor desempenho, em termos de atividade antioxidante, quando utilizada a mistura EtOH:H₂O (80:20) como solvente.

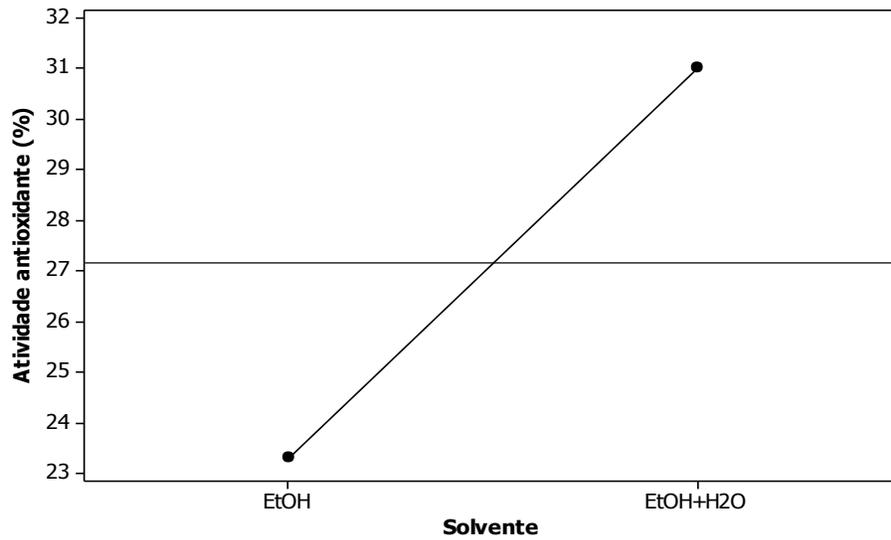


Figura A10. Análise gráfica dos efeitos principais da variável estatisticamente significativa sobre atividade antioxidante (%) dos extratos das raízes de Ginseng brasileiro obtidos na extração com líquido pressurizado.

2.2.2 Experimentos cinéticos

A tabela A8 apresenta os resultados obtidos nos experimentos cinéticos de extração com líquido pressurizado das raízes de Ginseng brasileiro.

Tabela A8. Resultados obtidos no experimento cinético usando etanol a 393 K e 8 MPa.

Tempo (min)	Massa de extrato acumulada (g)	Rendimento acumulado (%, b.s)	S/F acumulado	Rendimento acumulado de beta-ecdisona (%, b.s.)	teor de beta- ecdisona (mg/g de extrato)
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
15	0,3859	2,1601	1,9986	0,0819	37,9094
20	0,4884	2,7339	3,9972	0,1030	37,6592
25	0,5689	3,1848	5,9958	0,1184	37,1910
30	0,6389	3,5763	7,9944	0,1309	36,5898
35	0,6978	3,9063	9,9930	0,1416	36,2558
40	0,7471	4,1822	11,9916	0,1507	36,0314
45	0,7927	4,4375	13,9902	0,1588	35,7824
50	0,8356	4,6776	15,9888	0,1665	35,5944
55	0,8756	4,9013	17,9874	0,1733	35,3673
60	0,9109	5,0989	19,9860	0,1797	35,2447
65	0,9478	5,3057	21,9846	0,1856	34,9755
70	0,9782	5,4756	23,9832	0,1909	34,8622
80	1,0431	5,8391	27,9804	0,2010	34,4169
90	1,1044	6,1820	31,9776	0,2099	33,9502
100	1,1606	6,4969	35,9748	0,2175	33,4838
110	1,2147	6,7997	39,9720	0,2251	33,1068
120	1,2651	7,0818	43,9692	0,2320	32,7589
130	1,3138	7,3541	47,9664	0,2385	32,4262

3 PROCEDIMENTO PARA O AJUSTE DOS DADOS OBTIDOS PELOS EXPERIMENTOS CINÉTICOS

As curvas globais de extração (OEC) apresentadas nos Capítulos 2 e 3 foram ajustadas a um “spline” linear de três retas de acordo com a metodologia de Rodrigues et al (2002) (Rodrigues *et al.*, 2002).

O procedimento para o ajuste dos dados experimentais das OECs foi realizado da seguinte maneira (Albuquerque, 2013): inicialmente, utilizou-se o procedimento PROC REG (Tabela A9) para estimar os valores dos coeficientes lineares, que no programa são chamados como Intercept (b0), tmin (b1), AL1 (b2), e AL2 (b3) (Tabela A10). Posteriormente, esses dados foram utilizados como valores de entrada para o procedimento PROC NLIN (Tabela A11). Os valores iniciais dos parâmetros knot1 e knot2 foram estimados pela visualização da curva. Como o cálculo é iterativo, a convergência é bem mais rápida quando os valores iniciais estão mais próximos das estimativas. Finalmente, foram obtidos os valores do modelo ajustado, onde knot1 e knot2 (Tabela A12) são os parâmetros cinéticos t_{CER} e t_{FER} , respectivamente. Os dados ajustados fornecidos pelo aplicativo foram plotados em termos de rendimento em extrato, em base seca, em função do tempo de extração. A seguir são mostradas as rotinas de programação, informações de saída do software SAS 9.0 e os parâmetros cinéticos obtidos para as cinéticas apresentadas nos Capítulos 2 e 3 (Tabela A13).

Tabela A9. Rotina de programação utilizada no SAS 9.0 (SAS Institute, Inc) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (393 K/ 8 MPa/ solvente:etanol puro) a um spline de três retas: procedimento PROC REG.

```

options ls=80 ps=50;
Title 'Cinetica (8 MPa/393 K)';
data OEC1;
input tmin rend;
AL1 = max(tmin-30,0);
AL2 = max(tmin-80,0);
Cards;
0      0
15     2.330842067
20     2.935383238
25     3.413978331
30     3.832679067
35     4.19652329
40     4.496554834
45     4.786510691
50     5.057994457
55     5.311006132
60     5.533790749
65     5.780085299
70     5.957529328
80     6.297303856
90     6.637078384
100    6.967896747
110    7.288079663
120    7.584192884
130    7.880865866
0      0
15     1.989388258
20     2.532355791
25     2.95553461
30     3.319938593
35     3.616051814
40     3.867943969
45     4.088489544
50     4.297280151
55     4.49151699
60     4.663923176
65     4.831291518
70     4.993622018
80     5.380976175
90     5.726908067
100    6.02582009
110    6.311297865
120    6.579423069
130    6.827396901
Proc Reg;
Model rend = tmin AL1 AL2;
Output out = a p=rendi r=Mrend;
Proc print;
Axis1 order = (0 to 8.0 by 0.5);
Proc gplot; Plot Mres*mexthat;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color = red;
Plot1 rend*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 rendi*tmin/legend overlay vaxis =
axis1;
Run;

```

Tabela A10. Dados de saída do procedimento PROC REG do software SAS (SAS Institute, Inc) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (393 K/ 8 MPa/ solvente:etanol puro) a um spline de três retas.

