



UNICAMP

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos**

*EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE CURCUMINÓIDES DE *Curcuma longa* L. USANDO
COMO SOLVENTE MISTURA DE CO₂ + ETANOL E/OU ISOPROPANOL: UM ESTUDO
DA CINÉTICA E DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO EXTRATO*

Mara Elga Medeiros Braga

Engenheira Agrônoma, 1998 (UNESP/Botucatu)

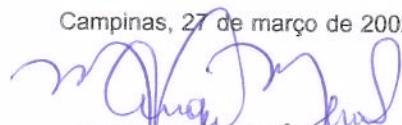
Prof^a. Dra. Maria Ângela de Almeida Meireles

Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Mara Elga Medeiros Braga**, aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de março de 2002.

Campinas, 27 de março de 2002



**Prof.ª Dra. Maria Ângela de
Almeida Meireles**
Presidente da Banca

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas – São Paulo

2002

UNIDADE 70
Nº CHAMADA T/UNICAMP
B73e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 49156
PROC 16-837/00
C _____ D X
PREÇO 12811,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00167668-5

51B ID 241037

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Braga, Mara Elga Medeiros

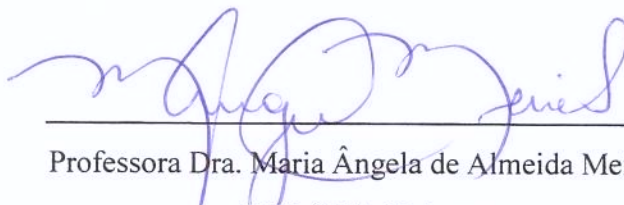
M73e
B73e

Extração supercrítica de curcuminóides de *Curcuma longa* L.
usando como solvente mistura de CO_2 +etanol e/ou isopropanol:
um estudo da cinética e das propriedades funcionais do extrato /
Mara Elga Medeiros. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

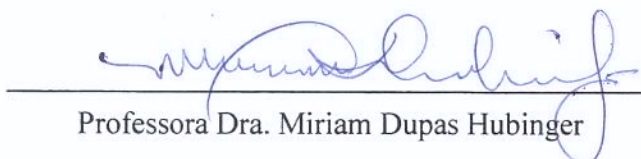
Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1.Curcuma. 2.Oleoresina . 3.Extração com fluido
supercrítico. I.Meireles, Maria Angela de Almeida.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

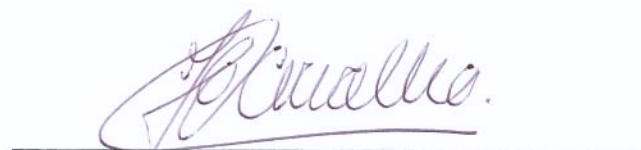
Membros da banca examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.



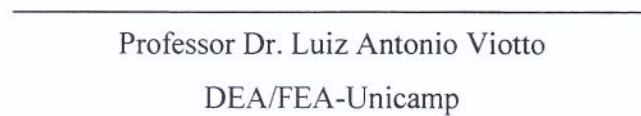
Professora Dra. Maria Ângela de Almeida Meireles
DEA/FEA-Unicamp



Professora Dra. Miriam Dupas Hubinger
DEA/FEA-Unicamp



Professor Dr. João Ernesto de Carvalho
CPQBA-Unicamp



Professor Dr. Luiz Antonio Viotto
DEA/FEA-Unicamp

Agradecimentos

À Fapesp, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À Fazenda Experimental Lageado da Faculdade de Ciências Agronômicas-UNESP e à Fazenda Experimental da EPAMIG em Maria da Fé-MG pela doação da matéria-prima utilizada nesta tese.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e seus professores pela visão de interdisciplinaridade.

À professora Dra. Maria Ângela de Almeida Meireles, pelo investimento, incentivo e pela credibilidade assistida a mim.

Ao professor Dr. Lin Chau Ming (FCA/UNESP) pelo constante apoio.

À Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques (IAC) pela colaboração e amizade.

Ao professor Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA) e à pesquisadora Ms. Daisy Sato (IAL) pela colaboração e atenção.

Ao Ariovaldo Astini, pela paciência e companheirismo.

À Patrícia Franco Leal, pela colaboração e parceria.

Aos colegas de trabalho, pela parceria e companheirismo.

Às amigas Silvânia Moreschi, Deise Alexandre, Junko Tsukamoto, Ana Luiza Braga e Josinira Antunes pelos ombros amigos e noites mal dormidas.

Aos meus pais que me ensinaram o caminho,
Aos meus irmãos que me apoiaram,
Aos amigos que me compreenderam...
aos que sonharam comigo,
E acima de tudo à Deus pela capacitação!

*"O coração do homem traça seu caminho, mas o Senhor
lhe dirige os passos... Porque o Senhor dá
sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o
entendimento".*

Provérbios 16:9 e 2:6

*"Neither a lofty degree of intelligence nor
imagination nor both together go to the making of
genius. Love, love, love, that is the soul of
genius".*

Wolfgang Amadeus Mozart [1756-1791]

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autora – Mara Elga Medeiros Braga

Título – *Extração supercrítica de curcuminóides de Curcuma longa L. usando como solvente misturas de CO₂ + etanol e/ou isopropanol: um estudo da cinética e das propriedades funcionais do extrato*

Orientadora – Prof^a. D^{ra}. Maria Ângela de Almeida Meireles

Departamento de Engenharia de Alimentos – DEA, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, março 2002.

A *Curcuma longa* L. originária da Índia contém curcuminóides que além de corante, possuem atividade antioxidante com efeito antimutagênico, indicados no tratamento preventivo do câncer. O objetivo deste trabalho foi selecionar um co-solvente a ser utilizado com CO₂ supercrítico, para se obter extratos com alto teor de curcuminóides, e determinar suas propriedades funcionais tais como: ação antioxidante, antiproliferativa e antibacteriana. Os experimentos foram conduzidos numa unidade de Extração Supercrítica (ESC) com extrator de leito fixo com diâmetro de $2,83 \times 10^{-2}$ m e comprimento de 0,375 m. Os experimentos foram realizados a 303,15 K; os co-solventes testados foram etanol, isopropanol, e a mistura destes (50:50); a porcentagem de co-solvente de 6,39% a 16,11%; a vazão total do solvente variou entre $0,47 \times 10^{-5}$ kg/s a $4,45 \times 10^{-5}$ kg/s, e pressões de 200 e 300 bar. Os extratos foram analisados por CGEM, CGDIC, CCD e Espectrofotômetro-UV. As propriedades funcionais foram obtidas medindo a atividade antioxidante (Monofalbmite test), a ação antibacteriana (Microplate Alamar Blue Assay) e a ação antiproliferativa. Os resultados mostram a influência da origem na matéria-prima e do co-solvente quanto ao rendimento dos CC. O melhor co-solvente foi a mistura de etanol/isopropanol a 13,59% (massa) na vazão de $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s, pressão de 300 bar e matéria-prima originária em São Paulo-Brasil, com rendimento de CC de 1,81%. A extração supercrítica produziu extratos com as frações volátil e pesada (CC). O resíduo do processo contém traços de CC o que poderiam imprimir propriedades funcionais no amido residual, classificando-o como amido especial. A atividade antioxidante foi de 80-95% de inibição para 3h de reação. A atividade antiproliferativa apresentou efeitos citostático e citocida a partir de 0,25 µg/mL e 250 µg/mL de extrato, respectivamente. A atividade antibacteriana iniciou na concentração do extrato acima de 256 µg/mL (CIM).

Palavras-chave: *Curcuma longa* L., curcuminóides, extração supercrítica, co-solvente.

MASTER THESIS

Author – Mara Elga Medeiros Braga

Title – *Supercritical Extraction of Curcuminoids from Curcuma longa L. using as solvent mixtures of CO₂ + Ethanol, and or Isopropyl Alcohol: a study of the kinetics and the functional properties of the extracts*

Major Professor – Prof. Dr. Maria Angela de Almeida Meireles

Department of Food Engineering (DEA), College of Food Engineering (FEA), Unicamp, March 2002.

The *Curcuma longa* L is indigenous to India. It contains curcuminoids (CC), which besides its coloring power have been reported as possessing antioxidant action such as anti-mutagenic effect; therefore, they are indicated for preventive cancer treatment. The objective of this work was to select a co-solvent to be used with supercritical CO₂ to obtain turmeric extracts with high curcuminoids content, and determine their functional properties such as antioxidant, antibacterial and antimutagenic. The experimental runs were conducted in a SFE unit containing a fixed bed extractor with a diameter 2.83×10^{-2} m and length of 0.375 m. The experimental runs were performed at 303 K; co-solvent ethanol, isopropyl and their mixture (50:50) in the proportion of 6.39% to 16.11% (mass); the total solvent flow rates varied from 0.47×10^{-5} kg/s to 4.45×10^{-5} kg/s, and pressures of 200 and 300 bar. The compositions of the extracts were analyzed using GCMS, GCFID, TLC and UV spectrophotometer. The functional properties were assed measuring the antioxidant activity (Monofalbmitate test), the action against mycobacterium (Microplate Alamar Blue Assay test), and the antiproliferative activity. The results showed that the origin of the raw material and the co-solvent influenced the yield of CC. The best process conditions were total solvent flow rate of 1.93×10^{-5} kg/s, pressure of 300 bar, mixture of the co-solvent of the ethanol/isopropyl at 13.59% (mass), and raw material grown at São Paulo-Brazil, with yield of the CC of 1.81%. SFE extracts contain both the volatile oil and heavy fraction (CC). The SFE residue contains traces of CC that can impart some functional properties to the residual starch, thus classifying it as a special starch. The antioxidant activity varied from 80 to 95% of inhibition after 3 h of reaction. The antiproliferative activity showed effects cytocide and cytostatic, for extract concentrations of 0.25 µg/mL and 250 µg/mL, respectively. The antibacterial activity started at an extract concentration above 256 µg/mL (MIC).

Keywords: *Curcuma longa* L., curcuminoids, supercritical extraction, co-solvent.

Índice Geral

Resumo	
Capítulo 1	1
1. Introdução	3
Capítulo 2	6
2. Revisão Bibliográfica	7
2.1 Corantes	7
2.1.1 Importância econômica	8
2.2 Toxicologia	9
2.2.1 Antioxidante	10
2.2.2 Outras Atividades Farmacológicas	12
2.3 Aspectos Gerais da <i>Curcuma longa</i> L.	13
2.3.1 Botânica	13
2.3.2 Cultivo	17
2.3.4 Estudos Agronômicos	17
2.3.4.1 Adubação nitrogenada	19
2.4 Composição química	19
2.4.1 Caracterização química da curcumina	20
2.4.1.1. Estruturas químicas	21
2.5 Qualidade da matéria-prima	22
2.6 Extração de pigmentos	23
2.7 O processo de Extração Supercrítica	23
2.7.1 Fluido Supercrítico	25
2.7.2 Dióxido de Carbono como solvente	26
2.7.3 Modificadores ou co-solventes	27
2.8 Cinética de Transferência de Massa	29
2.9 O resíduo	30
Capítulo 3	33
3. Materiais e Métodos	33
3.1 Obtenção e pré-processamento da matéria-prima	33
3.2 Caracterização da matéria-prima	35
3.2.1 Determinação da distribuição do tamanho das partículas (DTP).	35
3.3.2 Determinação do diâmetro médio das partículas	35
3.3.3 Densidade Real e Aparente	36

3.3.4 Composição Centesimal	36
3.3 Métodos de Extração	40
3.3.1 Extração com solvente orgânico (Soxhlet)	40
3.3.3 Hidrodestilação	40
3.3.4 Extração Supercrítica	41
3.3.4.1 Unidade de Extração	41
3.3.4.2 Procedimento Experimental	45
3.4 Utilização de adsorvente – “porapack”	47
3.5 Remoção do co-solvente	47
3.6 Análise da composição química dos Extratos	48
3.6.1 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	48
3.6.2 Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC)	49
3.6.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	49
3.6.4 Quantificação dos Curcuminóides por Espectrofotometria UV-visível	49
3.6.4.1 Teor de curcuminóides no extrato	50
3.7 Propriedades funcionais dos extratos	50
3.7.1 Atividade Antioxidante	50
3.7.2 Atividade Bacteriana	51
3.7.3 Atividade Antiproliferativa	52
3.8 Planejamento experimental	54
3.9. Forma de Análise dos Resultados	57
3.9.1 Análise das Curvas Globais de Extração	57
Capítulo 4	60
4. Resultados e Discussões	60
4.1 Treinamento na unidade Extratora	60
4.2 Análises Preliminares	60
4.3 Caracterização das partículas e do leito: Densidade, Porosidade e diâmetro Médio das partículas	61
4.4 Composição centesimal	62
4.5 Resíduo	63
4.6 Extrações	63
4.6.1. Extração por Soxhlet e Hidrodestilação	63
4.6.2. Extração Supercrítica	63
4.6.2.1. Ensaios Preliminares	63
4.6.2.2. Primeiro Grupo de Ensaios	66
4.6.2.2.1. Composição Química dos extratos	68
4.6.2.2.2. Análise Estatística	77

4.6.2.3 Segundo Grupo de Ensaios	79
4.6.2.3.1 Composição Química dos Extratos	85
4.6.2.3.2 Análise Estatística	93
4.6.2.4. Adsorvente	95
4.7. Propriedades Funcionais dos Extratos	97
4.7.1 Atividade Antioxidante	97
4.7.2 Atividade Antibacteriana	98
4.7.3 Atividade Antiproliferativa	98
Capítulo 5	102
5. Conclusões	103
5.1 Sugestões	104
Capítulo 6	105
6. Referências Bibliográficas	106
Capítulo 7	118
7. Apêndices e anexos	119

Nomenclatura

BDMC - bisdesmetoxicurcumina

CC – curcumina ou curcuminóides (mg)

CIM- concentração inibitória mínima

DMC – desmetoxicurcumina

da- densidade aparente (kg/m^3)

dr- densidade real (kg/m^3)

Dp- diâmetro médio das partículas

EtOH- etanol

Iso-C3- isopropanol

MIC- mínima concentração inibitória ($\mu\text{g/mL}$)

M0- massa de solvente na alimentação da bomba (kg)

M1- massa de solvente retida na célula extratora (kg)

M2- massa de solvente retida no frasco coletor (kg)

M3- massa de solvente obtida na saída do bolhometro calculada por diferença (kg)

M_{CER} - taxa de extração no período de velocidade de extração constante (kg/s)

Q_{CO_2} - vazão do solvente (kg/s)

R_{CER} - rendimento do extrato na etapa de taxa constante de extração (%)

R_{Total} – rendimento da curva global de extração (%)

t-tempo (s)

t_{CER} – duração da etapa de taxa constante de extração (s)

Y – razão mássica de soluto na fase fluída (%)

ϵ - porosidade do leito

ρ_{CO_2} –densidade do CO_2 (kg/m^3)

ρ_{EtOH} –densidade do etanol (kg/m^3)

ρ_{IsoC3} –densidade do isopropanol (kg/m^3)

Capítulo 1. Introdução



Curcuma longa L.

1. Introdução

A utilização de corantes artificiais tem sido restringida pelo mercado internacional, valorizando as matérias-primas compostas por corantes naturais (Govindarajan, 1980). Dentre as formas de corantes de origem vegetal, com potencialidade de aplicação industrial, encontra-se a cúrcuma, rizoma de coloração amarela, capaz de substituir corantes sintéticos, como tartrazina (Govindarajan, 1980), causador de problemas alérgicos ao homem (Lauro, 1992).

Substâncias extraídas da cúrcuma, páprica e açafrão e pigmentos minerais inorgânicos têm sido usadas há centenas de anos. Em meados do século dezenove, tinturas orgânicas sintéticas foram desenvolvidas criando uma extensa variedade de aditivos corantes de importância econômica, mas ultimamente os corantes naturais vêm revolucionar este mercado (Hallagan, 1991).

O extrato obtido do rizoma da cúrcuma possui uma coloração amarelo ouro-marrom. A espécie *Curcuma longa* L. é originária da Índia e pode ser encontrada na China, nas Ilhas Caribenhas e Países da América do Sul (Govindarajan, 1980; FAO, 2001).

Os maiores importadores de cúrcuma da Índia são o Irã, Líbia, Estados Unidos e Japão (Govindarajan, 1980). No Brasil a expressão econômica do cultivo de cúrcuma ainda é pequena. O município de Mara Rosa, Goiás, apresenta o maior plantio comercial, com cerca de 150 ha e produtividade média de 12t/ha de rizomas, destinados às indústrias nacionais de corantes e alimentos (Globo Rural, 1994). A cultura da cúrcuma ou açafrão têm exploração comercial restrita no Brasil, mas sua origem tropical indica potencial para estudos a nível nacional (Goto, 1996).

Seu uso na indústria é amplo, sendo utilizada na forma de pó, concentrado, ou na forma de oleoresina, são empregados na produção de alimentos com a função predominante de colorir o produto final (Govindarajan, 1980; Montaldo, 1972).

O teor de oleoresina dos rizomas processados de acordo com Mathai (1979) encontra-se na faixa de 3 a 6%. Predominantemente é constituído por cetonas sesquiterpênicas (Kelkhar, 1934) e 2 a 8% de curcumina (CC) segundo Montaldo (1972). A identificação dos curcuminóides por Srinavasan (1953) revelou a presença de dois

derivados desmetoxilados da curcumina presentes na oleoresina e responsáveis pela coloração amarela característica dos rizomas de cúrcuma, a desmetoxi-curcumina (DMC) e a bis-desmetoxi-curcumina (BDMC).

A curcumina forma complexos estáveis com proteínas, possuindo propriedades antioxidantes e esta propriedade é usada para formulação sofisticada de corantes naturais (Lauro, 1992).

Os curcuminóides são solúveis em solventes orgânicos como etanol, álcool isopropílico, ácido acético glacial e insolúveis em água, éter (Merck, 1999) e dióxido de carbono supercrítico.

Estudos com a oleoresina verificaram a sua atividade antimicrobiana (Allievi, 1984), efeito vasorelaxante, sugerindo o potencial terapêutico destes componentes em doenças cardiovasculares (Ashraf, 1999). Olajide (1999) reconheceu o efeito antitrombótico do extrato de *Curcuma longa* em ratos. A ação antioxidante e antimutante da oleoresina e da curcumina e as propriedades anti-inflamatórias foram estudadas para prevenção do câncer por Mukundan (1993), Chan (1998) e Krishnaswamy (1998).

De acordo com Chassagnez (1998), o processo convencional de extração de curcuminóides com solventes orgânicos mostrou-se de baixa eficiência e seletividade em relação ao processo de extração supercrítica com CO₂ quando adicionado um co-solvente (etanol).