Cinetica (8 MPa/393 K)						
The REG Procedure						
Model: MODEL1						
Dependent Variable: mext						
Analysis of Variance						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	3	123.59517	41.19839	232.63	<.0001	
Error	34	6.02128	0.17710			
Corrected Total	37	129.61645				
Root MSE		0.42083	R-Square	0.9535		
Dependent Mean		4.70493	Adj R-Sq	0.9494		
Coeff Var		8.94441				
Parameter Estimates						
Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t	
Intercept	1	0.15230	0.26019	0.59	0.5622	
tmin	1	0.12096	0.01085	11.14	<.0001	
AL1	1	-0.07836	0.01404	-5.58	<.0001	
AL2	1	-0.01348	0.00983	-1.37	0.1794	
Cinetica (8 MPa/393 K)						
Obs	tmin	rend	AL1	AL2	rendi	Mrend
1	0	0.00000	0	0	0.15230	-0.15230
2	15	2.33084	0	0	1.96665	0.36419
3	20	2.93538	0	0	2.57143	0.36395
4	25	3.41398	0	0	3.17621	0.23776
5	30	3.83268	0	0	3.78100	0.05168
6	35	4.19652	5	0	3.99397	0.20256
7	40	4.49655	10	0	4.20694	0.28962
8	45	4.78651	15	0	4.41991	0.36660
9	50	5.05799	20	0	4.63288	0.42511
10	55	5.31101	25	0	4.84585	0.46515
11	60	5.53379	30	0	5.05883	0.47496
12	65	5.78009	35	0	5.27180	0.50829
13	70	5.95753	40	0	5.48477	0.47276
14	80	6.29730	50	0	5.91071	0.38659
15	90	6.63708	60	10	6.20184	0.43524
16	100	6.96790	70	20	6.49297	0.47493
17	110	7.28808	80	30	6.78409	0.50399

18	120	7.58419	90	40	7.07522	0.50897
19	130	7.88087	100	50	7.36635	0.51452
20	0	0.00000	0	0	0.15230	-0.15230
21	15	1.98939	0	0	1.96665	0.02274
22	20	2.53236	0	0	2.57143	-0.03908
23	25	2.95553	0	0	3.17621	-0.22068
24	30	3.31994	0	0	3.78100	-0.46106
25	35	3.61605	5	0	3.99397	-0.37792
26	40	3.86794	10	0	4.20694	-0.33900
27	45	4.08849	15	0	4.41991	-0.33142
28	50	4.29728	20	0	4.63288	-0.33560
29	55	4.49152	25	0	4.84585	-0.35434
30	60	4.66392	30	0	5.05883	-0.39490
31	65	4.83129	35	0	5.27180	-0.44051
32	70	4.99362	40	0	5.48477	-0.49115
33	80	5.38098	50	0	5.91071	-0.52974
34	90	5.72691	60	10	6.20184	-0.47493
35	100	6.02582	70	20	6.49297	-0.46715
36	110	6.31130	80	30	6.78409	-0.47280
37	120	6.57942	90	40	7.07522	-0.49580
38	130	6.82740	100	50	7.36635	-0.53895

Intercept (b0), tmin (b1), AL1 (b2) e AL2 (b3) são parâmetros de entrada do procedimento PROC NLIN.

Tabela A11. Rotina de programação utilizada no SAS 9.0 (SAS Institute, Inc) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (393 K/ 8 MPa/ solvente:etanol puro) a um spline de três retas: procedimento PROC NLIN.

```
options ls=120 ps=70;
Title 'Cinetica (8 MPa/393 K)';
data OEC1;
input tmin rend;
AL1 = max(tmin-30,0);
AL2 = max(tmin-80,0);
Cards;
0      0
15     2.330842067
20     2.935383238
25     3.413978331
30     3.832679067
35     4.19652329
40     4.496554834
45     4.786510691
50     5.057994457
55     5.311006132
60     5.533790749
65     5.780085299
70     5.957529328
80     6.297303856
90     6.637078384
100    6.967896747
110    7.288079663
120    7.584192884
130    7.880865866
0      0
15     1.989388258
20     2.532355791
25     2.95553461
30     3.319938593
35     3.616051814
40     3.867943969
45     4.088489544
50     4.297280151
55     4.49151699
60     4.663923176
65     4.831291518
70     4.993622018
80     5.380976175
90     5.726908067
100    6.02582009
110    6.311297865
120    6.579423069
130    6.827396901
Proc Nlin;
parms
b0 = 0.15230
b1 = 0.12096
b2 = -0.07836
b3 = -0.01348
knot1 = 30
knot2 = 80;
AL1 = max(tmin-knot1,0);
AL2 = max(tmin-knot2,0);
Model rend = b0 + b1*tmin + b2*AL1 + b3*AL2;
Output out = a p=rendi r=Mrend;
Axis order = (0 to 8.0 by 0.5);
Proc print;
Proc gplot;
Plot Mrend*merendi;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black;
Symbol2 value = star color = red;
Plot1 rend*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Plot2 rendi*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Run;
```

Tabela A12. Dados de saída do procedimento PROC NLIN do software SAS (SAS Institute, Inc) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (393 K/ 8 MPa/ solvente:etanol puro) a um spline de três retas.

Cinetica (8 MPa/393 K)							
The NLIN Procedure							
Dependent Variable mext							
Method: Gauss-Newton							
Iterative Phase							
Iter	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2	Sum of Squares
0	0.1523	0.1210	-0.0784	-0.0135	30.0000	80.0000	6.0213
1	0.0690	0.1300	-0.0831	-0.0168	26.2741	68.3481	5.9103
2	0.0690	0.1300	-0.0813	-0.0175	26.1606	65.1764	5.8607
3	0.0690	0.1300	-0.0813	-0.0175	26.1581	65.3149	5.8606
NOTE: Convergence criterion met.							
Estimation Summary							
	Method	Gauss-Newton					
	Iterations	3					
	R	0					
	PPC	0					
	RPC(knot2)	0.002124					
	Object	0.000012					
	Objective	5.860643					
	Observations Read	38					
	Observations Used	38					
	Observations Missing	0					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F		
Model	5	123.8	24.7512	135.15	<.0001		
Error	32	5.8606	0.1831				
Corrected Total	37	129.6					
Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits				
b0	0.0690	0.2859	-0.5135	0.6514			
b1	0.1300	0.0162	0.0971	0.1630			
b2	-0.0813	0.0187	-0.1194	-0.0433			
b3	-0.0175	0.0110	-0.0398	0.00479			
knot1	26.1581	4.0156	17.9786	34.3377			
knot2	65.3149	17.2721	30.1329	100.5			
Approximate Correlation Matrix							
	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2	
b0	1.0000000	-0.8485281	0.7348469	0.0000000	0.2238017	0.0000000	
b1	-0.8485281	1.0000000	-0.8660254	-0.0000000	-0.5526949	-0.0000000	

Apêndice 1

b2	0.7348469	-0.8660254	1.0000000	-0.4264014	0.1734820	-0.2749200
b3	0.0000000	-0.0000000	-0.4264014	1.0000000	0.5204927	0.1265500
knot1	0.2238017	-0.5526949	0.1734820	0.5204927	1.0000000	0.2197374
knot2	0.0000000	-0.0000000	-0.2749200	0.1265500	0.2197374	1.0000000

Cinetica (8 MPa/393 K)

Obs	tmin	rend	AL1	AL2	rendi	Mrend
1	0	0.00000	0	0	0.06896	-0.06896
2	15	2.33084	0	0	2.01969	0.31116
3	20	2.93538	0	0	2.66993	0.26546
4	25	3.41398	0	0	3.32017	0.09381
5	30	3.83268	0	0	3.65799	0.17469
6	35	4.19652	5	0	3.90163	0.29490
7	40	4.49655	10	0	4.14527	0.35129
8	45	4.78651	15	0	4.38890	0.39761
9	50	5.05799	20	0	4.63254	0.42545
10	55	5.31101	25	0	4.87618	0.43482
11	60	5.53379	30	0	5.11982	0.41397
12	65	5.78009	35	0	5.36346	0.41662
13	70	5.95753	40	0	5.52502	0.43250
14	80	6.29730	50	0	5.83712	0.46018
15	90	6.63708	60	10	6.14922	0.48786
16	100	6.96790	70	20	6.46131	0.50658
17	110	7.28808	80	30	6.77341	0.51467
18	120	7.58419	90	40	7.08551	0.49869
19	130	7.88087	100	50	7.39760	0.48326
20	0	0.00000	0	0	0.06896	-0.06896
21	15	1.98939	0	0	2.01969	-0.03030
22	20	2.53236	0	0	2.66993	-0.13757
23	25	2.95553	0	0	3.32017	-0.36463
24	30	3.31994	0	0	3.65799	-0.33805
25	35	3.61605	5	0	3.90163	-0.28557
26	40	3.86794	10	0	4.14527	-0.27732
27	45	4.08849	15	0	4.38890	-0.30041
28	50	4.29728	20	0	4.63254	-0.33526
29	55	4.49152	25	0	4.87618	-0.38467
30	60	4.66392	30	0	5.11982	-0.45590
31	65	4.83129	35	0	5.36346	-0.53217
32	70	4.99362	40	0	5.52502	-0.53140
33	80	5.38098	50	0	5.83712	-0.45614
34	90	5.72691	60	10	6.14922	-0.42231
35	100	6.02582	70	20	6.46131	-0.43549
36	110	6.31130	80	30	6.77341	-0.46211
37	120	6.57942	90	40	7.08551	-0.50608
38	130	6.82740	100	50	7.39760	-0.57021

knot 1: t_{CER} ; knot 2: t_{FER} ; tmin: tempo de extração; rend: rendimentos obtidos experimentalmente; rendi: rendimentos calculados; Mrend: diferença entre o rendimento experimental e o calculado. b0, b1, b2 e b3 são os coeficientes lineares da equação descrita por (Meireles, 2008).

Tabela A13. Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados experimentais das OECs a um spline de três retas.

Condição experimental	Parâmetros cinéticos				
	t_{CER} (min)	t_{FER} (min)	M_{CER} ($\times 10^{-7}$ kg/s)	Y_{CER} ($\times 10^{-3}$ kg extrato/kg solvente)	R_{CER} (%, b.d.)
333 K/30 MPa/ CO ₂ :EtOH (85:15)	114	254	0,15	0,12	0,54
333 K/20 MPa/ CO ₂ :EtOH (85:15)	56	154	0,32	0,25	0,52
333 K/20 MPa/ CO ₂ :EtOH (25:75)	42	72	1,14	0,59	1,49
333 K/20 MPa/ CO ₂ :EtOH (10:90)	47	74	1,33	0,63	2,18
393 K/ 8 MPa/ EtOH puro	26	65	3,82	2,94	3,20

4 AUMENTO DE ESCALA E AVALIAÇÃO ECONÔMICA

A partir dos dados cinéticos obtidos nos experimentos relativos ao Capítulo 3 foi realizada uma simulação do processo de obtenção do extrato das raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) por extração com líquido pressurizado através do software SuperPro Designer® seguindo a metodologia de Santos et al. (2012).

A seguir estão apresentados os resultados obtidos para o aumento de escala e custo de manufatura do extrato das raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) (Tabela A14) que resultaram no artigo apresentado no Capítulo 3.

Tabela A14. Dados utilizados e obtidos na simulação do processo de extração com líquido pressurizado das raízes de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) através do software SuperPro Design®.