A extração da oleoresina com CO₂ supercrítico constitui-se em uma alternativa importante do processamento de cúrcuma, devido à inerente instabilidade apresentada pelos corantes naturais, quando submetidos a processos térmicos. A extração com gases supercríticos envolve altas taxas de transferência de massa, em temperaturas relativamente baixas, fundamental para a extração de produtos naturais (óleos essenciais, oleoresinas, princípios ativos, etc.) onde a qualidade do produto final é de grande importância (Kiran & Brennecke, 1993). O resíduo amiláceo do processo de extração dos curcuminóides da cúrcuma por CO₂ retém teores de curcumina consideráveis (Chassagnez, 1998), podendo ser caracterizado como um amido de alto potencial comercial.

Este trabalho teve como objetivos selecionar um co-solvente (etanol, isopropanol e etanol/isopropanol) na extração supercrítica com CO₂, afim de obter alto teor de curcuminóides; caracterizar estes nos diferentes tratamentos monitorando a composição química; estudando a cinética de extração e as propriedades funcionais do extrato, para obtenção do corante e antioxidante natural com máximo rendimento, a partir da seleção de uma matéria-prima de qualidade, verificada pela sua origem (Minas Gerais e São Paulo).

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica



Rizomas de *Curcuma longa* L.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Corantes

Os aditivos corantes têm sido utilizados em alimentos salientando-se o valor estético, mas também têm sido identificados como drogas e outros produtos de alto valor. Em meados do século dezenove, tinturas orgânicas sintéticas foram desenvolvidas criando uma extensa variedade de aditivos corantes de importância econômica, mas ultimamente os corantes naturais vêm revolucionar este mercado (Hallagan, 1991), embora produtos como a cúrcuma, páprica e açafrão e pigmentos minerais inorgânicos têm sido usados há centenas de anos.

O termo “natural” tem grande importância econômica sendo muito utilizado como produtos “saudáveis”. Embora haja tentativas de se definir com precisão este termo a definição a seguir é geralmente aceita (Andrés, 1980). No mercado, o corante pode ser considerado “natural” se:

- a) Existir pesquisa agrícola e biológica;
- b) Forem extraídos sem reação química e,
- c) Existir uma longa história de uso.

Os corantes encontrados dentro desta definição são permitidos para utilização em alimentos. De acordo com Andrés (1980), entre os corantes naturais encontrados estão a cúrcuma e a oleoresina da cúrcuma. A lista de corantes naturais é pequena e somente poucos estão disponíveis em quantidades suficientes para serem usados na produção de alimentos. Estes corantes têm sido utilizados por longo tempo, mas limitados pela disponibilidade de corantes artificiais que são altamente favorecidos pelo custo, estabilidade, nível utilizado e facilidade de aplicação, exceto em produtos como queijo e manteiga. Os corantes naturais são mais caros, requerem maior quantidade para obter o mesmo poder corante e não são de fácil utilização como os artificiais. Geralmente resultam num produto de alto valor comercial, com 30 a 50 % maior que os artificiais. Por ser extremamente baixo o nível de corante utilizado este aumento comparado ao custo total é insignificante, provavelmente menos que 0,1% do total do custo do alimento produzido (Andrés, 1980). Embora os corantes naturais tenham limitações, podem ser utilizados em alimentos requerendo conhecimento técnico de cada corante, habilidade artística, criatividade, e contato com pesquisas relacionadas (Lauro, 1992).

O extrato obtido do rizoma da cúrcuma possui uma coloração amarelo ouro-marrom. Segundo Lauro (1991), entre o grupo de cromóforos da cúrcuma o maior é a curcumina. Oleoresinas de alta qualidade encontram-se praticamente livres de outros corantes que usualmente estão presentes no extrato bruto. Mas a maior limitação deste cromóforo é a baixa estabilidade à luz, tem boa estabilidade térmica e não é afetado pelo pH desde que o sistema seja alcalino. A curcumina forma complexos estáveis com a proteína, e esta propriedade é usada para formulação sofisticada de corantes naturais, além de propriedades antioxidantes. Da cúrcuma comercial é obtida a oleoresina e desta, o corante curcumina (Lauro, 1991).

A identificação dos curcuminóides por Srinivasan (1953) revelou a presença de outros dois derivados desmetoxilados da curcumina presentes na oleoresina e responsáveis pela coloração amarela característica dos rizomas de cúrcuma, a desmetoxi-curcumina (DMC) e a bis-desmetoxi-curcumina (BDMC).

Podem ser aplicados em produtos que tenham na embalagem proteção contra a luz, colorindo pickles e mostarda, diversas bebidas, produtos a base de batata, laticínios, bolos, cereais e molhos. Em combinação com urucum, são adicionados em queijos, margarinas, molhos para saladas e em alguma formulação pela propriedade antioxidante. Por ser um ótimo substituto da Tartrazina, sua importância comercial aumentou sendo agora o terceiro dentre os corantes naturais usados (Lauro, 1991).

No Brasil, a utilização da cúrcuma é regulamentada como corante natural sem limite máximo de uso, de acordo com o Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (Nazário, 1989).

2.1.1 Importância econômica

Em 1995, Sears estudou o mercado mundial de produtos naturais que envolvia cifras de 14,5 bilhões de dólares, com isso o aumento da demanda agravou o problema da qualidade das plantas utilizadas, onde estudos mostraram que 50% dos produtos no comércio possuíam alguma irregularidade devido à presença de matéria orgânica estranha, insetos, problemas de identidade, teor abaixo do especificado e adulterações, revelando a necessidade de maiores estudos desde a fase de produção até a obtenção do produto final, seja ele a planta ou o princípio ativo.

De acordo com a Merck (1999), os derivados desmetoxilados purificados da curcumina, DMC e BDMC, são cotados no mercado a US\$ 2.525,00/kg, 50g de curcumina com 97% de pureza custam R\$ 527,00 (Merck, 2001), e a matéria-prima segundo atacadistas, importadores e exportadores de São Paulo * encontra-se na faixa de R\$ 2,20 a R\$ 5,00/ kg de pó, obtendo de acordo com a literatura cerca de 8% de curcuminóides nos rizomas de cúrcuma. Esses fatores indicam o potencial da *Curcuma longa* L. e aconselham maiores estudos sobre a extração dos curcuminóides.

Os maiores importadores de cúrcuma da Índia são o Irã, Líbia, Estados Unidos e Japão (Govindarajan, 1980).

2.2 Toxicologia

A cúrcuma pode ser utilizada como corante natural não existindo limite máximo de uso, de acordo com o Decreto 55.871 de 1965 - Resolução nº 4 de 24/11/88 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que regulamenta o uso de aditivos intencionais em alimentos, assim como seu limite máximo. A utilização de cúrcuma em pó, com teor médio de 3% de curcumina, tem IDA (Ingestão Diária Aceitável) de 2,5 mg/kg de peso corpóreo (Nazário, 1989), a FAO/WHO de acordo com Perotti (1975) estabelece a IDA de 2,5 mg/kg de peso vivo para uma cúrcuma contendo 5% de curcumina, significando que um indivíduo com 60 kg pode ingerir sem efeitos colaterais, 6 mg/dia de curcumina. O seu código como corante natural é Color Index (C.I.) 75300 amarelo natural, Merck (1999).

De acordo com Walton (1999), os testes de toxicidade *in vivo* são internacionalmente reconhecidos e orientações são publicadas para essas condutas. Estes testes têm dois maiores objetivos:

1. Identificar os maiores efeitos tóxicos destas substâncias em questão, fazendo o reconhecimento e examinando o tecido alvo potencial;
2. dependendo da natureza da toxicidade, é definido o nível de ingestão que não resulta em nenhum efeito adverso (NOAEL-no observed-adverse-effect level).

Em geral, o NOAEL, obtido para várias doses com testes em espécies mais sensíveis (muitas vezes determinado para introduzir estudos crônicos e subcrônicos) é então

* DIEHL, C. M. Bolsista FAPEMIG - Comunicação pessoal.

usado para derivar o IDA para um produto químico específico. Nesta derivação encontra-se um fator de segurança considerando dois diferentes aspectos toxicológicos: toxicocinético (é a relação entre a dose externa do composto e a dose interna) e toxicodinâmico (relação entre a dose interna do composto e o efeito adverso). Foi utilizada a pesquisa literária direcionada primeiramente à identificação de estudos *in vivo* e *in vitro* como tema principal da determinação do IDA. O IDA para curcumina foi estabelecida temporariamente em 0-0,1 mg/kg peso corpóreo (JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1995), baseado no NOAEL de 220 mg/kg de peso corpóreo/dia para a ingestão por ratos em 2 anos de estudo. No LOAEL-lowest-observed-adverse-effect level (440 mg/kg de peso corpóreo/dia) foi observado aumento do fígado; acima da dose (2000 mg/kg de peso corpóreo/dia) foram detectadas no trato gastrointestinal úlceras e hiperplasia. A IDA para curcumina foi baseada no aumento do fígado (WHO, 1995 citado por Walton (1999)). Uma revisão foi feita pela JECFA em 1998, onde foi o valor da IDA de 0-0,1 mg/kg peso corpóreo foi estendida (Walton, 1999). Ou seja, pode-se ingerir curcuma em pó que contenha até 4% de curcumina, fornecendo 0,1 mg de curcumina/kg de peso corpóreo sem efeitos colaterais.

2.2.1 Antioxidante

Os antioxidantes podem ser classificados como produtos que atuam sobre a formação do $^1\text{O}_2$ ou que reagem com este, ou ainda, produtos que atuam de forma competitiva com os radicais livres dos lipídios, impedindo a continuação da reação em cadeia ou que atuam sobre os peróxidos decompondo-os, de forma a produzirem compostos que não mais participam da reação em cadeia de radicais livres. Os antioxidantes naturais ou sintéticos que reagem, ou que de alguma forma interferem na participação do $^1\text{O}_2$ ou, competem com os radicais livres dos ácidos graxos, são produtos que interferem na fase de iniciação da reação e, com isso, têm excelente efeito retardador da oxidação (Bobbio, 1992).

Os antioxidantes em dietas são conhecidos por diminuir o risco de muitas doenças crônicas semelhantes ao câncer e desordens cardiovasculares (Priyadarsini, 1997) e modificar um processo patofisiológico de várias desordens metabólicas utilizados com efeito preventivo em doenças que envolvem degradação oxidativa (Krishnaswamy, 1998). A

atividade antioxidante é resultado de uma eliminação específica dos radicais livres reativos ou da eliminação do oxigênio contendo compostos semelhantes ao peróxido de hidrogênio ou quelatos de metais. A curcumina e seus análogos são conhecidos por proteger as biomembranas contra os danos peroxidativos. A peroxidação dos lipídios é conhecida por ser a principal reação da cadeia do radical livre que provoca danos na membrana celular, e a ação de inibição da peroxidação é atribuída aos curcuminóides quando da sua utilização (Priyadarsini, 1997).

A curcumina tem mostrado efeito anticarcinogênico ou anti-mutagênico em diversos animais e também em culturas de células. Um dos mecanismos bioquímicos da atividade quimiopreventiva do câncer pela curcumina tem sido atribuída pela inibição do aparecimento do tumor, pela presença do grupo funcional carbonila (Chun *et al*, 1999).

Estudos em humanos com risco de câncer palatal pela ação do fumo e mostrou que a administração de 1g/dia de cúrcuma por nove meses teve impacto significativo na regressão de lesões pré-cancerosas, Krishnaswamy (1998).

A utilização destas espécies na medicina tradicional da Malásia contribui para a investigação e desenvolvimento de métodos de prevenção do câncer no estágio inicial de desenvolvimento do tumor (Vimala *et al*, 1999). Outras duas importantes formas de prevenção do câncer foram estudadas por Mukundan (1993), a ação antioxidante (inibição da peroxidação lipídica) e antimutante (impedimento das modificações no DNA das células) da oleoresina e curcumina.

A curcumina e seus derivados agem na atividade de segmentação do DNA (ácido desoxirribonucléico) atuando como pró-oxidante e antioxidante. A curcumina em presença de Cu^2 provoca segmentação na fita do DNA através da geração de espécies de oxigênios reativos, particularmente o radical hidroxila, deste modo, mostra ambos os efeitos de antioxidante e pró-oxidante. A comparação da atividade antioxidante foi observada no efeito dos curcuminóides sobre a divisão do DNA do plasmídeo pelo sistema Fe^{2+} -EDTA (radicais hidroxilas) e a geração do oxigênio singlete pela riboflavina. Os resultados indicam que a curcumina é consideravelmente mais ativa que o agente oxidativo na divisão do DNA. Foi observada, uma inibição da produção de $^1\text{O}_2$ de 84,4% pelos curcuminóides (concentração de 0,1mM), onde a curcumina produziu maior efeito com 43,8% seguido de DMC (36,4%) e BDMC (25,6%) (Ahsan, 1999).

Pezzuto (1992) observou a eficácia de agentes quimiopreventivos e efeito antimutagênico em culturas de células de glândulas mamárias de ratos *in vivo* com carcinogênese, constatando a efetividade na atividade antimutagênica da curcumina, na redução de lesões induzidas na cultura de células e na carcinogênese na mamária *in vivo*.

2.2.2 Outras Atividades Farmacológicas

A oleoresina apresenta atividade antimicrobiana, segundo Allievi (1984) em mínimas concentrações de inibição (MIC 1600) mostrou-se sensível para 13 bactérias, dois fungos (*Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum*), e 2 leveduras (*Candida utilis* e *Sacharomyces cerevisiae*). As bactérias anaeróbicas se mostraram mais sensíveis que as aeróbicas e as anaeróbicas facultativas.

Um estudo realizado por Olajide (1999) estabeleceu o efeito antitrombótico do extrato de *Curcuma longa* L. em ratos. Extratos de rizomas de Zingiberaceae (entre eles *Curcuma domestica*) exibiram ativação da atividade inibitória do EBV (Epstein-Barr-Virus) sem efeito citotóxico nas células de Raji (Vimala *et al*, 1999).

A utilização de um medicamento a base de plantas medicinais, contendo *Curcuma longa*, *Alium sativum* e *Nepeta hindoostana*, revelou um efeito vasorelaxante, sugerindo o potencial terapêutico destes constituintes em doenças cardiovasculares (Ashraf, 1999).

Como planta medicinal, a cúrcuma é utilizada como diurético, excitante, antidiarréico, corretivos de disfunção de biliar, antiespasmódico e antiescorbútico (Goto, 1993; Montaldo, 1972).

Muelas-Serrano (1999) identificou o efeito dos extratos (1000 µg/mL) de *C. longa* na inibição do crescimento de *Trypanosoma cruzi* em 78,47% após 72 h de incubação, constatando então sua atividade antiprotozoária.

A atividade antiofídica foi identificada no primeiro trabalho relacionado ao assunto, onde o extrato de cúrcuma inativou quase que completamente a neurotoxina da cobra *Naja naja siamensis* (Cherdchu e Karlsson (1983) citados por Mors *et al*, 2000). Há indicações de que a curcumina forme forte interações com macromoléculas biológicas, como as proteínas de soro, albumina e ácido hialurônico (Tonnesen 1992, citado por Mors *et al*, 2000). Ferreira *et al* (1992) identificaram outra importante atividade biológica da cetona insaturada do *Curcuma longa*, a Ar-turmerona, mostrando a neutralização do efeito letal do

veneno de cascavel *Crotalus durissus terrificus* em ratos e da atividade hemorrágica presente no veneno de *Bothrops jararaca*. Demonstrou também por estudos imunológicos que esta fração também inibiu a proliferação e a atividade letal natural dos linfócitos humanos. A potência do antiveneno Ar-turmerona é determinada pelo ensaio de neutralização do efeito letal (dose letal 2,00 µg), assim para uma dose de veneno de 12,5 µg a concentração de Ar-turmerona de 700 µg/mL conseguiu neutralizar 70 % do efeito letal do veneno injetado em ratos. Os testes de neutralização concluem que a Ar-turmerona pode agir como inibidor enzimático no caso das enzimas do veneno de jararaca com atividades hemorrágicas e proteolíticas. (Mandelbaum *et al.* 1982, citados por Ferreira 1992).

2.3 Aspectos Gerais da *Curcuma longa* L.

2.3.1 Botânica

O açafrão ou cúrcuma, pertencente à família Zingiberaceae, é originária do sul e sudeste da Ásia, provavelmente das florestas da Índia. A espécie *Curcuma longa* L. pode ser encontrada na China, nas Ilhas Caribenhas e Países da América do Sul (Govindarajan, 1980; FAO, 2001).

A *Curcuma longa* L. foi introduzida na América do Sul pelos espanhóis (Govindarajan, 1980). É uma espécie herbácea e perene (Figura 2-1), e em condições favoráveis de clima e solo pode atingir em média 120 a 150 cm de altura. As folhas são grandes e possuem um pecíolo tão comprido como o limbo sendo oblongo-lanceoladas, reunidos na base, oblíquo-nervadas, e quando amassadas exalam perfume. As flores são amareladas, longo pedunculadas, dispostas em espigas compridas e com brácteas côncavas verde-pálido, as superiores com uma mancha rósea. O fruto é uma cápsula bivalve trilobulada. O rizoma principal é periforme, arredondado ou ovóide, carnudo com ramificações secundárias laterais, compridas, também tuberizadas, porém mais finas e menos carnudas, cilíndricas ou fusiformes, por vezes curvas. Os rizomas secundários podem atingir até 15 cm de comprimento por 1 a 2,5 cm de diâmetro (Von Hertwig, 1991). A cúrcuma atinge 40-50 cm de altura após 160-170 dias do plantio, ou seja, cinco meses, considerando um ciclo para o cultivo de 230-260 dias (8-9 meses) segundo Goto, (1993) e Montaldo (1972).