Densidade aparente do leito (kg/m ³): 550,00 ± 0,30						
Porosidade do leito: 0,68						
Volume do extrator (m³)	0,005		0,05		0,5	
Massa de matéria-prima (kg)	2,74		27,40		274,00	
Tempo (min)	S (Kg) p/ 2 extratores	COM (US\$/kg de extrato)	S (Kg) p/ 2 extratores	COM (US\$/kg de extrato)	S (Kg) p/ 2 extratores	COM (US\$/kg de extrato)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	10,95	505,54	109,50	462,59	1095,02	453,10
20	21,90	418,76	219,00	369,91	2190,03	359,34
25	32,85	369,54	328,50	321,10	3285,05	310,85
30	43,80	343,41	438,01	289,39	4380,07	278,38
35	54,75	322,17	547,51	267,87	5475,08	256,31
40	65,70	312,58	657,01	253,21	6570,10	240,74
45	76,65	304,09	766,51	241,34	7665,12	228,16
50	87,60	296,54	876,01	231,49	8760,13	217,65
55	98,55	291,93	985,51	223,43	9855,15	208,88
60	109,50	289,78	1095,02	217,16	10950,17	201,88
65	120,45	285,80	1204,52	210,91	12045,18	195,08
70	131,40	284,02	1314,02	206,51	13140,20	190,05
80	153,30	282,54	1533,02	197,86	15330,23	180,14
90	175,20	279,57	1752,03	190,78	17520,26	171,97
100	197,10	280,06	1971,03	185,27	19710,30	165,38
110	219,00	278,99	2190,03	180,57	21900,33	159,66
120	240,90	279,46	2409,04	176,72	24090,36	154,89
130	262,80	281,30	2628,04	173,51	26280,40	150,69

S: solvente; COM: custo de manufatura do extrato.

5 CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DO TEOR DE BETA-ECDISONA

A seguir (Figura A11) é apresentado um cromatograma típico da análise do teor de beta-ecdisona por HPLC, no qual o pico de maior área, no tempo de retenção de aproximadamente 2 minutos, representa a beta-ecdisona. O eixo x corresponde ao tempo de retenção e o eixo y à absorbância.

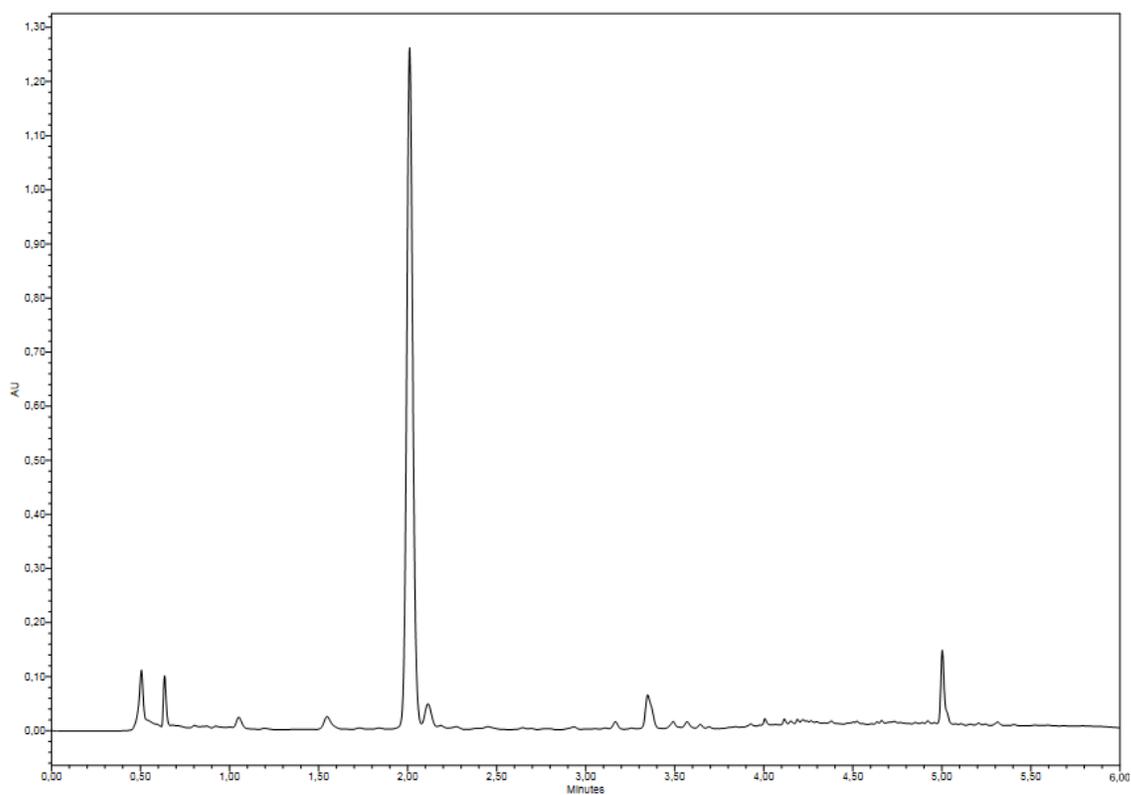


Figura A11. Cromatograma do primeiro ponto da cinética do Capítulo 3 (8 MPa/ 393 K/ etanol).

APÊNDICE 2

1 DETERMINAÇÃO DOS DADOS DE EQUILÍBRIO DE FASES A ALTAS PRESSÕES

1.1 Descrição do aparato experimental

As medidas experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões foram realizadas em uma célula de volume variável com visualização, baseado no método estático sintético. A unidade experimental encontrava-se disponível no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI – Campus de Erechim. A Figura A12 apresenta o diagrama esquemático da unidade experimental que foi usada neste estudo.

O diagrama esquemático apresentado na Figura A12 consiste basicamente nos seguintes itens com as respectivas funções:

C1) Cilindro de Solvente. Armazenamento do solvente empregado nos experimentos;

V1) Válvula Esfera (Modelo 7155F2Y, marca HOKE, Spartanburg, EUA). Isola o cilindro de solvente, quando aberta permite o fluxo de solvente do cilindro para a bomba;

V2) Válvula de Via Única (check-valve, Marca HOKE, Modelo 6133F2Y). A função dessa válvula é permitir o fluxo apenas em um sentido; é inserida entre o cilindro de solvente e a bomba após a válvula V1 com o intuito de evitar que pressões muito elevadas (pressão do experimento) fossem aplicadas na cabeça do cilindro;