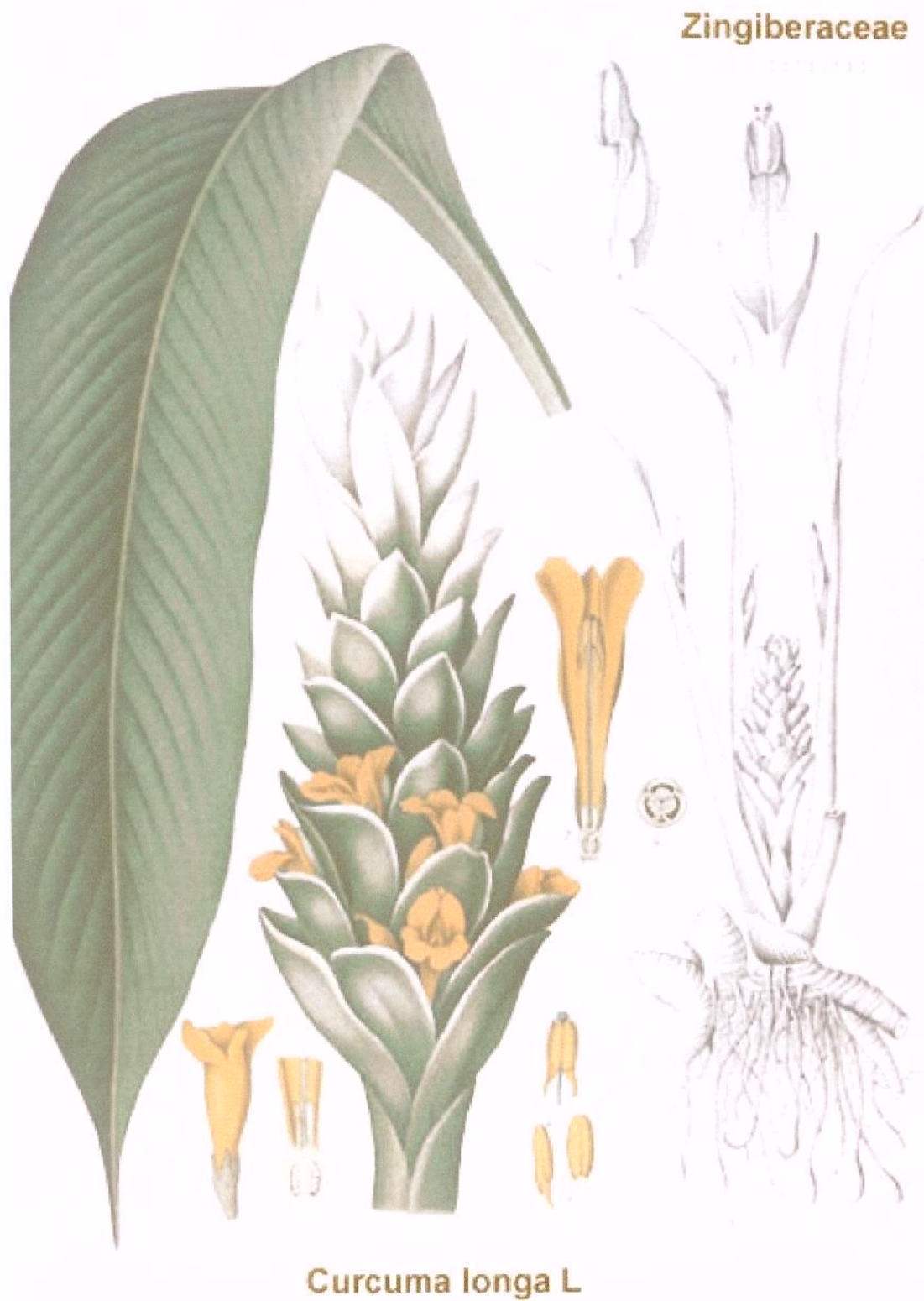


Figura 2-1. Ilustração Botânica da *Curcuma longa* L. (Köhler, 2001)

2.3.2 Cultivo

A época ideal de plantio, nas regiões tropicais com clima temperado, encontra-se nos meses de agosto a setembro, ou no outono em regiões cujo inverno não prejudique o crescimento e desenvolvimento da planta. Embora prefira o clima temperado, tolera algumas variações, pois é relativamente rústica, razão pela qual prospera em certas regiões de clima tropical úmido, mas de preferência sem verões causticantes (Abreu Matos, 1994).

Na região de Botucatu – São Paulo, os melhores rendimentos foram obtidos com um plantio no mês de novembro até meados de dezembro, obtendo 8-9 t/ha próxima à faixa relatada em referência bibliográfica desse cultivo, aproximadamente 11t/ha/ano (Goto, 1993).

A cultura do açafrão tem exploração comercial restrita no Brasil, porém a sua origem tropical, permite ótima adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras (relativo ao solo e clima da região), porém poucos estudos até agora estão desenvolvidos com a cultura a nível nacional (Goto, 1996).

2.3.3 Estudos Agronômicos

A variedade de *Curcuma longa* foi avaliada no período de crescimento de semanas a respeito do conteúdo de curcuminóides em bulbos e dedos. A redução da produção de pigmentos em função da maturidade foi estudada, obtendo diferença significativa entre a produção dos bulbos e dedos, considerando a biomassa, a presença de curcuminóides nos dedos são maiores (Tonnesen, 1992). O cozimento e/ou fatiamento reduzem o tempo de secagem de forma significativa, sem apreciável redução no teor de curcuminóides (Sampathu, 1988). A secagem dos rizomas pode ser feita de forma natural ou forçada, e posteriormente moídos. O corte em fatias de 2 a 5 mm pode também ser realizado. De acordo com Donalisio (1980), a secagem ao sol é feita em camadas para minimizar o efeito da radiação solar na estabilidade dos pigmentos. Esse processo se completa em 10 a 15 dias, e quando seco se torna rígido com cor amarela uniforme e umidade em torno de 5 a 10%.

Goyal (1993) estudou a variação da qualidade dos rizomas de cúrcuma (curados e não curados) durante 12 meses de armazenamento. A oleoresina dos cultivares estudados foi reduzida, aumentando essa variação proporcionalmente ao aumento do período de

armazenamento. O armazenamento por 12 meses resultou num decréscimo de oleoresina de 21,4 a 24% em todos os rizomas. Este decréscimo de oleoresina reflete no decréscimo de curcumina e óleo essencial, pois estes dois componentes constituem mais que 80% do total da oleoresina da cúrcuma.

O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias. O teor de umidade estabelecido nas diferentes farmacopéias varia entre 8-14 %, com poucas exceções especificadas nas monografias (Simões *et al*, 2001).

A redução de tamanho de partículas tem finalidades tecnológicas específicas, como facilitar o manuseio, transporte, embalagem e armazenagem, assim como a mistura e extração da matéria-prima. Geralmente, o corte ou a moagem grosseira assumem um caráter preliminar, deixando-se a redução mais fina para a etapa seguinte. Para fins de extração e mistura, são recomendados diferentes níveis de redução de tamanho de partícula, os quais dependem da natureza da droga vegetal, como mostrado na Tabela 2-2::

Tabela 2-1. Nível de redução de partícula recomendada segundo o tipo de droga vegetal.

Classificação	Diâmetro Médio da Partícula	Exemplos
Corte grosso	5-10 mm	Extração de folhas, flores e ervas
Corte semi-fino	0,5-5 mm	Extração de lenhos, cascas, raízes, rizomas e sementes
Corte fino	50-500 µm	Extração de alcalóides
Pó	1-50 µm	Mistura de pós e encapsulamento

Fonte: Simões *et al*, 2001- Farmacognosia: da planta ao medicamento.

A fácil adaptação da espécie nas condições edafoclimáticas brasileiras tem revelado potencial para o incremento de áreas cultivadas, e metodologias de extração dos curcuminóides estão sendo desenvolvidas para a otimização do processo de extração dos principais componentes do rizoma.

O estabelecimento de técnicas agronômicas para o cultivo racional das espécies medicinais, condimentares e aromáticas, contribuem para o processo de viabilização da produção comercial e industrial da região.

2.3.3.1 Adubação nitrogenada

A disponibilidade de nitrogênio influencia a concentração dos nutrientes nos tecidos (Miller *et al*, 1965), favorecendo o crescimento radicular com consequente aumento na absorção dos nutrientes disponíveis, Duncan e Ohlrogge (1958). O aumento no crescimento induzido pela fertilização nitrogenada tem sido relatada em plantas rizomatosas (Randhawa *et al*, 1974) e segundo Santos (1992), plantas de gengibre que se desenvolveram com baixa suplementação nitrogenada apresentavam grãos de amido somente no cilindro central, ao passo que as plantas submetidas as doses maiores (acima de 175 g/m³) apresentavam também grãos de amido nas camadas internas do córtex. Resultados semelhantes foram obtidos por Rao e Reddy (1976) para *Curcuma longa*.

O peso de matéria seca em rizomas de gengibre estudados por Santos (1992), mostrou que a produção destes aumentou linearmente com o incremento no fornecimento de nitrogênio, sendo necessário esclarecer as condições ambientais que conduzem a essa alta exigência de nitrogênio.

2.4 Composição química

O teor de óleo essencial dos rizomas processados pode variar de 3 a 8% de acordo com Montaldo (1972) e Mathai (1979), constituído predominantemente de cetonas sesquiterpênicas: ar-turmerona e turmerona (cerca de 59%); terpenos com baixo ponto de ebulição: d-sabineno (0,6%), d-alfa-felandreno (1%), cineol (1%) e borneol (0,5%) e sesquiterpenos com alto ponto de ebulição: zingibereno (25%) (Kelkhar, 1934). Ratnambal (1986) encontrou em várias espécies de cúrcuma secas no campo, porcentagens máximas de oleoresina de até 19,2%. A Tabela 2-2 mostra a composição da cúrcuma.

Tabela 2-2. Composição da cúrcuma (Govindarajan, 1980).

Composição	Porcentagem (%)
Umidade	9 – 19
Amido	30 – 50
Pentosanas	4,7
Proteína bruta	6 – 11
Fibra	2 – 6
Curcuminóides	2,5 - 8,1

Não há evidências da relação entre o teor de óleo essencial e curcumina. O teor de curcumina é influenciado pelo local de plantio, práticas agrícolas, fertilização do solo e maturação dos rizomas (Krishnamurthy *et al*, 1976). O teor de amido dos rizomas, possivelmente se relaciona com a maturação (Mathai, 1979).

Os compostos encontrados no rizoma da cúrcuma foram estudados com relação à localização, grau de maturação e crescimento, onde Mangalakumary (1986) concluiu que a curcumina e o óleo essencial estão distribuídos por todo o rizoma, o amido é encontrado na parte central e os polifenóis nos feixes vasculares e gemas dos rizomas.

Algumas técnicas podem ser empregadas para a caracterização química dos compostos presentes no extrato, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Espectrofotometria (UV). Alguns trabalhos realizam a análise no extrato de *Curcuma longa* L. tanto para identificação quanto para quantificação como He (2000) que realizou a identificação “on-line” dos constituintes fitoquímicos da *C. longa* fresca combinando técnicas do “HPLC-diode array detection-MS” com informações de CLAE-EM e CLAE - UV para os picos dos cromatogramas. Assim, por CLAE-UV foram identificadas substâncias como a bisdemethoxycurcumina, demethoxycurcumina, curcumina com maior eficiência e separação destes, e ar-turmerona e curlona, por “HPLC-Reconstructed Total Ion Current (TIC)” visivelmente observado pela área relativa dos cromatogramas, concluindo que uma simples corrida de CLAE identifica os CC e um grande número de constituintes do óleo volátil sendo um método eficiente para fornecer confiavelmente marcadores para a distinção das espécies de curcuma. Os três CC, a ar-turmerona e a curlona foram identificados por “HPLC-PB-MS”, mas os constituintes do óleo volátil e semi-volátil não puderam ser analisados pois eram perdidos na membrana separadora usada para remover solventes, portanto estes foram identificados por CG-EM.

2.4.1 Caracterização química da curcumina

Em 1953 foram identificados por Srinivasan dois derivados desmetoxilados da curcumina, a DMC e a BDMC, através de cromatografia em coluna (Tabela 2-3).

Tabela 2-3. Propriedades dos derivados da cúrcuma.

	Ponto de fusão °C	Massa molecular
CC	183	368
DMC	168	338
BDMC	224	308

De acordo com Merck (1999) a curcumina (E, E) [1,7 – Bis (4-hidroxi-3 metoxifenil) –1,6 heptadieno – 3,5 – diona] é insolúvel em água e éter, solúvel em álcool, ácido acético glacial, em meio alcalino tem coloração marrom avermelhada e em meio ácido amarelo claro.

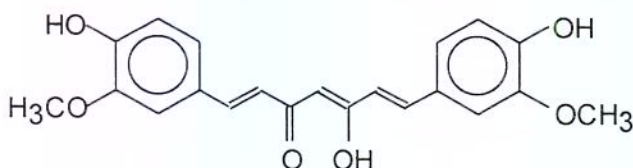
Price (1997) relatou a degradação alcalina dos pigmentos de cúrcuma, DMC e BDMC, purificados e comerciais. A degradação aumenta rapidamente em proporções constantes para um pH até 7,45 e decresce com pH 10,2. A meia-vida dos curcuminóides (CC, DMC e BDMC) em pH 7,5 é respectivamente 900, 1700 e 2200 h, analogamente em pH 10,2 a meia-vida destas substâncias é respectivamente 0,4; 1,0 e 5,0 h. O uso de CC e BDMC em alimentos alcalinos deve ser estudado a fim de manter a estabilidade da cor do produto. Martins (1993) realizou um estudo com a curcumina cristalizada e oleoresina de cúrcuma em atmosfera, temperatura e pH controlados, em relação à estabilidade, e revelou serem estáveis até a temperatura de 100°C, na faixa de pH de 4,0 – 7,0 , sendo a curcumina purificada mais estável à luz que a oleoresina nos casos estudados.

No espectro de absorção existe uma variação para os três componentes, sendo 429 nm para CC, 424 nm para DCC e 419 nm para BDMC com solvente etanol (96%), usando praticamente a região de 425 nm para expressar o teor de corante total como curcumina (Krishnamurthy *et al*, 1976).

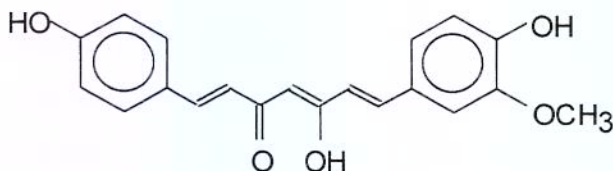
2.4.1.1. Estruturas químicas

De acordo com Takahashi (1984) e Govindarajan (1980) as estruturas químicas dos curcuminóides são apresentadas na Figura 2-2.

- Curcumina: 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dien-3,5-diona



- Desmetoxicurcumina: 1-(4-hidroxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona



- Bisdesmetoxicurcumina: 1,7-bis(4-hidroxifenil)-hepta-1,6 dien- 3,5-diona

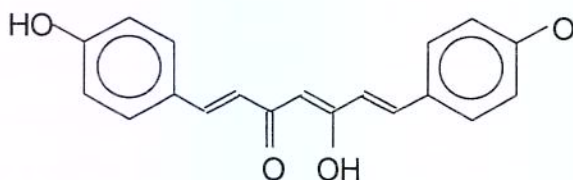


Figura 2-2. Curcuminóides

2.5 Qualidade da matéria-prima

A qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade do fitoterápico. Contudo a qualidade das matéria-primas vegetais não garante por si a eficácia, a segurança e a qualidade do produto final. A eficácia é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela inexistência de contaminantes nocivos à saúde, como por exemplo, metais pesados, agrotóxicos, microorganismos e seus produtos metabólicos, produtos de degradação, entre outros. A segurança e eficácia dependem de

diversos fatores, como a metodologia de obtenção, a formulação e a forma farmacêutica, entre outros e, portanto, devem ser definidas para cada produto, estabelecendo-se parâmetros de controle de qualidade do produto final (Simões *et al*, 2001).

2.6 Extração de pigmentos

Os corantes naturais apresentam uma instabilidade inerente quando submetidos a processos térmicos controlados inadequadamente, estabelecendo a extração com CO₂ supercrítico como uma alternativa importante (Kiran & Brennecke, 1993).

A extração dupla com solventes para extrair pigmentos de cúrcuma é considerada por Verghese (1984) como o melhor método. Um solvente é utilizado para retirar o óleo sem causar danos aos pigmentos, e numa segunda extração o outro solvente extrai o pigmento da cúrcuma desengordurada.

2.7 O processo de Extração Supercrítica

O processo de extração supercrítica de matrizes sólidas consiste de duas etapas: (i) a extração e (ii) a separação do extrato do solvente. Na extração o solvente supercrítico escoar através de um leito fixo de partículas sólidas e solubiliza os compostos existentes na matriz sólida. O solvente é alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. A mistura extrato/solvente é removida do extrator até o precipitador, onde finalmente são separados (Brunner, 1994).

Chassagnez (1998) verificou o aumento dos teores de curcumina na oleoresina após a adição do co-solvente etanol na extração com CO₂, verificando que a maiores pressões os valores de curcumina solubilizada pelo CO₂ são maiores, mostrando uma influência da densidade na capacidade de solubilização do solvente. O mesmo autor relata que a concentração relativa dos curcuminóides presentes na cúrcuma determinados durante a extração com CO₂ e co-solvente etanol variam, sendo a concentração de BDMC superior aos trabalhos descritos na literatura (Taylor & McDowell, 1992; Sanagi *et al*, 1993; Janben & Cole 1984, citados por Chassagnez, 1998), que utilizaram condições semelhantes de extração e análise.

Portillo Prieto (1999) estudou a utilização de co-solvente etanol na extração supercrítica com dióxido de carbono do óleo essencial de khoa (*Satureja boliviana*) concluindo que os fatores mais importantes na extração foram a presença do co-solvente etanol e a vazão do dióxido de carbono. Com interação significativa entre co-solvente e a vazão do CO₂ obteve compostos de maior peso molecular que não foram detectados nos extratos da destilação por arraste a vapor e por extração com solventes orgânicos, somente com o dióxido de carbono. O etanol apresentou boas propriedades para utilização como co-solvente na extração com CO₂.

O estudo da extração supercrítica com CO₂ de óleo essencial e oleoresina de gengibre (Monteiro, 1999) revelou que o efeito da pressão e temperatura foram significantes na taxa de transferência de massa no período constante de extração, sem influência da vazão, sendo o efeito da pressão mais significativo. Neste estudo o rendimento do extrato foi diretamente proporcional ao aumento da pressão e temperatura, com maiores rendimentos a pressão de 250 bar e a 70 bar menores rendimentos.

Monteiro (1999) obteve condições para a medida da solubilidade da oleoresina de gengibre, verificando que a solubilidade aumenta com o aumento da pressão e temperatura, obtendo os valores mais altos na pressão de 250 bar e 313,15 K, na temperatura de 313,15 K, nas pressões de 150, 200 e 250 (bar) obteve o rendimento total (massa) de 1,66; 2,43 e 2,56 respectivamente. Este comportamento ocorreu provavelmente devido ao aumento da densidade do solvente, que aumenta com o aumento da pressão e também, pela pressão de vapor dos componentes do soluto, que possivelmente aumenta com a temperatura (Monteiro, 1999).

A extração supercrítica com dióxido de carbono para a obtenção do rendimento total de óleo de *Curcuma longa* através de Superfície de Resposta foi estudada por Began *et al* (2000) a fim de obter os melhores parâmetros do processo na obtenção do maior rendimento do óleo. Foram usadas as variáveis Pressão (MPa), Temperatura (K) e Vazão (mL/min) em três níveis: P (10, 20, 30 MPa); T (313, 323, 333 K) e Q (0,5; 1,0 e 1,5 m³/s). Através da análise de superfície de resposta as melhores condições para obtenção do maior rendimento são temperatura de 308 K, vazão de $1,3 \times 10^{-7}$ m³/s e pressão 22,5 MPa, concluindo que o aumento da temperatura reduz o rendimento do extrato quando mantido o fluxo constante, e aumenta com a variação da vazão à temperatura e pressão constante. A composição não foi afetada em nenhuma das condições experimentadas.