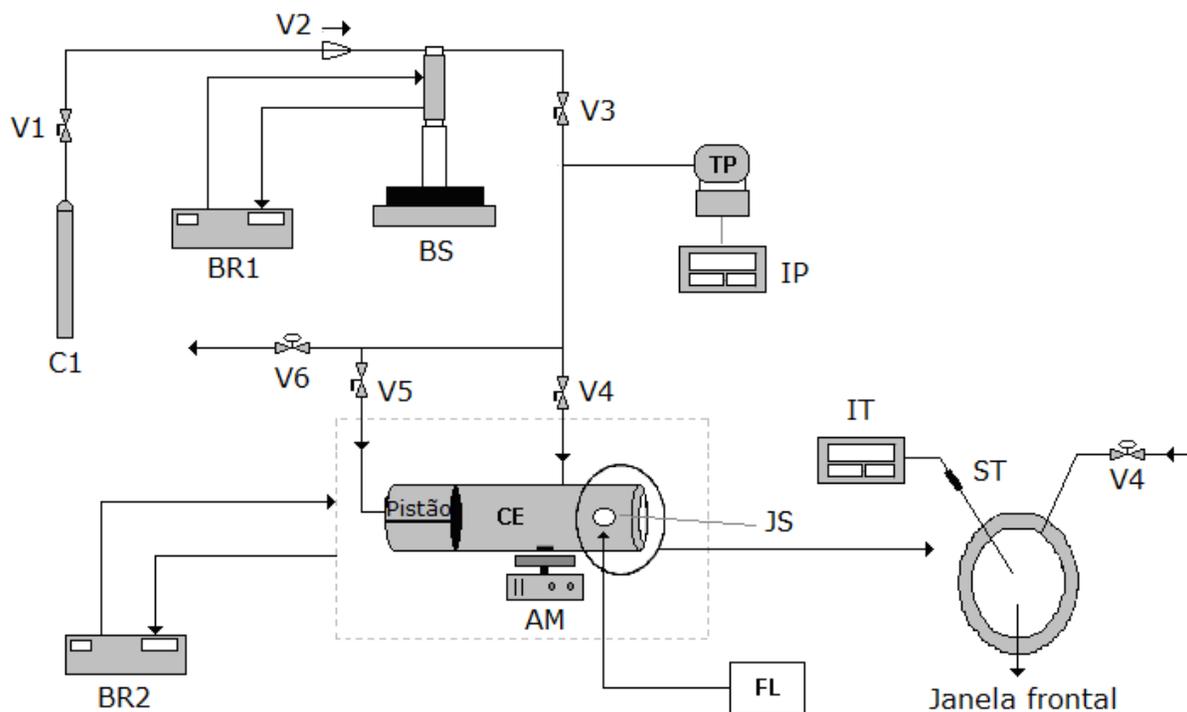


Figura A12. Diagrama esquemático do aparato experimental de equilíbrio de fases, adaptado de Lanza (2004).

BR1) Banho de Recirculação 1. Utilizado para manter a temperatura do cilindro da bomba constante;

BS) Bomba de Alta Pressão (Bomba de Seringa, Modelo 500 D, marca ISCO, Lincon, EUA). Para a medida de equilíbrio de fases através desta técnica é necessário um equipamento que permita a quantificação da massa de fluido deslocada e que sirva para manipular a pressão do sistema. Bombas do tipo seringa encaixam-se perfeitamente nesse contexto, pois possuem um cilindro interno na qual pode ser computado o volume ou massa de fluido e, ao mesmo tempo, permite a pressurização e despressurização do sistema conforme este fluido é deslocado (a partir ou para dentro) deste reservatório, respectivamente. A bomba de seringa marca ISCO / modelo 500D possui um cilindro

interno de 500 mL, pressão de trabalho de até 300 bar e fluxo de até 107 ml/min. O cilindro da bomba é encamisado, o que possibilita a manutenção da temperatura do reservatório em um valor pré-determinado com auxílio de um banho de recirculação (BR1);

V3) Válvula de Esfera (Marca SWAGELOK, Modelo SS-H83PF2). Utilizada para isolar a unidade da bomba de alta pressão durante a montagem e desmontagem da célula de equilíbrio, uma vez que a função das válvulas de esfera é interromper ou permitir o fluxo em uma determinada linha;

CE) Célula de Equilíbrio. Consiste em um cilindro de aço inox 316, com diâmetro interno de 17,2 mm e comprimento de 176 mm. No interior da célula existe um pistão que tem por objetivo controlar o volume e, conseqüentemente, a pressão do sistema. Desconsiderando o volume ocupado pelo pistão, a capacidade máxima dessa célula é de 25 mL. A célula possui duas entradas superiores: uma para conexão com o termopar (**ST**) tipo Y e outra com a válvula **V4**; uma entrada lateral onde é fixada a janela de safira lateral (**JS**) e entradas frontal (**Janela Frontal**) e traseira (fechamento da célula e conexão com a válvula **V5**). A célula é envolta por uma camisa conectada a um banho térmico cuja função é manter a temperatura desejada na célula. A Figura A13 apresenta a vista geral da célula de equilíbrio de volume variável utilizada nesse estudo e a Figura A14 apresenta os seus componentes.



(a)



(b)

Figura A13. Vista geral da célula de equilíbrio de volume variável do Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI, Campus Erechim; (a) somente a célula e (b) célula envolta pela camisa.



Figura A14. Componentes da célula de equilíbrio: 1- rosca frontal; 2 – rosca do fundo; 4,5 e 6 – o-rings; 7 – janela de safira.

PISTÃO) Pistão móvel inserido no interior da célula. Possui dois anéis de BUNA N90 localizados em suas extremidades, que permitem a ele deslizar pelo interior da célula e garantem a vedação entre o fundo e a frente da célula. Através da manipulação deste pistão

controla-se a pressão dentro da célula. A Figura A15 apresenta o pistão, na parte superior da figura ele pode ser visualizado montado e na parte inferior são mostrados seus componentes.



Figura A15. Pistão montado e seus componentes (Fonte: Lanza, 2004).

JS e Janela Frontal) A célula possui duas janelas de safira (Swiss Jewel Company), sendo uma **Janela Frontal** ($d = 25,4$ mm e espessura = 9,52 mm) para visualização do interior da célula (Figura A16) e outra lateral (**JS**) ($d = 15,87$ mm e espessura = 4,76 mm) para a entrada de luz. As janelas são fixadas à célula conforme apresenta a Figura A17.

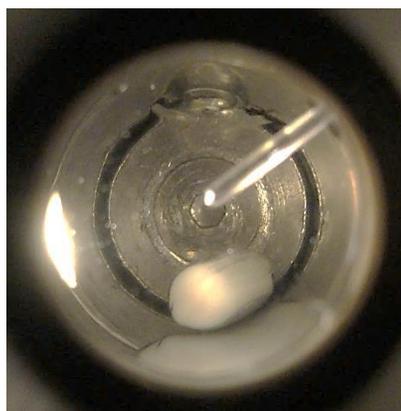


Figura A16. Detalhe da janela de safira mostrando o posicionamento do termopar.