2.7.1 Fluido Supercrítico

O estado supercrítico de uma substância é caracterizado se a temperatura e pressão em que se encontra são maiores que os seus valores críticos. Para cada substância existe uma pressão crítica (P_c) e uma temperatura crítica (T_c) onde coexistem líquido e vapor, este ponto de coexistência é denominado ponto crítico (PC) com um volume crítico correspondente (V_c). Acima deste ponto crítico existe a região supercrítica. As variações das propriedades de estado acima do ponto crítico podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e reagentes (Sandler, 1989).

A Figura 2-3 mostra o Diagrama de Fases de uma substância pura em função de pressão e densidade reduzida. Em temperaturas inferiores à temperatura crítica ($T_R < 1$) coexistem duas fases, na região de baixa densidade tem-se a fase de vapor, e na de maior densidade tem-se líquido e, portanto maior poder de solvatação. Muito abaixo da temperatura crítica ($T_R \ll 1$), existe a fase gasosa onde a variação da densidade é linear com a pressão, como sugerido pela equação dos gases ideais. Aproximando-se do ponto crítico observa-se o aumento na taxa de variação da densidade com a pressão, ocorrendo um desvio do comportamento do gás ideal, obtendo-se assim compressibilidade infinita de uma substância pura no seu ponto crítico. Portanto é possível formar uma única fase fluida com densidade de um líquido e compressibilidade de um gás. Um fluido com densidade semelhante à de um líquido e maior poder de solvatação, possibilita alterar a densidade com pequenas variações de pressão, isso ocorre pela densidade dos solventes líquidos serem alteradas pela mistura com outros solventes, ou por um aumento da temperatura. Esta variação da densidade em função da pressão e/ou temperatura permite controlar condições para uma extração em processo supercrítico, visto que a solubilidade é função direta da variação de densidade (Fillipi, 1982).

A variação no poder de solvatação de um solvente aumenta não somente a solubilidade de um certo produto como o número de compostos solubilizáveis. Os aromas e óleos essenciais são extraídos utilizando-se o solvente em condições próximas ao seu ponto crítico, enquanto que oleoresinas de especiarias e óleos vegetais são extraídas em condições de altas pressões, acima do ponto crítico (Brogle, 1982).

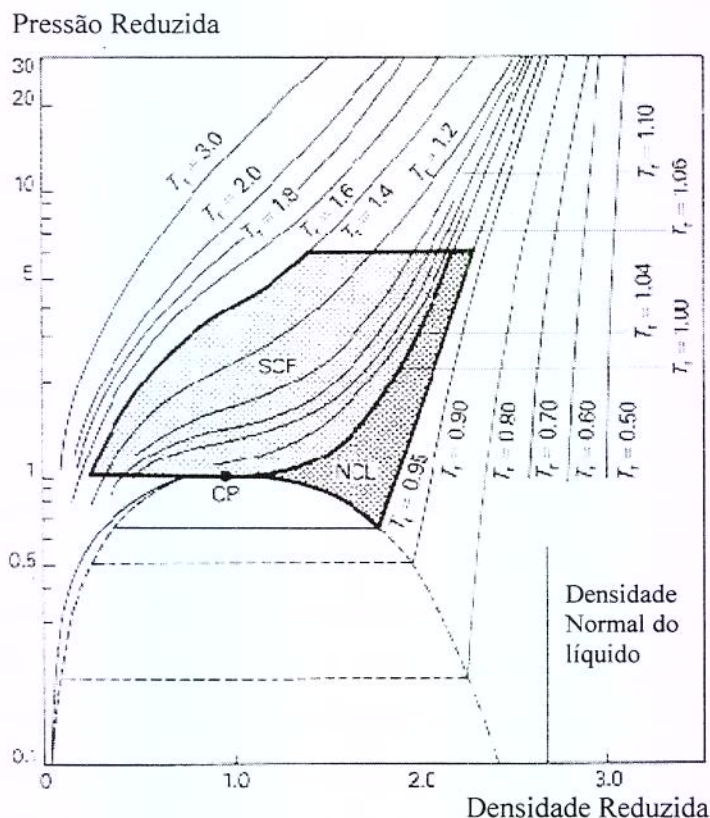


Figura 2-3. Diagrama da densidade versus pressão reduzidas para uma substância pura (Filippi, 1982).

2.7.2 Dióxido de Carbono como solvente

Através de uma gama de solventes que podem ser utilizados como fluidos supercríticos nas extrações supercríticas, alguns se encontram em condições razoáveis de aceitação, mas não são adotados no processo porque em muitos casos requerem manuseio especial não sendo compatíveis com o trabalho realizado no processo (Smith, 1999). O resultado é que o dióxido de carbono tornou-se popular pelo seu baixo custo, confiabilidade e segurança, não deixando traços no produto nem tão pouco nas colunas e capilares dos equipamentos (Smith, 1999).

Dentre os fluidos usados em ESC, o CO_2 é o mais usado por ser de fácil manipulação, possuir temperatura e pressão crítica de 31,2 °C e 73,8 bar respectivamente, ser um bom solvente e ser miscível com outros solventes, baixa toxicidade, inerte, não inflamável, não corrosivo, moderado custo. O dióxido de carbono é um fluido de baixa

polaridade, então pode ser difícil a extração de compostos mais polares. Adicionando um solvente orgânico, conhecido como um modificador, no fluido supercrítico este pode agir significativamente. Por exemplo, para extratos com compostos mais polares, pode ser interessante adicionar o álcool ao dióxido (Staub, 1997).

No estado supercrítico a densidade determina o poder de solvatação do CO₂ podendo aumentar de acordo com a variação da densidade em relação a uma temperatura e vice-versa (Brogle, 1982).

2.7.3 Modificadores ou co-solventes

O dióxido de carbono possui pouca habilidade para dissolver moléculas polares mesmo em condições de altas densidades, porém esta característica pode ser modificada pela adição de pequenas quantidades de substâncias polares, tais como água e etanol. Estas características ainda podem ser alteradas pelas condições operacionais como temperatura e pressão (Pellerin, 1991).

Os modificadores orgânicos, assim como o metanol ou acetonitrila, são frequentemente adicionados como eluentes em cromatografia com o dióxido de carbono por ter efetivamente polaridade similar ao hexano. A baixa viscosidade do dióxido de carbono significa que ao ser misturado com solventes orgânicos formam eluentes com propriedades entre as de um líquido e um fluido supercrítico. Este aumento da fluidez do solvente traz muitas propriedades de solvatação do solvente orgânico, mas são muito menos viscosos e tem baixa razão de difusão, fazendo então uma melhor extração com solventes em cromatografia. Estes métodos têm sido usados para estudos e comparados à ESC. A dificuldade encontrada nestes estudos tem sido, quando elevar o nível de co-solvente ao ponto onde se torne solvente primário, ou seja, o solvente em maior porcentagem utilizado. Isto tem conduzido os estudos à aumentar a fluidez dos solventes em moderados níveis de dióxido de carbono melhorando as propriedades dos solventes orgânicos (Smith, 1999).

A temperatura e pressão críticas são afetadas pela incorporação de um modificador ao dióxido de carbono supercrítico. A temperatura crítica deste solvente modificado situa-se entre os valores desta para as substâncias puras. O valor de pressão crítica usualmente demonstra um valor máximo para composições intermediárias entre aquelas encontradas

para o dióxido de carbono e o modificador puro. Esses modificadores alteram as propriedades de solvatação dos fluidos supercríticos (Taylor, 1996).

A Figura 2-4 a seguir mostra características de vários solventes, indicando o índice de polaridade, justificando assim a opção de alguns para a realização deste projeto.

Tabela 2-4. Propriedades dos solventes de extração.

Solvente	Índice de polaridade	Temperatura de ebulição °C
Hexano	0,0	66,0 – 71
Éter de petróleo	2,0	30,0 – 60,0
Acetato de etila	4,3	77,1
Isopropanol	4,3	82,3
Etanol	5,2	78,4
Acetona	5,4	56,1
Água	9,0	100,0

Fonte: Millipore Indústria e Comércio – Divisão Waters

Chang (2000) extraiu óleo essencial de chá verde comercial por extração com dióxido de carbono adicionando como co-solventes água e etanol, concluindo que o etanol a 95% obteve rendimento (g/100mL) quatro vezes maior que a adição de água como co-solvente.

Wang (2001) realizou extração supercrítica com dióxido de carbono adicionado de 6% molar de etanol obtendo maior rendimento em relação à extração com dióxido de carbono puro.

Badalyan (1998) estudou extração de oleoresina de gengibre Australiano com dióxido de carbono e etanol como co-solvente. Nas condições subcríticas a presença de 2% de etanol aumentou o rendimento em aproximadamente 10%. Em condições supercríticas a o efeito foi reverso, à 308,15 K obteve-se um menor rendimento em relação à temperatura de 298,15 K, não somente na oleoresina mas no rendimento geral. Isto pode ser explicado parcialmente pela baixa solubilidade do soluto no dióxido de carbono menos denso (35 °C) e secundariamente pela baixa solubilidade do etanol no dióxido de carbono supercrítico.

2.8 Cinética de Transferência de Massa

O processo de extração de substratos de produtos naturais em partículas sólidas pode ser dividido em duas etapas:

- Transporte de substâncias de dentro do material sólido até a interface sólido/fluido;
- Solubilização das substâncias pelo solvente e o transporte da mistura soluto/fluido.

Graficamente, o comportamento de uma extração geralmente é descrito por uma curva global de extração obtida pela massa de extrato e o tempo de extração, mantida constante a vazão do solvente. De acordo com a Figura 2-4 pode-se observar uma curva típica de extração. As curvas de esgotamento são obtidas da massa de óleo extraída versus a massa de solvente consumido ou do tempo de extração. As curvas típicas apresentam três fases distintas. A primeira onde retira-se o óleo exposto na superfície da partícula, denominado período de taxa constante de extração (CER). Na segunda etapa a camada superficial de óleo na partícula começa apresentar falhas e por isso menor quantidade de óleo é solubilizada. Esta etapa é denominada etapa decrescente de extração. Na terceira etapa o óleo é retirado de dentro da partícula, num processo difusional (Brunner, 1994; Meireles e Nikolov, 1994). A solubilidade é o coeficiente angular de uma reta ajustada aos pontos experimentais da curva de esgotamento no período de taxa constante de extração, para uma vazão de solvente tal que se atribua à saturação do solvente pelo soluto (Ferreira *et al*, 1999).

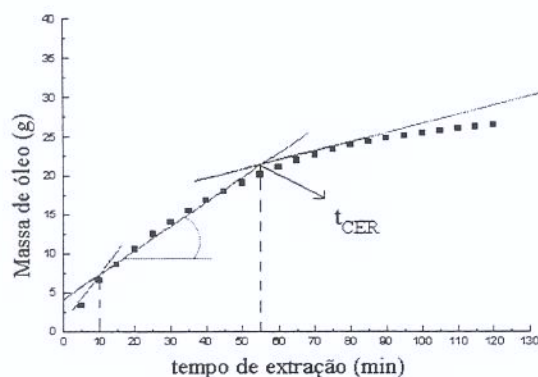


Figura 2-4. Ajuste das retas para cálculo dos parâmetros T_{cer} e M_{cer} (Rodrigues *et al*, 2000).

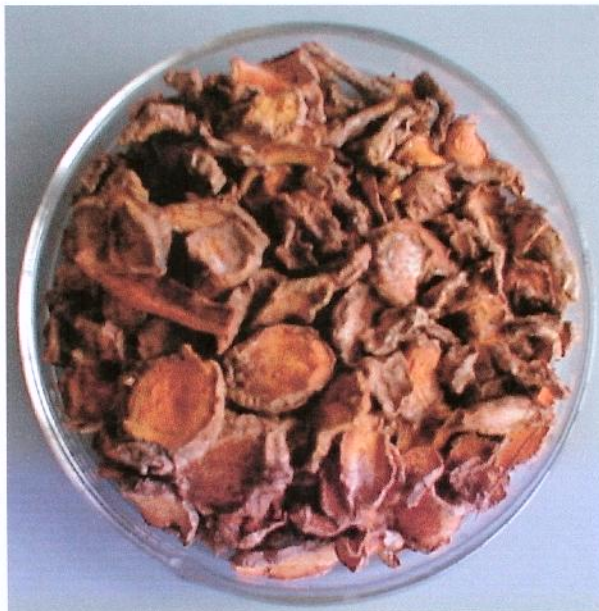
A extração da oleoresina com CO₂ supercrítico constitui-se em uma alternativa importante do processamento de cúrcuma, devido a inerente instabilidade apresentada pelos corantes naturais, quando submetidos a processos térmicos. A extração com gases supercríticos envolve altas taxas de transferência de massa, em temperaturas relativamente baixas, fundamental para a extração de produtos naturais (óleos essenciais, oleoresinas, princípios ativos, etc.) onde a qualidade do produto final é de grande importância (Kiran & Brennecke, 1993).

2.9 O resíduo

O amido pode sofrer algumas modificações para atender as aplicações nas indústrias, principalmente a de alimentos. As modificações trazem mudanças químicas, físicas e tecnológicas (Cruz, 1982).

O resíduo amiláceo do processo de extração dos curcuminóides da cúrcuma retém teores de curcumina (Chassagnez, 1998), podendo ser caracterizado como um amido com características especiais de alto potencial comercial.

Capítulo 3. Materiais e Métodos



Rizomas de *C. longa* L. fatiados e secos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção e pré-processamento da matéria-prima

Os rizomas de *Curcuma longa* L. foram selecionados à partir do cultivo na Unidade Experimental da EPAMIG no município de Maria da Fé – Minas Gerais e na Fazenda Experimental do Lageado em Botucatu – UNESP em São Paulo. Foram obtidos três lotes de cúrcuma em Maria da Fé. Os dois primeiros lotes no mês de maio de 2000, diferenciando-se entre si em relação ao cultivo com adubação nitrogenada de 0,55% e 1,50%, com fontes diferenciadas de nitrogênio (esterco bovino e esterco de galinha, respectivamente) com aproximadamente 3 kg em cada lote onde a matéria-prima já foi obtida fatiada e seca. O terceiro lote foi cultivado em consórcio com a cultura do pessegueiro, sem adubação específica, sendo a cultura mantida apenas com o excedente da adubação entre linhas da cultura consorciada, sendo acompanhadas regularmente o cultivo, a colheita, a limpeza, corte e secagem.

Os lotes obtidos foram colhidos manualmente e os tubérculos limpos com água e separados do rizoma central para corte e secagem. Foram realizados cortes transversais nos tubérculos por facas de lâmina caseiras do terceiro lote (34 kg “in natura”), após o corte foram secos em estufa pertencente à Universidade Federal de Lavras localizado na EPAMIG- Maria-da-Fé em Minas Gerais (Anexo I) à 30 °C por 24h ininterruptas, até serem admitidos como secos por análise visual. Após a secagem a matéria-prima foi acondicionada em sacos plásticos e mantida em freezer doméstico (Brastemp Frostfree à $T < 0^{\circ}\text{C}$) na ausência de luz para evitar degradação dos curcuminóides e não alterar o teor de umidade obtido.

O quarto lote foi obtido em Botucatu-SP sem acompanhamento do cultivo, mas este também não obteve tratamento diferenciado, totalizando 12 kg de matéria-prima “in natura”.

Foram eliminadas a parte aérea e o bulbo das plantas, selecionando assim os rizomas em relação ao grau de maturação para obter homogeneidade, sendo selecionados os que não possuíam brotações (por possuírem estágio de maturação distinto). Estes foram triturados em processador de alimentos doméstico (Philips do Brasil Ltda, divisão Wallita,

modelo Máster, São Paulo-Brasil) e submetidos à secagem em um secador contínuo de fluxo paralelo (Anexo I) pertencente à Faculdade de Engenharia Agrícola da Unicamp (Brod, 2000) à temperatura aproximada de 35 °C até aproximadamente 13% de umidade. A secagem deste lote foi realizada em quantidades de 2 kg para não exceder a capacidade do secador, cada porção de 2 kg requereu um período de secagem de 8 horas, totalizando 48 horas de secagem para todo o lote.

A matéria-prima seca foi moída em moinho de facas Stein Laboratory Mill, modelo L2, 115 volts, 60 ciclos, 800 watts, com porções de aproximadamente 30 g à 10 segundos no Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas-IAC. Após a moagem esta foi acondicionada em filmes de polietileno (espessura 0,1 mm) e armazenadas no LASEFI-DEA/FEA/Unicamp em freezer doméstico (Brastemp Frostfree à $T < 0^{\circ}\text{C}$) em ausência de luz, para minimizar as perdas dos curcuminóides. O lote foi em sua totalidade moído e acondicionado, visto que a substância de importância para estudo de tese é a fração pesada e não possuiu perdas significativas no manuseio da matéria-prima, e nas análises finais percebeu-se que a fração volátil presente na espécie se manteve em porcentagens semelhantes da literatura pelo armazenamento da mesma em freezer.

Assim, neste trabalho efetuaram-se extrações com quatro lotes de matéria-primas distintas, utilizando os dois primeiros lotes (M1 e M2) somente para teste da metodologia de extração com solvente orgânico (soxhlet) e quantificação dos curcuminóides (Tabela 3-1).

Tabela 3-1. Lotes de matéria-prima (*Curcuma longa* L.) obtidos para o desenvolvimento do projeto.

Código	Origem	Cultivo- Adubação	Época de colheita	Corte	Secagem	Tempo (h) de secagem
M1	MG	0,5% de N ₂	05/2000	Fatiado	30 °C – estufa	desconhecido
M2	MG	1,5% de N ₂	05/2000	Fatiado	30 °C – estufa	desconhecido
M3	MG	convencional	11/11/2000	Fatiado	30 °C – estufa	24
S1	SP	convencional	15/07/2000	Triturado	35°C–secador com circulação forçada	48

Nos lotes M3 e S1 (Tabela 3-1) analisou-se a quantidade de curcuminóides para que fosse escolhido o melhor lote para a realização dos ensaios, e o material “inferior” (menor teor de curcuminóides) fosse utilizado para os testes prévios, necessários para a adequação do uso do material ao equipamento e a metodologia utilizada, assim a matéria-prima foi selecionada em função da origem, de acordo com o maior teor de curcuminóides.

3.2 Caracterização da matéria-prima

3.2.1 Determinação da distribuição do tamanho das partículas (DTP).

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada utilizando uma série de peneiras Série Tyler (W.S. Tyler, USA), com mesh 24, 32 e 48 e colocadas num agitador magnético (Produtest – mod. 3580) para separação das partículas. As massas retidas sobre as peneiras foram pesadas numa balança semi-analítica (Marte, série AS2000, $\pm 0,01g$, ARTLAB, Brasil) e utilizadas para empacotar o leite na proporção de 1:1:1.

3.3.2 Determinação do diâmetro médio das partículas

Para a determinação do diâmetro médio das partículas utilizou-se a metodologia para cálculo do diâmetro médio geométrico (d_{mg}) de acordo com o método (ASAE S319.2) recomendado pela ASAE Standard [ASAE, 1993] é:

$$d_{mg} = \exp \left[\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right]; \quad \text{Eq. 3-1}$$

Onde: $\bar{d}_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$;

d_i : abertura nominal da i-ésima peneira (mm);

d_{i+1} : abertura nominal da peneira maior que a i-ésima peneira (mm);

w_i : massa do material retida na i-ésima peneira.

3.3.3 Densidade Real e Aparente

A densidade real das partículas (d_r) foi determinada usando picnometria com gás Hélio com o auxílio de um densímetro (Micrometrics, modelo Multivolume pycnometer 1305, Estados Unidos) e uma balança analítica (Quimis, modelo QI-AS, precisão de $\pm 0,0001$ g, Estados Unidos) e de um pesa filtro. na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp. A densidade aparente (d_a) foi calculada através da massa de matéria-prima utilizada nas extrações sobre o volume da célula extratora em g/cm^3 . A porosidade total do leito (ϵ) e das partículas foi calculada usando a densidade real das partículas e a densidade aparente do leito.

3.3.4 Composição Centesimal

- Umidade

A umidade da matéria-prima será determinada pelo método de Jacobs (1973), este método é usado quando se deseja distinguir entre a água e o material volátil presentes na matéria-prima. O método consiste em colocar num balão de 250 mL, 15 g do material “in natura” e 30 g do material seco para determinação da umidade antes e depois da secagem. O material é coberto com 75 mL de xilol (P.A. –ACS-Ecibra 99-95%, lote 12.540, São Paulo-Brasil) deixando-se o material em refluxo, passando por um condensador e um tubo graduado que recebe a água da amostra, o material permanece em refluxo por 3 horas para o material “in natura” e 1 hora para o material seco. A umidade das amostras foi calculada pela equação 3-2:

$$U = \left(\frac{V_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}}{m_{amostra}} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq. 3-2}$$

Onde:

U=umidade

V_{H_2O} =volume de água extraída da amostra;

ρ_{H_2O} = densidade da água;

$m_{amostra}$ = massa da amostra.

- Cinzas (minerais)

Teor de cinzas foi determinado segundo metodologia da A.O.A.C., número 941.12 (1975). A metodologia consiste em calcinar os cadinhos à 550 °C, pesar 3 g da matéria-prima, levar à mufla mantendo a porta semi-aberta até atingir temperatura de 400 °C, fechar a porta e elevar a temperatura à 550 °C, manter por duas horas. Deixar a temperatura cair por 2 horas e esfriar os cadinhos em dessecador. O valor é dado em porcentagem de cinzas.

- Fibras

O teor de fibras foi determinado segundo método da American Association of Cereal Chemists (1975).

O método consiste em pesar 3 g de amostra, transferir para um béquer de 500 mL, adicionando 200 mL de solução de H₂SO₄ (1,25%), deixando em ebulição por 30 minutos completando o volume sempre a 200 mL. Filtrar em papel de filtro qualitativo (Whatman n° 42 ou 44) e lavar o material com mais 500 mL de água quente. Transferir o material retido no filtro para o mesmo béquer com o auxílio de uma solução de NaOH (1,25%) e deixar em ebulição por mais 30 minutos, completando o volume após a evaporação da solução. Filtrar novamente o material em papel de filtro qualitativo comum, previamente seco à 100 °C com tara conhecida. Lavar o material retido no filtro com 500 mL de água quente. Colocar o papel filtro e o material retido neste em estufa à 100 °C até secagem, após a secagem levar à mufla em cadinho à 550 °C para determinação das cinzas da fibra bruta. O cálculo foi efetuado pelas equações 3-1 e 3-2.

$$Fibra\ bruta(\%) = \frac{B - C}{A} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3-1}$$

$$Fibra\ real(\%) = \% fibra\ bruta - cinzas \quad \text{Eq. 3-2}$$

Onde: A=amostra (g);
B=peso do papel c/ resíduo seco (g);
C= peso do papel (g)

- Lipídios

O teor de matéria graxa foi determinado segundo A.O.A.C. número 950.54 (1975). São utilizadas 3 g da amostra em cartucho de papel filtro comum, acoplando o cartucho em conjunto de Soxhlet com balões de tara conhecida. Adicionar sobre os cartuchos 200 mL de éter de petróleo aquecer com placas de aquecimento e deixar em refluxo por 12 horas. Retirar os balões e evaporar em rotaevaporador até peso constante. O valor de matéria graxa é dado em porcentagem.

- Proteína Bruta

O teor de nitrogênio foi determinado segundo metodologia da A.O.A.C. número 920.165 (1975). O método consiste em colocar em balão de Kjeldahl 0,2 g de amostra, acrescentar 2 g de mistura catalisadora mais 5 mL de ácido sulfúrico. Colocar os tubos no bloco digestor aquecendo até 450 °C (aumentando 50 °C a cada 15 minutos) permanecendo por mais 30 minutos nesta temperatura. Deixar esfriar e adicionar 10 mL de água destilada por tubo. Colocar o tubo no destilador e neutralizar com NaOH (50%). Recolher o destilado em erlenmeyer com H₃BO₃ (2%) com indicador misto. Titular o destilado usando HCL (0,02 N) até que o indicador vire de verde para lilás. Para o cálculo foram usadas as equações 3-5 e 3-6.

$$\text{Nitrogênio (\%)} = \frac{V_{HCl}(mL) \times N_{HCl}(N) \times 0,014 \times 100}{\text{amostra}(g)} \quad \text{Eq. 3-5}$$

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \text{nitrogênio}(g) \times 6,25 \quad \text{Eq. 3-6}$$

- Teor de Amido

O teor de amido foi determinado segundo metodologia da A.O.A.C. número 920.168 (1975) otimizado pelo Centro de Raízes Tropicais – UNESP/ Botucatu.

A metodologia consiste em separar 200 mg de amostra finamente peneirada e acrescentar 42 mL de água e 2 mL de solução comercial de alfa-amilase, levar ao banho-maria na temperatura de 80 a 90 °C, durante 15 minutos agitando ocasionalmente. Após esfriados as soluções realizou-se o teste com lugol para verificação do amido dextrinizado.

Com o resultado positivo da dextrinização acrescentou-se à solução 2,5 mL de tampão acetato 4 M, pH 4,8 e 5 mL de solução filtrada de amiloglucosidade de *Rhizopus* sp., na concentração de 10 mg/mL. Os erlenmeyers com a amostra e a prova em branco foram levadas ao banho-maria com agitação contínua a 55 °C por 120 minutos, posteriormente esfriada em temperatura ambiente e neutralizadas com NaOH (2N) e filtradas em balão volumétrico de 250 mL. A partir da solução filtrada, o açúcar redutor foi dosado usando o método de Somogy e Nelson, calculado pelas equações 3-7 e 3-8:

$$\text{Amido base úmida (\%)} = \frac{\% \text{Somogy Nelson} \times 0,9 \times 250}{P}$$

$$\text{Amido base seca (\%)} = \frac{\% \text{ de amido base úmida} \times 100}{100 - \% \text{ umidade}}$$

Onde:

% Somogy Nelson= porcentagem de açúcares redutores calculada no item a seguir,

P = peso inicial da amostra;

% umidade = umidade inicial da amostra.

- Açúcares

O teor de açúcares foi determinado segundo metodologia da A.O.A.C. número 960.06 (1975). Para o cálculo de teor de açúcares na matéria-prima e resíduo do processo foi utilizada uma curva de calibração apresentado no Anexo II. O método de Somogy-Nelson permite determinar quantidades pequenas de açúcares. O material é diluído em balão volumétrico de 50 mL para leitura de absorbância em espectrofotômetro. Pipeta-se 1mL do material neutralizado e filtrado num tubo de ensaio acrescentando 1 mL do Reativo de Somogy. Leva-se ao banho-maria com água em ebulição por 10 minutos, agitar e fazer leitura no espectrofotômetro à 535 nm. Para o cálculo foi utilizada a equação 3-7.

$$\text{Açúcares (\%)} = \frac{A.K}{D} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3-7}$$

onde:

A= absorbância da amostra

K= constante da curva padrão de glicose

D= diluição do material inicial

3.3 Métodos de Extração

A fim de que os resultados obtidos pela metodologia de Extração Supercrítica fossem comparados quanto à composição química dos extratos, foram utilizados os seguintes processos: hidrodestilação e extração à quente por Soxhlet com etanol.

3.3.1 Extração com solvente orgânico (soxhlet)

A oleoresina foi extraída segundo Takahashi (1987). Foram utilizados cerca de 0,1 g de matéria-prima e 30 mL de etanol (96% de pureza, P.A., Merck, lote K28659183 104) colocados em soxhlet aquecido por uma manta até a temperatura de ebulição do solvente e refluxado durante 2 h e 30 min. Após o resfriamento a solução foi filtrada quantitativamente e evaporado o extrato num Sistema de Rotaevaporação, modelo LABOROTA 4001 com controlador de vácuo RATAVAC da marca Heidolph Instruments GMBH – Alemanha. As extrações em soxhlet foram feitas em duplicata e realizadas no Laboratório de Produtos Naturais, no Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas.

3.3.3 Hidrodestilação

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação seguindo o método da A.O.A.C. número 962.17 (1984) no Laboratório de Produtos Naturais, no Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas. Foram utilizadas massas aproximadamente de 50 g de matéria-prima inseridas em balão de 1000 mL e completado com água até cobrir a matéria-prima. Este balão foi aquecido com manta de aquecimento atingindo temperatura de ebulição com o refluxo da água num período de 3 e ½ h, o que permitiu a obtenção de um volume constante de óleo extraído. Estas análises foram realizadas em duplicata.

3.3.4 Extração Supercrítica

Para a Extração Supercrítica com dióxido de carbono utilizou-se como co-solventes o etanol (99,8% de pureza, P.A., Merck, lote K28659183 104), isopropanol (99,7% de pureza, P.A., Merck, lote K227434734 006) e a mistura etanol/isopropanol, em 5-10% em massa. As extrações com dióxido de carbono foram realizadas usando o terceiro lote obtido em Maria da Fé/Minas Gerais (M3) e o lote obtido em Botucatu/São Paulo (S1).

3.3.4.1 Unidade de Extração

Foi utilizada a Unidade I de Extração Supercrítica (Figura 3-1) do Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp-Brasil). O equipamento consiste em duas bombas de alta pressão para solvente (Thermo Separation Products, modelo 2000, Flórida/Estados Unidos), dois banhos termostáticos programáveis (PolyScience, modelo 9510, Estados Unidos) responsáveis pela temperatura do extrator e dos cabeçotes da bomba de CO₂, e uma célula extratora (Figura 3-2). O extrator de leito fixo possui diâmetro de $2,83 \times 10^{-2}$ m e comprimento de 0,375 m. O solvente utilizado foi o CO₂ (White Martins, 99,5% de pureza).



Figura 3-1. Unidade I de Extração Supercrítica do LASEFI/FEA/Unicamp.



Figura 3-2. Célula extratora e socador utilizado para empacotar o leito.

3.3.4.2 Procedimento Experimental

Os procedimentos descritos a seguir de forma sintética, podem ser visualizados na Figura 3-3, segundo Pasquel-Ruiz (1999):

A célula extratora foi empacotada com matéria-prima seca possuindo granulometria de 24, 32 e 48 mesh, empregando a mesma força para o empacotamento evitando assim caminhos preferenciais no leito, com uma massa aproximada de 0,1 kg, porém não se conseguiu manter a mesma massa para todos os tratamentos.

- Abertura da válvula 2 do cilindro 1 e leitura da pressão no manômetro 5a;
- Controle da temperatura dos reservatórios 6a, 6b, 6c e 14 e dos cabeçotes das bombas 7 e 8;
- Após atingir a temperatura (-5 a -10 °C), insere-se a amostra na célula de extração, no cilindro extrator (14);
- Pressurização do sistema (após alcance das temperaturas desejadas);
- Leitura da pressão nas bombas, que deve ser “zero”, abre-se todas as válvulas da unidade;
- Após 3 minutos, fecha-se as válvulas 2d, 2e, 2h, 2j, 2k, 2m da unidade;
- Pressuriza-se a coluna extratora (14) abrindo-se a válvula 2j;
- Atingida a pressão de trabalho (manômetro 5b), abre-se as válvulas de saída 2m e 15;
- Após o tempo pré-estabelecido de extração, desliga-se as bombas e os banhos termostáticos e fecha-se a válvula 2j;
- Abre-se a tampa superior do extrator (14) e retira-se a célula de extração.

A válvula micrométrica foi envolvida por uma fita de aquecimento e mantida a temperaturas (aproximadamente 80 °C) que permitissem a válvula não resfriar muito ou congelar pela passagem do CO₂ resfriado, impedindo a passagem do óleo na saída do sistema para o frasco coletor. Esta temperatura variou em função da temperatura do ambiente analisada fisicamente. Nos ensaios realizados ao se fixar a vazão do solvente e co-solvente nas bombas, o sistema foi pressurizado até a pressão desejada e então o controle desta pressão para mantê-la constante foi feito através das válvulas de saída após o extrator, distribuindo a perda de carga sobre a válvula de saída logo após o extrator e sobre a válvula micrométrica.

Com o sistema equilibrado termicamente e devidamente pressurizado, iniciou-se a extração em frascos coletores que inicialmente não eram resfriados, mas devido a altas vazões utilizando co-solvente foi necessário resfriar o frasco coletor para evitar perda por arraste do óleo para o adsorvente (saturando rapidamente), colocado depois da saída do frasco coletor e antes do bolhômetro. Os ensaios foram finalizados em tempos diferentes que variaram de 375 a 600 min de extração. Porém o rendimento total foi calculado para o tempo de extração de 375 min.

O produto obtido na corrente de saída do extrator é uma mistura multicomponente formada de CO_2 e das diferentes substâncias que constituem o extrato. Após a despressurização o CO_2 e alguns compostos voláteis são separados do extrato. Quando todo CO_2 é retirado, retiram-se os últimos frascos coletores que devem ser armazenados (pesados, tampados e lacrados) em temperatura menor ou igual a zero.

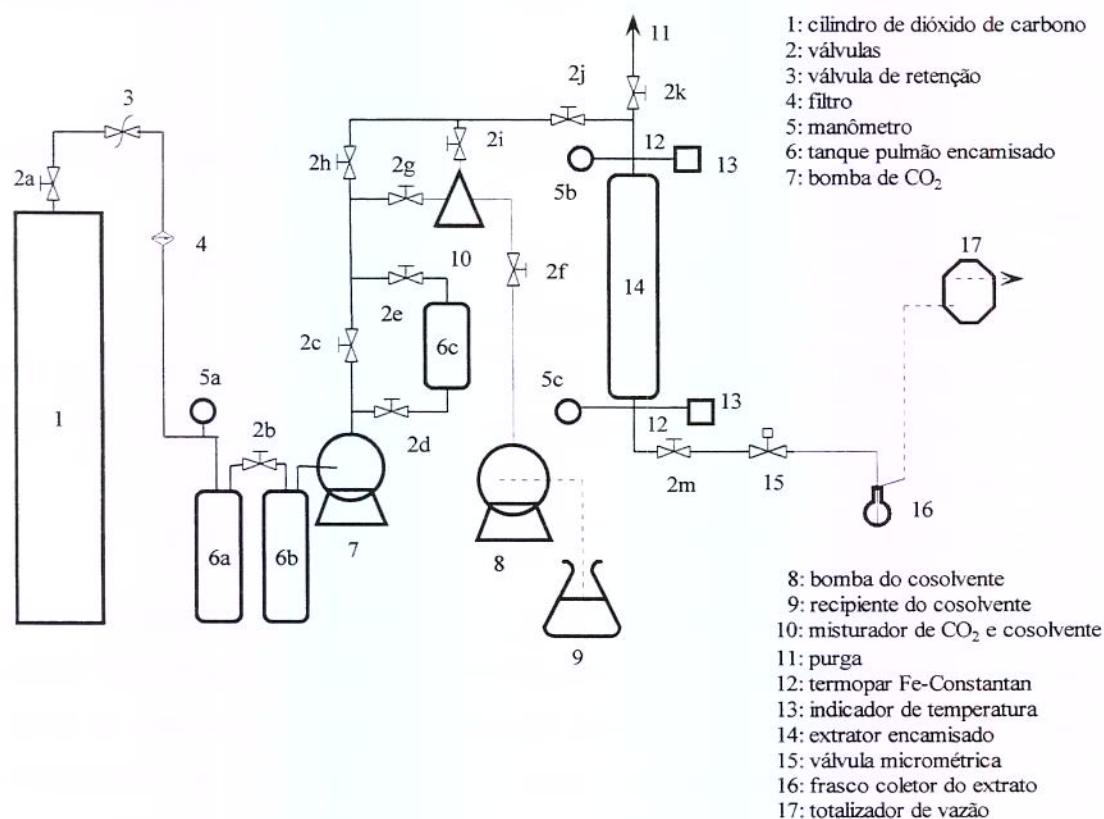


Figura 3-3. Diagrama da unidade experimental (Pasquel-Ruiz, 1999).

A vazão de solvente foi determinada conforme descrito no Apêndice I.

3.4 Utilização de adsorvente – “porapack”

Foram utilizadas colunas de vidro de 8mm de diâmetro e 10cm de comprimento (Figura 3-4), empacotadas com adsorvente da marca Supelco Park – Porapack tipo Q 80/100 mesh, com área superficial de 500-600 (m²/g) e densidade 0,34 (g/cm³) suportando temperatura máxima de 250 °C, para capturar a fração volátil do óleo na saída do extrator quando coletado o extrato e na saída do solvente para o cálculo da vazão. As colunas foram fechadas com lã de vidro. O adsorvente foi utilizado nos ensaios de ESC exceto nos ensaios preliminares à 150 bar e à 200/300 bar. As colunas eram trocadas por análise visual, quando o adsorvente começava a ser saturado pelo óleo volátil, em média a cada 100 min no início da extração e posteriormente a cada 200 ou 300 min, dependendo da vazão e porcentagem do co-solvente utilizado.



Figura 3-4. Coluna de vidro empacotada com Porapack tipo Q.

3.5 Remoção do co-solvente

Após a obtenção dos extratos obtidos por extração por soxhlet e ESC, o co-solvente foi removido por evaporação mantendo os frascos de vidro em estufa Napco Vacuum Oven modelo 5831 à vácuo até 25 inHg por 24h e posteriormente mantido em dessecador acoplado à bomba de vácuo Tecnal modelo TE-058 até -400 mmHg por mais 16 horas ou período total de 40 h quando a estufa não se encontrava disponível. Esta metodologia foi realizada no primeiro grupo de experimentos referente ao lote (M3) da matéria-prima obtida Maria da Fé-MG. No segundo grupo de experimentos realizado com a matéria-prima de Botucatu-SP (S1), foi utilizado para remoção do co-solvente o Sistema de Rotaevaporação, modelo LABOROTA 4001 com controlador de vácuo RATAVAC da marca Heidolph Instruments GMBH – Alemanha. Estes extratos possuíam uma grande quantidade de solvente retido no extrato, devido ao uso de alta porcentagem de co-solvente utilizada nas extrações, sendo então o método mais rápido e eficaz para evaporação do mesmo.