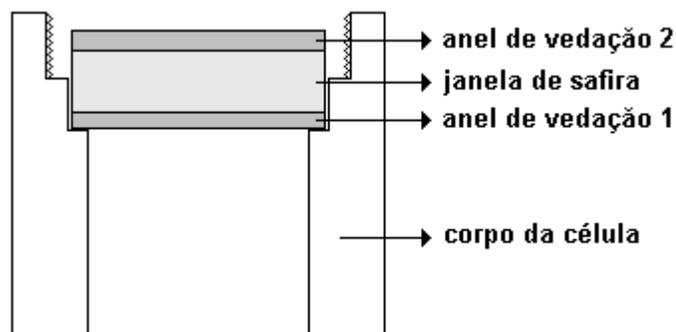


Figura A17. Posicionamento da janela de safira na célula de equilíbrio (Fonte: Lanza, 2004).

Os anéis de vedação da Figura A17 podem ser de borracha, teflon ou cobre. Para a janela frontal foi utilizado um anel de borracha na posição do anel de vedação 1 e um anel de cobre na posição do anel de vedação 2. Para a janela lateral foram utilizados dois anéis de teflon.

V4) Válvula de alimentação (Válvula agulha, marca HIP, modelo 1511AF1). Permite a alimentação do líquido comprimido de forma gradual e, conseqüentemente, uma regulagem do fluxo de solvente que é alimentado à célula;

V5) Válvula cuja função é impedir a passagem de fluxo para o fundo da célula durante o processo de carga do solvente ao sistema e também para permitir a pressurização do fundo da célula através da passagem do líquido comprimido até o fundo do pistão. (Válvula esfera, marca SWGWLOK, modelo SS-H83PF2).

V6) Válvula de descarga (Válvula agulha, marca HIP, modelo 1511AF1) do sistema e despressurização do fundo da célula. Deve ser inserida nessa posição para evitar o efeito Joule-Thompson durante a descarga;

BR2) Banho termostático de recirculação ligado a uma camisa em volta da célula de

equilíbrio;

IT) Indicador de Temperatura;

ST) Termopar tipo Y. Sensor de temperatura usado para medir o valor real da temperatura na solução no interior da célula;

TP) Transdutor de Pressão. É conectado à linha proveniente da bomba para verificar a real pressão do sistema;

IP) Indicador de Pressão. Recebe um sinal digital do TP indicando a pressão da linha;

FE) Fonte de Alimentação de Energia.

AM) Agitador Magnético. O sistema de agitação tem como objetivo agilizar o alcance do equilíbrio. Para tal deve ser inserido na célula uma barra de ferro coberta com uma camada de teflon (“peixinho”), acionado pelo AM inserido logo abaixo da célula de equilíbrio;

FL) Fonte de Luz. Feixe de luz branca na janela lateral de safira para iluminar o interior da célula e assim facilitar a visualização das transições de fases.

Uma vista geral da unidade de equilíbrio de fases a altas pressões pode ser observada na Figura A18.

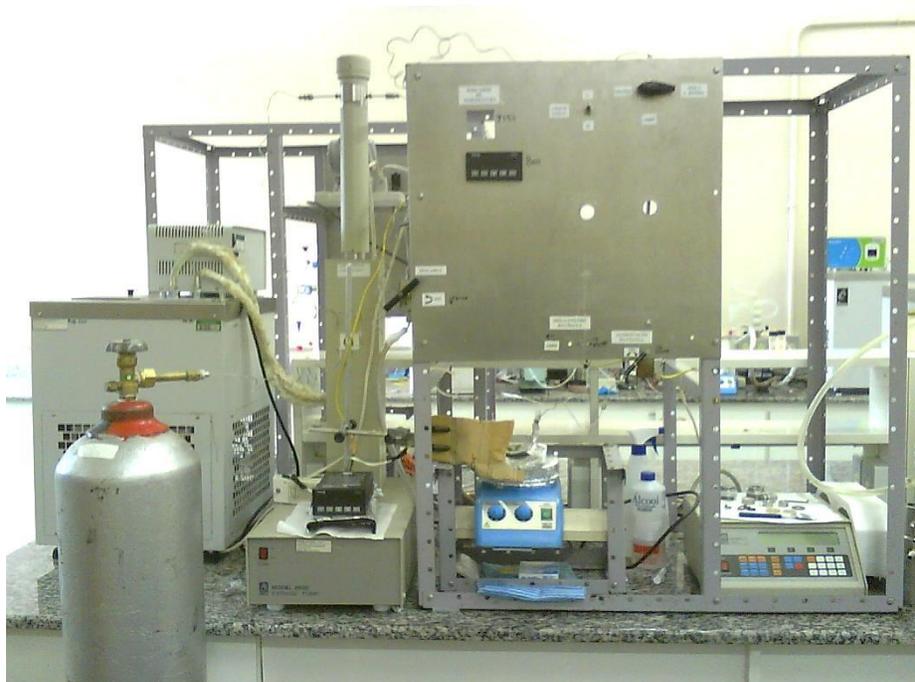


Figura A18. Vista geral da unidade de equilíbrio de fases do Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI, Campus de Erechim.

1.2 Procedimento experimental

O aparato experimental foi empregado para conduzir os experimentos até aproximadamente 25 MPa e 353 K. A relação mássica de etanol para dióxido de carbono ou propano foi mantida constante em 1:9 para todas as medições experimentais, proporcionando tempo adequado para a solubilização e visualização correta das transições de fase. O etanol foi escolhido por ser um solvente GRAS (Generally recognized as safe), de qualidade alimentar, sendo seguro e produzido a partir de fontes renováveis, dentre outras vantagens. A fração mássica global da mistura (CO_2 + etanol) variou de 0,93 a 0,99, em intervalos de 0,01, e a fração mássica global da mistura (propano + etanol) variou de 0,95 a 0,99, em intervalos de 0,005.

O procedimento experimental adotado para medidas de equilíbrio de fases a altas pressões iniciou-se com o carregamento do cilindro da bomba com o solvente (propano ou dióxido de carbono) proveniente do cilindro de estocagem. A carga de solvente envolve algumas etapas, sendo a primeira a transferência do solvente do cilindro (C1) para a câmara interna da bomba (BS). Deve-se ter uma quantidade de solvente relativamente grande dentro da câmara da bomba já que o próprio solvente foi utilizado como fluido pressurizador. É importante notar que, quanto maior a quantidade de solvente transferida para dentro da câmara da bomba, menos vezes foi necessário repetir o procedimento de carga na bomba.