Os extratos obtidos no período de despressurização não foram contabilizados no cálculo do rendimento, pois as condições de obtenção destes não eram as mesmas de operação do sistema.

3.6 Análise da composição química dos Extratos

3.6.1 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Os óleos essenciais de cúrcuma foram caracterizados em relação a sua composição química em cromatógrafo à gás acoplado a detector seletivo de massas (CG-EM, Shimadzu, QP5000, Kyoto, Japão) operando com impacto de elétrons (70 e V), injetor tipo split/splitless, faixa de massas de 40 a 450 daltons. A análise foi conduzida em coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25 mm x 0,25 μ m, (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) J&W Scientific,), gás hélio (White Martins, 99,9% de pureza) com o gás de arraste, com vazão de 1,7 mL/min. As amostras foram diluídas em acetato de etila (5 mg/ 1 mL de solvente) e injetado 1 μ L de solução. A coluna cromatográfica foi aquecida inicialmente a 50°C e mantida por 5 minutos, a seguir aquecida até 280 °C a 5 °C/min e mantida a esta temperatura por 5 min. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do CG/EM (Nist 62 Library), literatura (McLafferty & Stanfer, 1989; Adams, 1995) e índice de retenção de Kovats. Os índices de retenção de Kovats foram obtidos através da co-injeção das amostras com uma série homóloga de n-alcanos (C_9H_{20} - $C_{25}H_{52}$) nas seguintes condições de análise: injetor à 220 °C, detector à 230 °C, vazão de gás 1,0 mL/min, split: 1/20, temperatura inicial da coluna à 60 °C e final à 220 °C, com aquecimento de 3 °C/min. Os índices de retenção foram calculados utilizando a equação proposta por Van den Dool (1963). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais, no Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas.

Foram selecionadas quatro amostras em cada tratamento mais o extrato retido no adsorvente para análise cromatográfica. Estas amostras foram escolhidas de modo que as três etapas do processo de extração fossem estudadas, em 75 min (período CER), 150 min (período FER), 225 e 375 min (período Difusional). Já no segundo grupo de experimentos foram analisados 3 pontos da curva global e em um adsorvente.

3.6.2 Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC)

Após a identificação dos compostos químicos por CG-EM as análises quantitativas foram realizadas em Cromatógrafo à Gás (CG) com detector por ionização em chama (CG-DIC) (Shimadzu, CG 17A, Kyoto, Japão GC 17A) com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25 mm x 0,25 μ m, J&W Scientific, Folsom, Califórnia-EUA). As condições de vazão dos gases, temperaturas do detector à 280 °C e injetor a 240 °C, volume de injeção e programação foram mantidas iguais às do CG-EM. As análises foram realizadas no Laboratório de Separações Físicas–Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp.

3.6.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Após a obtenção dos extratos foi realizada a Cromatografia em Camada Delgada comparativa em placa de sílica gel 60 (Merck, lote 940378601-Alemanha), com a fase móvel composta por hexano 80% (96% de pureza, P.A., Merck, lote K28659183 104) e acetato de etila 20% (99,5% de pureza, P.A., Merck, lote K225488323 837-Alemanha). As amostras analisadas foram extraídas utilizando como co-solvente etanol, isopropanol e etanol/isopropanol respectivamente todos a 300 bar. Os extratos, o óleo essencial e o padrão de curcuminóides (90%) foram diluídos em etanol 96% e aplicados nas placas com o auxílio de um capilar de vidro. Após a eluição, as placas foram borrifadas com uma solução de anisaldeído (100 mL de ácido acético glacial, 2 mL de ácido sulfúrico e 1 mL de anisaldeído) e aquecidas em chapa elétrica à 100 °C para a revelação das substâncias. Esta técnica permitiu identificar qualitativamente as substâncias extraídas pelos diferentes solventes.

3.6.4 Quantificação dos Curcuminóides por Espectrofotometria UV-visível

Para a quantificação da mistura de curcuminóides foi utilizado um espectrofotômetro-UV/Visível (Hitachi modelo U-3010, Tokyo, Japão) e a curva de calibração construída com um padrão de curcuminóides (grau de pureza de 90%) obtidos no ITAL-Campinas/SP. O procedimento encontra-se detalhado no Apêndice II.

Foi realizada a varredura de uma solução etanólica (etanol-99,8% de pureza, P.A., Merck, lote K28659183 104-Alemanha) do padrão, na região de 400 a 500 nm, com afinalidade de escolher o comprimento de onda de maior absorbância. Desta maneira adefiniu-se que as leituras de absorbância seriam efetuadas no comprimento de onda a 427 nm.

3.6.4.1 Teor de curcuminóides no extrato

Após a eliminação do solvente, foram transferidas amostras para tubos de ensaios cujas massas variaram de $1,0 \times 10^{-4}$ a $0,1 \times 10^{-6}$ kg. Os extratos foram diluídos em etanol (99,8% de pureza, P.A., Merck, lote K28659183 104-Alemanha) até que a leitura de absorbância se mantivesse no intervalo de 0,2 a 0,8. Os tubos de ensaio foram vedados com tampa de borracha (para evitar evaporação do solvente). Foram utilizadas cubetas de quartzo de 3 mL (M3) e cubetas de quartzo de 1 mL (S1) em algumas medidas devido a pequena obtida. Assim, o teor de CC é calculado sobre o extrato bruto obtido.

3.7 Propriedades funcionais dos extratos

Foram selecionadas três análises para a avaliação das propriedades funcionais, além da caracterização do extrato quantitativa e qualitativamente, do ponto de vista analítico e de processo. Estas análises deverão ser mais um parâmetro de escolha das melhores condições utilizadas no sistema.

3.7.1 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada pela aluna de Iniciação Científica, Patrícia Franco Leal (FEA/Unicamp), através do teste de oxidação acoplada de β -caroteno e ácido linolênico ou Monofalbmitate (Pratt, 1979). A metodologia consiste em preparar o substrato da reação em balão de rotaevaporador com 10 mg de β -caroteno, 10 mL de clorofórmio, 60 mg de ácido linolênico e 200 mg de tween 80. Esta solução é concentrada em rotaevaporador à 50 °C e posteriormente ressuspensa em 50 mL de água bidestilada. Para realizar a reação foram separados 1 mL do substrato adicionados 2 mL de água

bidestilada e 0,05 do extrato de cúrcuma diluído em etanol (0,02g de extrato/1 mL de etanol). Esta mistura é colocada em banho termostático à 40 °C e monitorado a coloração da solução por espectrofotômetro nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas no comprimento de onda de 470 nm (comprimento de onda do β -caroteno).

3.7.2 Atividade Bacteriana

Para a avaliação da atividade bacteriana, foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g/mL}$ dos compostos frente às micobactérias com o teste MABA-Microplate Alamar Blue Assay no Instituto Adolf Lutz de Ribeirão Preto, identificando atividade para Ra-*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, RV-*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, Ma-*Mycobacterium avium* e Mk-*Mycobacterium kansasii*, sob a responsabilidade da Ms. Daisy Sato.

Para a determinação da CIM em microplaca utilizou-se o Alamar Blue como revelador, frente às cepas padrão segundo técnica proposta por Franzblau *et al.* (1998).

Em uma microplaca estéril de 96 orifícios preta e com fundo transparente (PACKARD), foram depositados 200 mL de água destilada estéril nos orifícios da coluna 1 de A a H e na coluna 12 de A a H, para evitar a evaporação durante a incubação na estufa. A seguir, os orifícios de A a H da coluna 11 receberam 200 mL de meio líquido Middlebrook 7H12, os da coluna 10 de A a H receberam 100 mL, os da coluna 2 de A a H receberam 197,5 mL, os da coluna 3 de A a H receberam 195,0 mL e as demais colunas, 4 a 9 de A a H receberam 100 mL. Os orifícios da coluna 2 de A a H receberam 2,5 mL e os da coluna 3 de B a G receberam 5,0 mL da solução estoque da rifampicina diluída a 1:100.

A seguir, após a devida homogeneização, 100 mL contidos nos orifícios da coluna 3 de A a H foram transferidos para a coluna 4 de A a H e assim sucessivamente até que da coluna 9 de A a H, após homogeneização foram desprezados 100 mL.

Por último, adicionou-se em todos os orifícios, com exceção da coluna 2 de A a H e coluna 11 de A a H, 100 mL da suspensão de micobactérias diluída a 1:300. Dessa maneira obteve-se um volume final de 200 mL em cada orifício com as concentrações finais da rifampicina de 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312; 0,0156 mg/mL.

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37°C. Após 5 dias de incubação adicionou-se no orifício A-10, 12,5 mL Tween 80 a 20% e 20 mL de Alamar Blue (TREK DIAGNOSTIC SYSTEM INC.). As placas foram reincubadas a 37°C por 24 horas, após o que foi realizada a leitura com o auxílio do luminômetro. Ao se obter uma leitura entre 10.000 a 20.000 UL(Unidade de Luz), foram adicionados 12,5 mL do Tween 80 e 20,0 mL do Alamar Blue nos demais orifícios, sendo as placas reincubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura final.

A manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rósea, como presença de crescimento bacteriano.

Considerando a média da leitura em UL dos orifícios controle positivo (coluna 10 de A a H) como sendo a e o resultado em UL de cada orifício com a respectiva diluição da rifampicina como b , aplicou-se a seguinte fórmula para encontrar a porcentagem de inibição de crescimento da micobactéria em cada diluição da rifampicina.

$$\% \text{ de Inibição de Crescimento Bacteriano} = \frac{1 - b}{a} \times 100 \quad \text{Eq.3-10}$$

A CIM foi definida como a menor concentração de droga capaz de inibir o crescimento de 90% da cepas.

3.7.3 Atividade Antiproliferativa

Foi identificada a atividade antiproliferativa no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Divisão de Farmacologia e Toxicologia pela responsabilidade do Dr. João Ernesto de Carvalho. A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada em 9 linhagens originárias de tumores humanos: pulmão (NCI460), mama (MCF-7), mama (fenótipo de resistência à múltiplas drogas-NCI ADR), melanoma (UACC-62), ovário (OVCAR), cólon (HT29), próstata (PC03), rim (786), leucemia (K562). As linhagens celulares foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos EUA. Estas células foram cultivadas em meio de cultura denominado RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB).

Para a linhagem leucemia foi realizada uma suspensão de células, para as demais linhagens os repiques foram realizados a partir de células aderidas e posteriormente suspensas. A diluição foi dependente de cada linhagem celular e a contagem celular em uma Câmara de Neubauer, sendo contados os quatro quadrantes e determinada a média aritmética e corrigido pelo fator de correção da câmara. Foram plaqueados 100 µL de células em meio DMEM/SFB/gentamicina, incubadas por 24 horas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade utilizando um controle.

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 1g/mL resultando em soluções estoques, diluídas 400 vezes em DMEM/SFB/gentamicina. Foram adicionados nas placas 100µL de extrato nas concentrações de 0,25 a 250 µg/mL. Após período de 48 horas de incubação, as células foram fixadas através da adição de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão, incubadas por 1 hora à 4 °C para fixação celular. Após o período de incubação foram realizadas lavagens consecutivas para remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. As placas foram mantidas à temperatura ambiente até secagem e coradas com sulforrodamina B (SRB) a 0,4%. O excesso de SRB foi removido das placas após 10 minutos pela lavagem com ácido acético (1%). O corante foi solubilizado com uma solução de Trizma Base (10 µM e pH 10,5) por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em leitor de microplacas.

Foram calculadas as médias de absorbâncias (descontados o controle) para determinação da inibição do crescimento (IC) de cada amostra testada de acordo com os casos: Se $T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresenta IC;

Se $T \geq C$ mas $< C$, a droga será citostática ;

Se $T < C$ a droga é citocida,

A equação utilizada é:

$$\text{Inibição do Crescimento (\%)} = 100 \times \left[\frac{(T - T_0)}{(C - T_0)} \right] \quad \text{Eq. 3-11}$$

onde: T= média da absorbância na célula tratada;

C= controle da célula;

T₀= controle da célula no dia da adição da droga

As amostras são consideradas ativas quando apresentarem inibição de crescimento bacteriano maior que 50% e de forma dose dependente. Os dados de quantificação da proteína mostram o crescimento bacteriano.

3.8 Planejamento experimental da Extração Supercrítica

Os ensaios foram realizados usando-se como fatores a matéria-prima, a pressão baseada nos dados de Monteiro (1999) e Began *et al* (2000), vazão do solvente, adição e teor de co-solvente baseado em dados de Portillo Prieto (1999) e Chassagnez (1998). A temperatura foi fixada em 303,15 K baseado nos resultados de Began *et al* (2000).

Assim, foram selecionados valores de P, Q e % de co-solvente, com planejamento do primeiro grupo de ensaios na forma fatorial de 3x2, composto por três solventes: etanol, isopropanol e etanol/isopropanol (5% volume) e duas pressões: 200 e 300 bar, com a vazão de entrada de solvente e temperatura constante de 4 mL/min e 303,15K, utilizando a matéria-prima de Minas Gerais do lote M31(Figura 3-5). No término deste primeiro grupo de ensaios, foi feita uma análise a fim de obter as variáveis de maior influência, escolhendo assim o co-solvente que proporcionou maior solubilidade do extrato na melhor pressão de operação (o co-solvente etanol/isopropanol à 300 bar).

A partir destas informações sobre as melhores condições operacionais, estruturou-se um segundo grupo de ensaios buscando a influência de novas variáveis, fixando-se então o co-solvente etanol/isopropanol à pressão 300 bar e à temperatura de 303,15 K, construindo um planejamento fatorial 3x2, com três vazões 4, 2 e 1 mL/min e duas percentagens de co-solvente: 5 e 10 (% volume) utilizando a matéria-prima de SP do lote S1, buscando as melhores condições de operação na unidade extratora. As porcentagens de co-solvente foram fixadas em volume e depois calculada a porcentagem mássica.

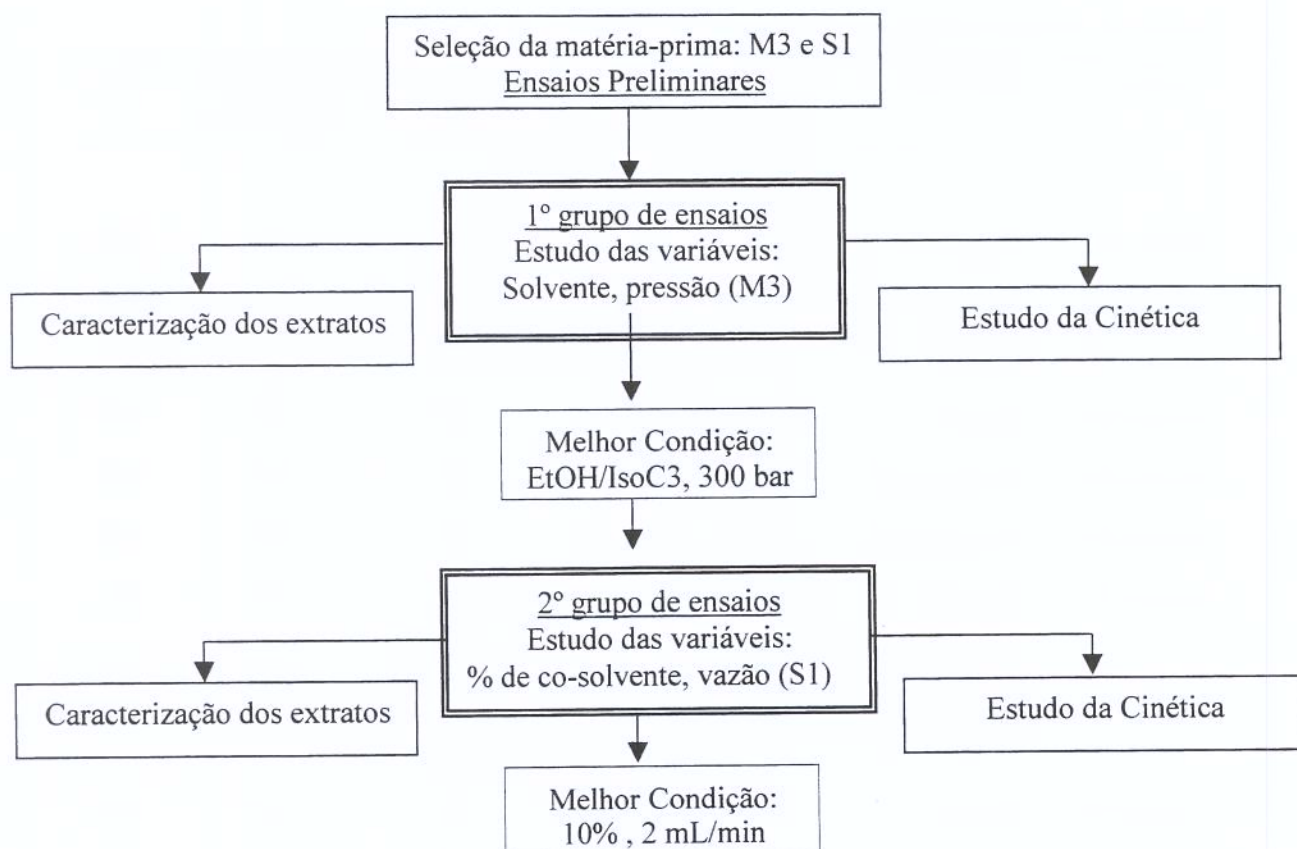


Figura 3-5. Diagrama do Delineamento Experimental.

A Tabela 3-2 indica os ensaios que foram realizados:

Tabela 3-2. Ensaios realizados e suas variáveis experimentais.

Ensaios	Solvente	Pressão (bar)	Vazão (bar)	Temperatura (°C)	Co-solvente (% volume)	Lote
<u>Ensaios Preliminares</u>						
Ensaio 01	Etanol	150	3,0	30	5,0	M3
Ensaio 02	Etanol	150	3,0	30	5,0	M3
Ensaio 03	Etanol	250	3,7	30	5,0	S1
Ensaio 04	Etanol	200/300	4,0	30	5,0	M3
Ensaio 06	Isopropanol	200	4,0	30	5,0	M3
Ensaio 07	Isopropanol	300	4,0	30	5,0	M3
Ensaio 11	Etanol/ Isopropanol	200	2,0	30	5,0	S1
Ensaio 12	Etanol/ Isopropanol	200	4,0	25	5,0	S1
<u>Primeiro Grupo de ensaios</u>						
Ensaio 05	Etanol	200	4,0	30	5,0	M3
Ensaio 08	Etanol	300	4,0	30	5,0	M3
Ensaio 09	Isopropanol	200	4,0	30	5,0	M3
Ensaio 10	Isopropanol	300	4,0	30	5,0	M3
Ensaio 13	Etanol/ Isopropanol	200	4,0	30	5,0	M3
Ensaio 14	Etanol/ Isopropanol	300	4,0	30	5,0	M3
<u>Segundo Grupo de Ensaios</u>						
Ensaio 16	Etanol/ Isopropanol	300	4,0	30	10,0	S1
Ensaio 17	Etanol/ Isopropanol	300	4,0	30	5,0	S1
Ensaio 18	Etanol/ Isopropanol	300	2,0	30	10,0	S1
Ensaio 19	Etanol/ Isopropanol	300	2,0	30	5,0	S1
Ensaio 20	Etanol/ Isopropanol	300	1,0	30	10,0	S1
Ensaio 21	Etanol/ Isopropanol	300	1,0	30	5,0	S1

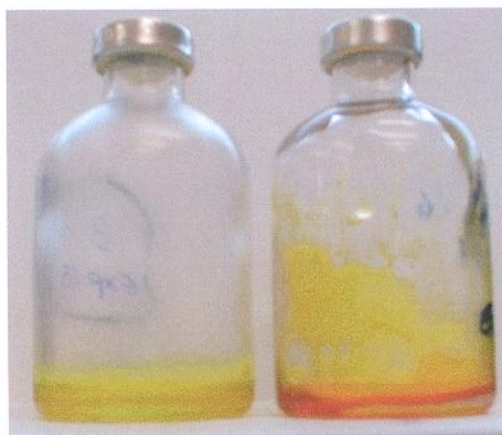
3.9. Forma de Análise dos Resultados

3.9.1 Análise das Curvas Globais de Extração

Para todos os ensaios as variáveis respostas consideradas foram: perfil fitoquímico e os parâmetros cinéticos: M_{CER} (taxa de transferência de massa para o período de taxa constante de extração - kg soluto/s); t_{CER} (duração do período de taxa constante de extração); Y_{CER} (razão mássica do óleo na fase fluida na saída do extrator, para o período de taxa constante de extração -góleo/g CO₂) e R_{CER} (rendimento para o período CER - % em massa); R_{TOTAL} (rendimento total obtido na curva global de extração). O rendimento foi determinado pela massa de extrato obtida após 6 horas e 25 minutos de processo e a massa da matéria-prima utilizada.

Os parâmetros cinéticos foram obtidos através do ajuste de um “spline linear” (2 retas) usando o software SAS versão 6.12 e os procedimentos PROC REG e PROC GLM (Freud & Littel, 1995) e o rendimento de extrato considerando a massa total de extrato coletado e a massa seca da matéria-prima colocada no extrator.

Capítulo 4. Resultados e Discussões



Frascos contendo extrato de *Curcuma longa* L.

4. Resultados e Discussões

4.1 Treinamento na unidade Extratora

Foi realizado treinamento na unidade extratora, a fim de estar apto a controlar o processo de extração. No treinamento foram realizadas extrações com diferentes matérias-primas para identificar as dificuldades no manuseio de matrizes sólidas com características variadas, como folhas (estévia), rizomas (gengibre) e flores (cravo). Os dados obtidos no treinamento encontram-se no Anexo III.

4.2 Análises Preliminares

Utilizando os lotes de matéria-prima M1 e M2 proveniente de Minas Gerais, foi testada a metodologia de extração com solvente orgânico (soxhlet), quantificação dos CC por espectrofotometria, e identificação das substâncias voláteis presentes no extrato de *C. longa* por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos (Tabela 4-1) e analisados pelo programa Statística através do teste T de comparação para amostras independentes, revelam que as amostras possuíam teores de curcuminóides no rizoma aproximadamente de 2,5% sem diferença significativa ao nível de 5%. O teor de curcuminóides na oleoresina foi maior para a amostra M1 cultivada com teor de N₂ de 0,50% (25,16%), mas sem diferença significativa ao nível de 5%.

Tabela 4-1. Composição da matéria-prima em relação à oleoresina e curcuminóides presentes.

Matéria-prima	oleoresina (%) no rizoma	CC (%) na oleoresina	CC (%) no rizoma
M1	9,75 ± 0,35	25,16 ± 0,75	2,45 ± 0,16
M2	11,72 ± 1,29	21,14 ± 3,82	2,45 ± 0,18

O rendimento de óleo essencial variou significativamente ao nível de 5%, com maior média para a amostra M2 cultivada com teor de N₂ de 1,50% (1,73%) (Tabela 4-2).

Tabela 4-2. Rendimento de óleo essencial da *Curcuma longa* L. obtido por Hidrodestilação

Matéria-prima	Tempo de Extração	Rendimento do óleo (%) / matéria seca
M1	3 h	0,91 ± 0,20
M2	2 h	1,73 ± 0,20

O perfil fitoquímico (Tabela 4-3) dos óleos essenciais mostrou diferença para as principais substâncias: na amostra M1 com menor dose de N₂ observa-se uma maior percentagem para o *felandreno* (11,01%), *ar-turmerona* (15,38%) e 1,8-cineol, enquanto a amostra com maior nível de N₂ (M2) apresenta maior percentagem de α -zingibereno (9,73) (*Z*)- γ -atlantona (40,25%).

Tabela 4-3. Composição química (% área) da *Curcuma longa* L. para amostras distintas em relação ao cultivo por adubação.

Substâncias	Matérias-primas (% área)	
	M1	M2
Felandreno	11,01	2,49
1,8-cineol	6,14	3,75
α -zingibereno	1,77	9,73
Diidro-turmerona	3,23	tr
Ar-turmerona	15,38	13,06
(<i>Z</i>)- γ -atlantona	35,47	40,25
(<i>Z</i>)- α -atlantona	15,26	16,12
(<i>E</i>)- α -atlantona	0,78	0,60

tr=traço, % $\leq 0,31$

Conclui-se então que a amostra M2 obteve maior rendimento em óleo essencial, maior rendimento de oleoresina no rizoma e menor teor de curcuminóides na oleoresina, porém o teor de CC no rizoma e na oleoresina não obtiveram diferença significativa estatisticamente. Diante dos resultados conclui-se que a matéria-prima cultivada com maior dose de nitrogênio favorece o aumento do rendimento em óleo essencial, onde o cultivo não influenciou significativamente o teor de CC na matéria-prima.

4.3 Caracterização das partículas e do leito: Densidade, Porosidade e Diâmetro Médio das partículas

Observou-se a partir da matéria-prima seca sob duas formas, triturada e fatiada, que a matéria-prima fatiada possuía uma resistência e dureza maior para ser moída que a triturada. A célula utilizada para extração possui volume interno de 211,42 cm³ e a caracterização das partículas encontra-se na Tabela 4-4:

Tabela 4-4. Densidade Aparente, Real, Porosidade do Leito e Diâmetro Médio das Partículas da Matéria-prima utilizadas na ESC com *C. longa* L.

Matéria-prima-lote M3				
Co-solvente, pressão	d_a (g/cm ³)	d_r (g/cm ³)	ϵ	Dp (mm)
EtOH, 200bar	0,4371		0,6639	
EtOH, 300bar	0,4374		0,6638	
IsoC3, 200bar	0,4869		0,6257	
IsoC3, 300bar	0,5566	1,3011	0,5721	0,6918
EtOH/IsoC3, 200bar	0,4303		0,6692	
EtOH/IsoC3, 300bar	0,4533		0,6515	
Matéria-prima-lote S1				
Vazão, % de co-solvente				
1,12 x10 ⁻⁵ kg/s, 8,32%	0,5385		0,5538	
1,13x10 ⁻⁵ kg/s, 16,11%	0,5153		0,5730	
2,21x10 ⁻⁵ kg/s, 6,66%	0,5155	1,2070	0,5728	0,6872
2,31x10 ⁻⁵ kg/s, 13,59%	0,5364		0,5555	
3,12x10 ⁻⁵ kg/s, 13,78%	0,5329		0,5584	
4,51x10 ⁻⁵ kg/s, 6,95%	0,5173		0,5714	

4.4 Composição centesimal

Na Tabela 4-5 encontra-se a composição centesimal das matérias-primas utilizadas:

Tabela 4-5. Composição centesimal das matérias-primas M3 (origem MG) e S1(origem SP) utilizadas na extração supercrítica e do resíduo R-S1.

	M1 (%)	S1 (%)	R-S1 (%)
<i>Cinzas</i>	8,49 ± 0,03	5,91 ± 0,003	6,79± 0,03
<i>Fibras</i>	2,98 ± 1,06	1,60 ± 0,37	1,80±0,28
<i>Lipídios</i>	4,98 ± 0,19	3,43 ± 0,51	0,21 ± 0,05
<i>Amido</i>	19,44± 4,08	34,06± 1,44	37,13 ± 2,53
<i>Proteína</i>	10,74 ± 0,03	12,17 ± 0,17	13,29 ± 0,05
<i>Glicose</i>	7,01 ± 0,003	3,21 ± 0,01	2,90 ± 0,01
<i>Umidade*</i>	85,20	66,70	-
<i>Umidade**</i>	8,00	9,30	-

*umidade obtida na cúrcuma “in natura”.

** umidade obtida na cúrcuma desidratada.

4.5 Resíduo

O estudo do resíduo pode ser avaliado através da composição centesimal (Tabela 4-5), identificando a presença de grande quantidade de amido (37%) e na Tabela 4-6 verifica-se que o resíduo possui traços de CC ($2,21 \times 10^{-5}$ a $6,67 \times 10^{-6}\%$) características que podem conferir valor ao resíduo, com potencial para futuros estudos.

4.6 Extrações

4.6.1. Extração com solvente orgânico (soxhlet) e hidrodestilação

Com o objetivo de escolher a matéria-prima de melhor qualidade, efetuou-se extrações com solvente orgânico e por hidrodestilação.

A Tabela 4-6 mostra valores de rendimento de oleoresina, óleo essencial e massa de CC obtidos a partir da matéria-prima seca.

Tabela 4-6. Rendimento (%) de oleoresina e óleo essencial de *C. longa* (matéria-prima seca) obtidos através de extração por Soxhlet, Hidrodestilação e o teor de CC (%) no extrato.

Matéria-prima	Soxhlet (%)	Hidrodestilação (%)	CC (%)
M3	$19,04 \pm 0,86$	$2,87 \pm 0,03$	1,27
S1	$24,25 \pm 1,41$	$3,33 \pm 0,25$	1,41
R-M3	20,00	-	$6,67 \times 10^{-6}$
R-S1	20,29	-	$2,21 \times 10^{-5}$

A Tabela 4-6 mostra o maior rendimento de extrato obtido por extração com Soxhlet, porém baixo rendimento de CC. A Hidrodestilação mostra valores de rendimento semelhantes aos da literatura. Ambas as metodologias mostram maiores valores de rendimento de oleoresina, óleo essencial e de massa de CC maiores para o lote S1.

4.6.2. Extração Supercrítica

4.6.2.1. Ensaios Preliminares

As curvas globais de extração são apresentadas através de gráficos de rendimento *versus* tempo de extração comparando os tratamentos (Figura 4-1). Foram realizados

ensaios preliminares com etanol em diferentes condições de pressão e vazão mantendo constante a temperatura e variando a matéria-prima quanto à origem, com a intenção de reconhecer o sistema a ser trabalhado (CO₂/EtOH/cúrcuma).

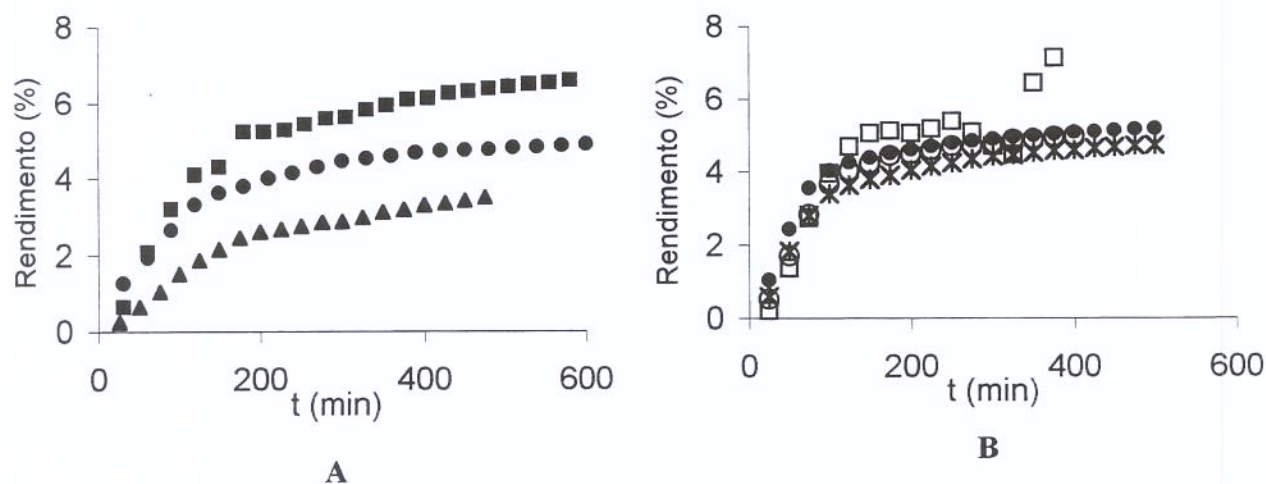


Figura 4-1. ESC de oleoresina de *C. longa* a 303,15 K. ■ CO₂/EtOH 150 bar, $6,30 \times 10^{-5}$ kg/s/M1
 ▲ CO₂/EtOH 200/300 bar, $6,37 \times 10^{-5}$ kg/s/M1 ● CO₂/EtOH 250 bar $7,24 \times 10^{-5}$ kg/s/S1 (B)
 ○ CO₂/Iso-C3 200 bar $4,20 \times 10^{-5}$ kg/s/M3, □ CO₂/Iso-C3 300 bar $3,57 \times 10^{-5}$ kg/s/M3,
 * CO₂/EtOH/Iso-C3 200 bar $1,42 \times 10^{-5}$ kg/s/S1 ● CO₂/EtOH/Iso-C3 200 bar $4,43 \times 10^{-5}$ kg/s/S1.

O ensaio com CO₂/etanol a 150 bar (Figura 4-1A), vazão de $6,30 \times 10^{-5}$ Kg/s foi iniciado e interrompido aos 180 minutos de extração por falta de controle das condições operacionais. A mesma matéria-prima deste experimento foi evaporada e reutilizada num outro ensaio, dando continuidade ao processo de extração por mais 425 min, estes resultados foram expressos em uma única curva. O alto rendimento obtido neste ensaio provavelmente ocorreu pelo contato do co-solvente com a matéria-prima, durante um longo período antes da reextração.

Houve dificuldades em manter a vazão e a pressão estáveis, optando-se então por elevar as pressões. Esta tentativa foi feita num mesmo experimento (200/300 bar, $6,37 \times 10^{-5}$ kg/s /M1) onde a pressão foi elevada de 200 a 300 bar em 175 minutos de extração e a vazão de $6,30 \times 10^{-5}$ para $6,37 \times 10^{-5}$ kg/s. A utilização de CO₂/etanol à baixa pressão (150 bar) e o contato do solvente com a matriz por mais tempo proporcionou maior rendimento de extrato, como mostra a Figura 4-1.

A Tabela 4-7 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos para três ensaios preliminares.

Tabela 4-7. Parâmetros cinéticos (M_{CER} , Y_{CER} , t_{CER} , R_{CER} e R_{Total}) e CC dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos por ESC (CO_2+EtOH), temperatura de 303,15 K e variáveis pressão, tempo de extração, vazão de solvente, e matéria-prima.

Ensaios Preliminares	M_{CER} (kg/s)	$Y_{CER} \times 10^{-7}$ (kg/s)	$t_{CER}/60$ (s)	R_{CER} (%)	R_{Total} (%)	CC (%)
150bar, 580min, $6,30 \times 10^{-5}$ kg/s, M1	0,03	1,99	159,70	3,99	5,99	0,02
200/300bar, 475min, $6,37 \times 10^{-5}$ g/s, M1	0,02	0,98	165,90	2,06	2,81	0,13
250bar, 570min, $7,24 \times 10^{-5}$ kg/s, S1	0,02	1,43	133,70	2,64	3,63	0,12

No ensaio com CO_2 /etanol, vazão de $6,37 \times 10^{-5}$ kg/s e 303,15 K, com variação de pressão 200 para 300 bar após o período de extração de 175 min, os CC foram extraídos com mais abundância em relação aos demais tratamentos que utilizaram como co-solvente o CO_2 /etanol à 150 bar. Uma possível explicação para este fato, pode ser o rompimento da estrutura da matriz celular com a variação de altas pressões, liberando o conteúdo celular presente na mesma, principalmente os CC.

A utilização da matéria-prima S1 no ensaio com CO_2 /etanol à 250 bar, vazão total de solvente de $7,24 \times 10^{-5}$ kg/s proporcionou valor de massa de CC (5,60 mg) significativo comparado aos demais.

Ao se utilizar o co-solvente isopropanol, o ensaio CO_2 /Iso-C3 300 bar $3,57 \times 10^{-5}$ kg/s/M3 foi repetido por apresentar valores de massa acumulada não confiáveis (Figura 4-2B). Para que a diferença nos valores da curva global de extração fosse reparada, realizou-se repetição destes ensaios.

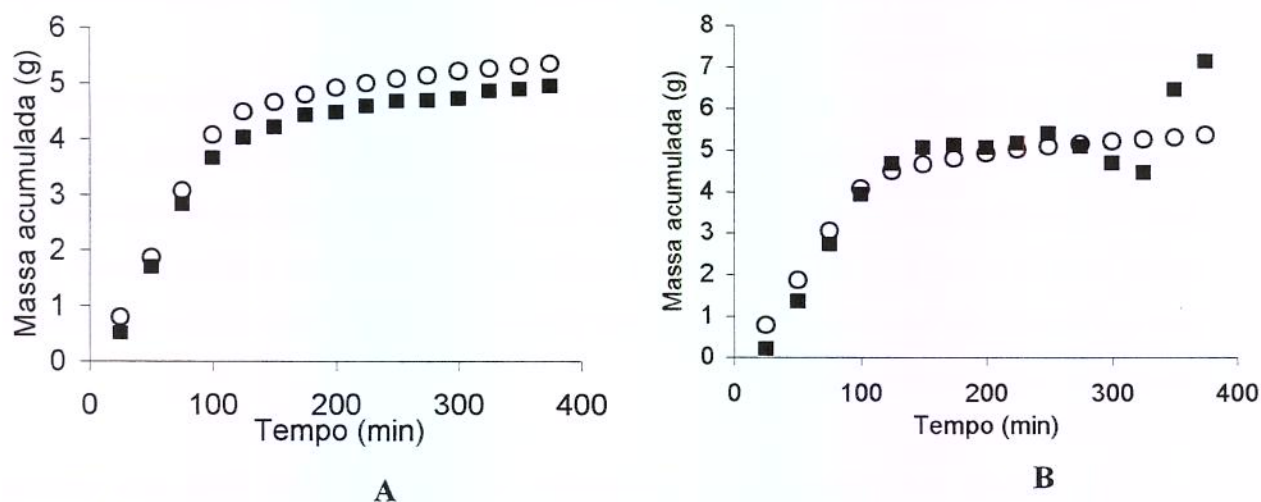


Figura 4-2. Ensaios com CO_2 /Iso-C3 a 200 bar e $4,20 \times 10^{-5}$ kg/s/M3 (A) e CO_2 /Iso-C3 300 bar e $3,57 \times 10^{-5}$ kg/s/M3 (B), realizados com repetição. ■ primeiro ensaio ○ repetição

Pode-se observar na Figura 4-2 **B** que a redução dos valores de massa acumulada a partir de 275 minutos, foi causada por erro nas pesagens das amostras coletadas no final da extração com a descalibração da balança analítica utilizada, pois os valores de massa foram negativos alterando o perfil da curva. Os valores utilizados no primeiro grupo de ensaios foram os valores da repetição, assim adotados para os dois ensaios.