Posteriormente, foi ajustada a temperatura do banho de recirculação (BR1), em torno de 278 K, para manter a temperatura no cilindro da bomba constante e a pressão foi mantida em torno de 100 bar. A válvula V3 foi então aberta e a pressão elevada através da bomba, pressurizando toda a linha. Enquanto a pressão e o fluxo de solvente estabilizavam, foi realizada a montagem da célula de equilíbrio. Para isso, foram obedecidos passos cuidadosos para a sua montagem e fechamento. Primeiramente foi realizada a montagem do pistão, sendo o fechamento de suas extremidades efetuado de forma que ele pudesse deslizar pelo interior da célula e não permitisse a passagem de fluido do fundo para frente e vice-versa. Posteriormente, foram manipuladas as roscas (Figura A14) de fechamento da célula. Após isso, a célula foi posicionada adequadamente na unidade experimental sem ser conectada ainda à linha.

Na metodologia sintética estática aqui empregada, deve-se conhecer a composição global do sistema em estudo. Na pesagem do monômero e do etanol foi utilizada uma balança de precisão (Marca GIBERTINI, Modelo E154 com precisão de 0,0001g, Milão, Itália). O L-ácido láctico, por ser sólido, foi colocado dentro da célula antes de fechá-la. Já

o etanol foi injetado no interior dela por meio de uma seringa com agulha através do orifício no qual, posteriormente, foi colocado o termopar. Após essa etapa, as linhas que contêm as válvulas V4 e V5 foram conectadas à célula.

A bomba seringa possui um reservatório interno encamisado (cilindro da bomba) de forma que se pode conhecer o volume de solvente dentro do reservatório a uma determinada pressão e temperatura. A medida do volume deslocado, a fim de formar uma mistura de composição desejada, foi computada baseada no decréscimo do volume interno do cilindro da bomba pela abertura da válvula V4. Para tal, foi necessário conhecer a densidade do solvente como líquido comprimido na pressão e temperatura do cilindro da bomba (10 MPa e 278 K).

A temperatura e pressão do solvente na bomba foram mantidas constantes durante a carga e a massa de solvente adicionada foi computada com base em sua densidade. Dessa forma, a célula foi carregada com composição global conhecida. Uma vez que o sistema foi estabilizado (fluxo da bomba estável em $\pm 0,01$ ml/min – em torno de 30 minutos), a válvula V4 foi aberta lentamente, permitindo a entrada de solvente na célula, até que o volume da câmara da bomba atingisse o valor pré-estabelecido para fornecer a composição desejada dentro da célula de equilíbrio. Durante o processo de carga do solvente, nenhuma pressão foi aplicada no fundo do pistão, para permitir que o experimento começasse com a célula em seu volume máximo. Após a alimentação, a pressão do sistema foi então reduzida, por meio do agitador magnético o sistema foi continuamente agitado e o aquecimento (BR2) foi acionado. Com a válvula V4 fechada e a temperatura do sistema estabilizada, a válvula de esfera V5 foi aberta para permitir a entrada do solvente no fundo da célula ocasionando a movimentação do pistão e, assim, um aumento gradativo da pressão no interior dela até o sistema atingir uma condição monofásica.

Mantendo-se a temperatura constante e a solução sob agitação, iniciou-se a despressurização lenta do sistema através da diminuição gradativa da pressão pela bomba. A despressurização foi mantida até o surgimento incipiente de uma segunda fase (ponto B na Figura A19), sendo que ao menor sinal da transição de fases a ação da bomba foi interrompida e aguardado alguns minutos para a estabilização do sistema e identificação do tipo de transição e da interface entre as fases segregadas. Após ter sido estabilizada a pressão neste ponto, anotou-se o valor dela e em seguida o sistema foi pressurizado novamente para repetir o procedimento. Como a bomba de seringa possui uma opção para programar gradientes de pressão, foram selecionados os valores inicial e final de pressão e o tempo para emprego do programa foi fixado de forma que resultasse em gradientes de pressão tipicamente da ordem de 2,0 a 3,5 bar/min, dependendo do tipo de transição de fase que fosse identificado.

Esse procedimento foi repetido (aumento da pressão até que se forme uma fase e posterior redução da pressão até o surgimento da transição de fases) no mínimo 3 vezes para avaliar a repetibilidade da metodologia experimental e obter um valor médio da pressão de transição à temperatura e composição global constantes.

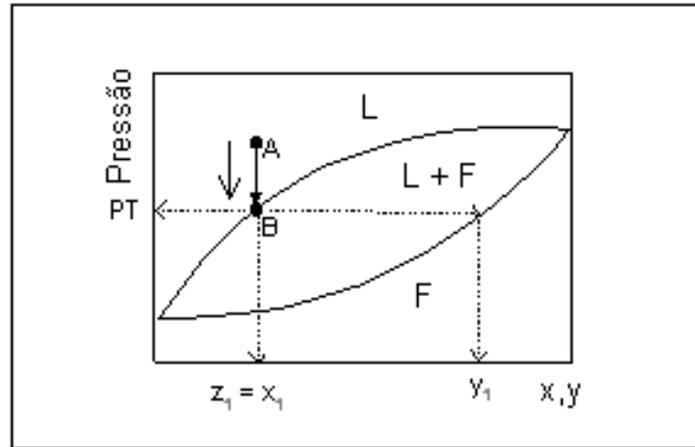


Figura A19. Esquema da transição líquido-fluido em um diagrama P-x. PT = Pressão de transição; z_1 = composição global do componente 1; x_1 = composição do componente 1 na fase líquida. Fonte: Lanza (2004).

Após a medida experimental em uma temperatura, a temperatura do sistema foi modificada e o processo descrito anteriormente repetido outras vezes. Dessa forma, para uma composição global constante, foi possível obter uma curva P-T para o sistema em estudo. As temperaturas investigadas foram 323, 333, 342 e 353 K.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C. L. C. **Obtenção de sementes desengorduradas e de óleo rico em tocotrienóis de urucum por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processo, do aumento de escala e da viabilidade econômica.** (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 288 p. 2013.

LANZA, M. **Comportamento de fases dos óleos de oliva, soja e mamona em n-butano e propano a alta pressão.** (Mestrado). Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. p. 2004.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: MARTINEZ, J. (Ed.). **Supercritical Fluid Extraction of nutraceuticals and bioactive compounds** Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2008. p.243-274.

PEREIRA, C. G. **Obtenção de extratos de leiteira de dois irmãos (*Tabernaemontana catharinensis* A.D.C.), cidrão (*Aloysia triphylla* L'Hérit. Britton) e manga (*Mangifera indica* L.) por extração supercrítica: Estudo dos parâmetros de processo, caracterização e atividade antioxidante dos extratos.** (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. p. 2005.

PRADO, J. M. **Estudo do aumento de escala do processo de extração supercrítica em leite fixo.** (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 283 p. 2010.

RODRIGUES, V. M.; SOUSA, E. M. B. D.; MONTEIRO, A. R.; CHIAVONE-FILHO, O.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+solute+solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, n. 1, p. 21-36, 2002.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 444-452, Feb 2012.

VEGGI, P. C. **Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom.** (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 220 p. 2013.

MEMÓRIAS DO DOUTORADO

Eu, Isabel Cristina do Nascimento Debien, participei do programa de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no curso de Doutorado em Engenharia de Alimentos no Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) durante o período de março de 2010 a março de 2014. As atividades de pesquisa apresentadas foram realizadas durante o trabalho no grupo de pesquisa do laboratório LASEFI (*Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de extratos vegetais*), sob orientação da Professora Doutora Maria Angela de Almeida Meireles.

As disciplinas obrigatórias oferecidas pelo programa de pós-graduação da FEA/DEA, TP 320 Termodinâmica, TP 322 Fenômenos de Transporte I e TP 323 Fenômenos de Transporte II, foram cursadas no ano de 2007, período em que estava matriculada no programa como estudante especial e por isso fui dispensada de cursá-las no período referente ao doutorado.

No primeiro ano de doutorado participei do projeto CAPES/PROCAD 244/2007 intitulado "Produção de micro e nanopartículas de biopolímeros para encapsulamento de extratos vegetais de interesse em Engenharia de alimentos". Durante a participação nesse projeto foram realizados os ensaios de determinação de equilíbrio de fases a altas pressões (Capítulos 4 e 5) no *Laboratório de Termodinâmica aplicada* da Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões (URI), Campus de Erechim.

Nos anos subsequentes realizei os ensaios de extração com fluido supercrítico e com líquido pressurizado no LASEFI com bolsa financiada pelo CNPq processo nº 151165/2010-6.

As pesquisas referentes ao presente projeto de doutorado resultaram em dois artigos publicados em periódicos [1,3] (Capítulos 2 e 5) e trabalhos publicados em anais de eventos, sendo um trabalho completo [6], um resumo expandido [7] e quatro resumos [8-11], com participação nos eventos *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids* (PROSCIBA 2013), *10th International Symposium on Supercritical Fluids* (ISSF 2012) e 9º. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA 2011).

Como formação complementar participei do curso “*Process Modeling and optimization with SuperPro Designer and SchedulePro*” ministrado por Demetri Petrides (Ph. D., President of Intelligen, Inc. and Course Director) no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) em novembro de 2010.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

[1] **DEBIEN, ISABEL C. N.**; MEIRELES, M. ANGELA A. Supercritical fluid extraction of beta-ecdysone from Brazilian ginseng roots (*Pfaffia glomerata*). *Food and Public Health*, v.4, n. 2, p. 67-73, 2014.

[2] ROSTAGNO, MAURÍCIO A.; **DEBIEN, ISABEL, C. N.**; VARDANEGA, RENATA; NOGUEIRA, GISLAINE C.; BARBERO, GERARDO F.; MEIRELES, M. ANGELA A. Fast analysis of β -ecdysone in Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) extracts by high performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytical Methods*, v.6, p. 2452-2459, 2014.

[3] **DEBIEN, ISABEL C.N.**; RIGO, ALINE A.; MAZUTTI, MARCIO A.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR; MEIRELES, M. ANGELA A. High-pressure phase equilibrium data for the l-lactic acid+(propane+ethanol) and the l-lactic acid+(carbon dioxide+ethanol) systems. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 79, p. 27-31, 2013.

[4] SILVA, JULIANA M.; RIGO, ALINE A.; DALMOLIN, IREDE A.; **DEBIEN, ISABEL**; CANSIAN, ROGÉRIO L.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR; MAZUTTI, MARCIO A. Effect of pressure, depressurization rate and pressure cycling on the inactivation of *Escherichia coli* by supercritical carbon dioxide. *Food Control*, v. 29, p. 76-81, 2013.

[5] **DEBIEN, ISABEL CRISTINA DO NASCIMENTO**; GOMES, MARIA THEREZA DE MORAES SANTOS; ONGARATTO, RICARDO SCHMITZ; VIOTTO, LUIZ ANTONIO. Ultrafiltration performance of PVDF, PES, and cellulose membranes for the treatment of coconut water (*Cocos nucifera L.*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (Online), v. 33, p. 676-684, 2013.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

[6] **DEBIEN, ISABEL C.N.**; VARDANEGA, R.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. ANGELA A. Optimization of pressurized liquid extraction of ecdysteroids from Brazilian ginseng roots. In: *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids* (PROSCIBA), Cartagena das Índias/Colombia, Proceedings of PROSCIBA 2013.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

[7] **DEBIEN, ISABEL C.N.**; RIGO, ALINE A.; MAZUTTI, MARCIO A.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR; MEIRELES, M. ANGELA A. High-pressure phase equilibrium data for the systems L-lactic acid + (Propane + Ethanol) and L-lactic acid + (Carbon dioxide + Ethanol). In: *10th International Symposium on Supercritical Fluids* (ISSF), San Fransisco/USA, 2012.

Resumos publicados em anais de congressos

[8] **DEBIEN, ISABEL C.N.**; MEIRELES, M. ANGELA A. Phase equilibrium data of complex systems and Pressurized liquid extraction study of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) ecdysteroids. In: *Workshop on Supercritical Fluids and Energy* (SFE'13), Campinas/Brasil, 2013.

[9] **DEBIEN, ISABEL C.N.**; VARDANEGA, R.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. ANGELA A. Optimization of pressurized liquid extraction of ecdysteroids from Brazilian ginseng roots. In: *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*(PROSCIBA), Cartagena das Indias/Colombia, 2013.

[10] VARDANEGA, R.;**DEBIEN, I. C. N.**; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. ANGELA A. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from brazilian ginseng roots (*Pfaffia glomerata*). In: *16 th World Congress of Food Science and Technology*, (IUFoST), Foz do Iguaçu/Brasil, 2012.

- [11] SANTOS, D. T.; VARDANEGA, R.; **DEBIEN, I. C. N.**; MEIRELES, M. ANGELA A. Extração de compostos bioativos de raízes de ginseng brasileiro em percolador de leito fixo assistido por ultrassom: validação do processo. In: **9o. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos** (SLACA), Campinas/Brasil, 2011.