4.6.2.2. Primeiro Grupo de Ensaios

A partir dos resultados mostrados na Tabela 4-6, a matéria-prima escolhida para realização do primeiro grupo de ensaios foi do lote M3.

A Figura 4-3 mostra as curvas globais de extração com variação dos solventes, pressão e vazão, mantendo a temperatura constante de 303,15 K e a porcentagem média de co-solvente a 6,39%.

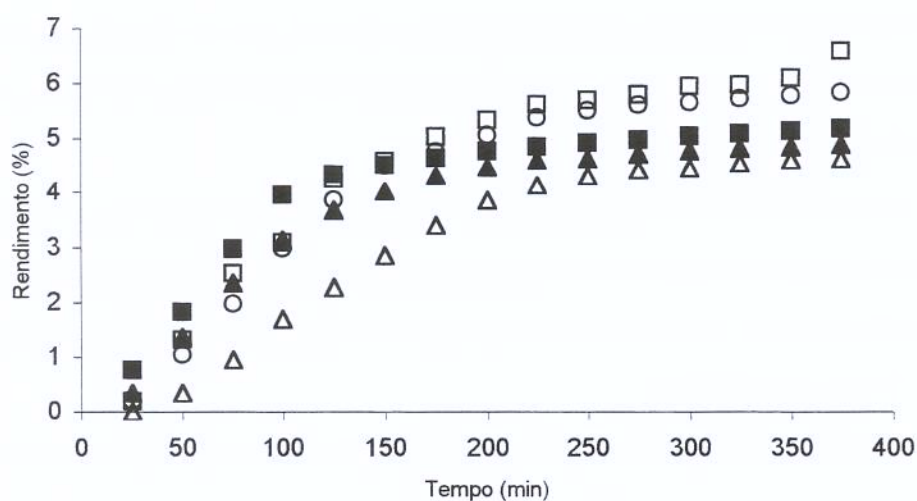


Figura 4-3. Obtenção de extratos de *C. longa* por ESC ▲ CO₂/EtOH 200 bar/ $4,45 \times 10^{-5}$ kg/s
 △ CO₂/EtOH 300 bar/ $3,83 \times 10^{-5}$ kg/s ● CO₂/Iso-C3 200 bar/ $3,94 \times 10^{-5}$ kg/s
 ○ CO₂/Iso-C3 300 bar/ $3,66 \times 10^{-5}$ kg/s ■ CO₂/EtOH-Iso-C3 200 bar/ $4,09 \times 10^{-5}$ kg/s
 □ CO₂/EtOH-Iso-C3 300 bar/ $3,52 \times 10^{-5}$ kg/s

Neste primeiro grupo de ensaios, o rendimento foi maior para o tratamento com CO₂/etanol/isopropanol à 300 bar como mostra a Figura 4-3.

A Tabela 4-8 mostra os parâmetros cinéticos dos ensaios (M_{CER} , Y_{CER} , t_{CER} , R_{CER} e R_{Total}) e teor de CC na vazão média do solvente de $3,92 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K, lote M1 de matéria-prima, e porcentagem média de co-solvente 6,39%.

Tabela 4-8. Parâmetros cinéticos e teor de CC dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos por ESC, com variáveis de processo: co-solvente e pressão.

Tratamento	$M_{CER} \times 10^{-7}$ (kg/s)	$Y_{CER} \times 10^{-7}$ (kg/s)	$t_{CER/60}$ (s)	$R_{CER}(\%)$	$R_{Total}(\%)$	CC(%)
EtOH, 200bar	5,20	1,86	134,70	3,80	4,90	0,0091
EtOH, 300bar	3,57	1,43	209,50	3,96	4,65	0,0126
IsoC3, 200bar	7,35	2,88	110,30	4,11	5,20	0,0006
IsoC3, 300bar	7,27	3,13	148,70	4,52	5,86	0,0301
EtOH/IsoC3, 200bar	7,77	3,00	111,20	4,50	5,62	0,1863
EtOH/IsoC3, 300bar	6,32	3,01	138,20	4,43	6,61	0,2113

Na Tabela 4-8 identificou-se nos ensaios com etanol, que ao elevar a pressão de 200 a 300 bar houve um pequeno aumento no R_{CER} , mas um decréscimo no R_{Total} , mantendo baixa o teor de CC (0,0126%).

Nos ensaios com CO_2 /isopropanol, obteve-se a 200 bar o menor t_{CER} deste grupo de ensaios (110,30 min), e no ensaio à 300 bar obteve o maior R_{CER} (4,52 %) e um alto R_{Total} (5,86 %), verificando um aumento de 5 vezes em CC em relação à 200 bar, obtendo maior rendimento, Braga *et al* (2001a).

Em relação à utilização do co-solvente CO_2 /etanol/isopropanol, o ensaio a 200 bar obteve os maiores valores para M_{CER} , Y_{CER} , R_{CER} , com o segundo menor tempo t_{CER} (110,20 min), com teor considerável de CC (0,18%). Quando elevada a pressão de 200 a 300 bar obteve-se o maior no R_{Total} dos ensaios analisados e o maior teor de CC (0,2113%), além de altos valores de M_{CER} , Y_{CER} , R_{CER} .

A Figura 4-4 compara os dados experimentais da curva global de extração com o modelo “spline” obtido pelo software SAS 16.2 para ajuste das curvas de extração.

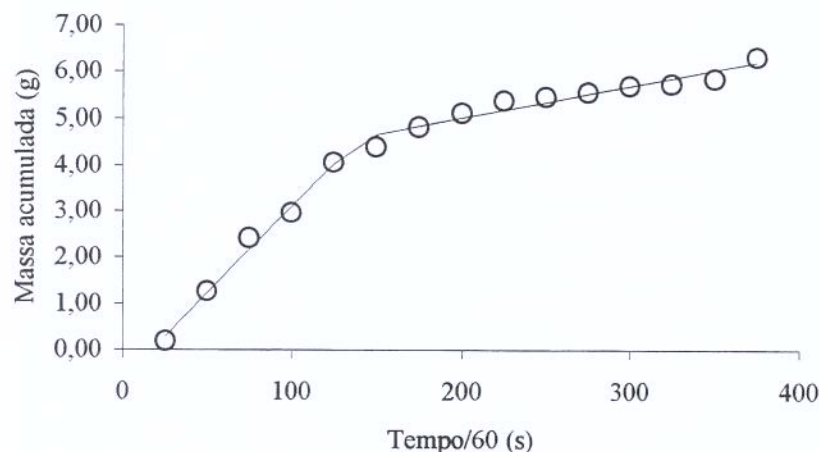


Figura 4-4. Curva global de extração para o ensaio com $\text{CO}_2/\text{EtOH}/\text{IsoC}_3$, pressão de 300 bar, temperatura de 303,15 K e vazão de entrada de $3,54 \times 10^5$ kg/s (7,41% co-solvente).

o experimental ; — predito

Este modelo (spline), descreve quantitativamente a curva de extração. Assim, os efeitos de pressão e co-solvente podem ser avaliados utilizando os parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 4-8. Este comportamento foi observado para todas as condições experimentais. Os valores experimentais, preditos, residuais encontram-se no Anexo IV e as saídas do software SAS 16.2 encontram-se no Anexo V.

4.6.2.2.1. Composição Química dos extratos

Foi identificada a composição química do óleo essencial para o lote M3 (utilizado no primeiro grupo de ensaios de ESC (Tabela 4-9).

Tabela 4-9. Composição química do óleo essencial de *C. longa* obtido por Hidrodestilação do lote M3.

Substâncias	Hidrodestilação
Felandreno	tr
α -pineno	2,72
1,8-cineol	1,43
Trans-cariofileno	tr
Ar-curcumeno	1,04
α -zingibereno	2,38
β -bisaboleno	tr
β -sesquifelandreno	1,91
Ar-turmerol	1,14
isômero do ar-turmerol	0,72
Ar-turmerona	17,99
(Z)- γ -atlantona	44,02
(E)- γ -atlantona	18,31
Dihidro-Ar-turmerona	tr
1-epi-cubenol	0,60
6S, 7R-bisabolona	0,61
(Z)- α -atlantona	0,63
(E)- α -Atlantona	0,63
Total	94,14

tr=traço, % $\geq 0,60$; n.i.= não identificado

A Tabela 4-10 mostra a composição química média dos extratos para o primeiro grupo de ensaios.

Tabela 4-10 Composição química média dos extratos de *Curcuma longa* L.

Substâncias	Condições do Processo (% área)						
	Co-solvente Pressão	EtOH (200 bar)	EtOH (300 bar)	Iso-C3 (200 bar)	Iso-C3 (300 bar)	EtOH/ Iso-C3 (200 bar)	EtOH/ Iso-C3 (300 bar)
Felandreno		tr	-	-	-	-	-
α-pineno		tr	tr	Tr	tr	tr	tr
1,8-cineol		tr	tr	0,18	tr	tr	tr
Trans-cariofileno		tr	tr	0,34	0,39	0,48	0,36
Ar-curcumeno		2,27	1,96	0,82	0,95	0,92	0,92
α-zingibereno		1,59	1,90	1,97	2,37	2,09	2,23
β-bisaboleno		tr	0,51	0,34	0,41	0,46	0,40
β-sesquifelandreno		2,36	2,56	1,71	1,98	1,91	1,93
Ar-turmerol		1,22	1,03	0,74	0,75	0,76	0,74
isômero do ar-turmerol		1,28	1,11	0,82	0,80	0,83	0,80
Ar-turmerona		28,14	26,91	15,44	15,07	15,61	14,95
(Z)-γ-atlantona		24,22	24,74	35,41	39,45	35,05	36,20
(E)-γ-atlantona		20,25	19,77	16,93	18,03	17,16	17,09
Dihidro-Ar-turmerona		tr	tr	0,41	0,39	tr	0,38
1-epi-cubenol		tr	0,71	0,64	0,62	0,61	0,60
6S, 7R-bisabolona		1,18	1,06	0,91	0,90	0,86	0,88
(Z)-α-atlantona		tr	0,49	0,47	0,44	0,52	1,71
(E)-α-Atlantona		tr	tr	0,60	0,66	0,55	0,87
Total		78,38	79,49	76,92	81,06	76,22	79,69

tr=traço, %<0,3375; n.i.= não identificado

Dos principais componentes do óleo essencial estão presentes em abundância a *ar-turmerona*, (Z)- γ -atlantona e (Z)- α -atlantona. Para o primeiro grupo de ensaios (Tabela 4-10) a mistura destas três substâncias formou cerca de 67-80% em área do cromatograma da amostra analisada no cromatógrafo (1 μ L/mL), Braga *et al.* (2001a).

Nos ensaios com CO₂/isopropanol e mistura CO₂/etanol/isopropanol a proporção relativa da *ar-turmerona* foi reduzida a aproximadamente 15% e a (Z)- γ -atlantona foi acrescida até aproximadamente 39%. Para as condições do ensaio com a mistura de CO₂/etanol/isopropanol à 300 bar, a proporção foi elevada para (Z)- α -atlantona (1,71%) e o ensaio com CO₂/etanol a 200 e 300 bar, elevou a proporção para (E)- γ -atlantona (aproximadamente 20%), em geral mantendo estável a proporção relativa destas principais

substâncias. A composição química do período completo dos ensaios e do óleo essencial retido no adsorvente encontra-se no Anexo VI.

Ao comparar a composição química dos extratos apresentados obtidos com ESC CO₂/isopropanol (Tabela 4-10) com a hidrodestilação (Tabela 4-9), verifica-se que a proporção relativa das substâncias da ESC se assemelham ao da hidrodestilação.

A análise da Tabela 4-10 realizada com extratos obtidos por ESC com CO₂/isopropanol obteve proporções relativas semelhantes as da hidrodestilação na Tabela 4-9.

A composição química foi identificada em cada uma das etapas de extração nos diversos ensaios: as etapas Constante (Tabela 4-11) e Decrescente (Tabela 4-12) de Extração, e na etapa Difusional de Extração (Tabela 4-13 e Tabela 4-14).

Tabela 4-11. Composição química dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos na Etapa de Taxa Constante de Extração em 75 min.

Substâncias	Condições do Processo (% área)					
	Co-solvente Pressão	EtOH (200 bar)	EtOH (300 bar)	Iso-C3 (200 bar)	Iso-C3 (300 bar)	EtOH/ Iso-C3 (300 bar)
Felandreno		tr	-	-	-	-
α -pineno		tr	tr	tr	tr	Tr
1,8-cineol		tr	tr	0,18	tr	Tr
Trans-cariofileno		tr	tr	0,43	0,46	0,48
Ar-curcumeno		2,47	2,19	1,19	1,18	1,29
α -zingibereno		1,59	1,72	2,81	3,13	3,22
β -bisaboleno		tr	tr	0,45	0,43	0,45
β -sesquifelandreno		3,08	2,86	2,38	2,51	2,65
Ar-turmerol		1,15	0,96	0,72	0,72	0,72
isômero do ar-turmerol		1,07	0,92	0,71	0,68	0,72
Ar-turmerona		31,42	27,98	17,30	15,13	15,65
(Z)- γ -atlantona		24,66	25,75	38,38	41,65	40,10
(E)- γ -atlantona		21,88	20,26	18,16	18,34	18,16
Dihidro-Ar-turmerona		tr	tr	0,37	0,37	tr
1-epi-cubenol		tr	0,64	-	0,55	0,56
6S, 7R-bisabolona		1,07	0,91	0,77	0,78	0,79
(Z)- α -atlantona		tr	tr	0,37	tr	0,37
(E)- α -Atlantona		tr	tr	0,29	tr	tr
Total		88,43	84,22	84,54	85,96	85,18

tr=traço, % $\geq 0,18$; n.i.= não identificado

O perfil fitoquímico é semelhante para as etapas da curva global de extração, nos ensaios com CO₂/isopropanol e a mistura CO₂/etanol/isopropanol. Para a *ar-turmerona* a porcentagem relativa foi reduzida e para a (*Z*)- γ -*atlantona* aumentou nas etapas Constante (Tabela 4-11) e Decrescente (Tabela 4-12) de Extração. Na etapa Difusional de Extração (Tabela 4-13 e Tabela 4-14) a (*Z*)- γ -*atlantona* continuou a elevar-se no tratamento com CO₂/isopropanol à 300 bar no período de 350 a 425 min.

Tabela 4-12. Composição química dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos na Etapa de Taxa Decrescente de Extração no período de 150 a 175 min.

Co-solvente Pressão	Condições do Processo (% área)					
	EtOH (200 bar)	EtOH (300 bar)	Iso-C3 (200 bar)	Iso-C3 (300 bar)	EtOH/ Iso-C3 (200 bar)	EtOH/ Iso-C3 (300 bar)
Substâncias						
Felandreno	tr	-	-	-	-	-
α -pineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Trans-cariofileno	tr	tr	0,24	0,31	tr	0,38
Ar-curcumeno	2,05	1,71	0,81	0,95	0,96	1,14
α -zingibereno	tr	2,08	1,87	2,42	2,21	2,74
β -bisaboleno	tr	0,51	0,32	0,38	tr	0,45
β -sesquifelandreno	2,34	2,60	1,66	2,02	1,98	2,36
Ar-turmerol	1,28	0,90	0,80	0,76	0,81	0,75
isômero do ar-turmerol	1,35	0,93	0,91	0,82	0,91	0,76
Ar-turmerona	33,78	23,13	17,23	15,35	16,19	16,04
(<i>Z</i>)- γ -atlantona	18,78	30,79	36,40	39,57	36,20	39,85
(<i>E</i>)- γ -atlantona	20,97	19,62	17,80	18,10	17,75	18,45
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	0,44	0,41	tr	0,38
1-epi-cubenol	tr	0,65	0,67	0,62	0,66	0,58
6S, 7R-bisabolona	1,21	0,92	0,95	0,89	tr	0,84
(<i>Z</i>)- α -atlantona	tr	0,48	0,42	0,40	tr	0,37
(<i>E</i>)- α -Atlantona	tr	tr	0,51	0,49	tr	0,37
Total	81,79	84,35	81,06	83,55	77,70	85,49

tr=traço, % $\geq$ 0,24; n.i.= não identificado

A composição química foi identificada na Etapa Difusional em dois períodos para avaliação da composição em todo o tempo de extração.

Tabela 4-13. Composição química dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos na Etapa de Taxa Difusional de Extração em 225 min .

Co-solvente	Condições do Processo (% área)						
	EtOH Pressão	EtOH (200 bar)	EtOH (300 bar)	Iso-C3 (200 bar)	Iso-C3 (300 bar)	EtOH/ Iso-C3 (200 bar)	EtOH/ Iso-C3 (300 bar)
Substâncias							
Felandreno	tr	-	-	-	-	-	-
α -pineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,26
Ar-curcumeno	tr	1,95	0,60	0,72	0,77	0,77	0,82
α -zingibereno	tr	tr	1,40	1,47	1,59	1,59	1,94
β -bisaboleno	tr	tr	0,25	tr	tr	tr	0,33
β -sesquifelandreno	1,64	2,22	1,27	1,37	1,59	1,59	1,71
Ar-turmerol	tr	1,22	0,76	0,77	0,76	0,76	0,77
isômero do ar-turmerol	1,42	1,29	0,90	0,89	0,86	0,86	0,88
Ar-turmerona	25,77	32,76	14,09	14,76	15,58	15,58	15,00
(Z)- γ -atlantona	25,62	16,62	32,16	35,07	32,14	32,14	34,99
(E)- γ -atlantona	19,58	20,08	15,88	17,15	16,48	16,48	16,88
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	0,43	tr	tr	tr	0,42
1-epi-cubenol	tr	0,82	0,64	0,67	0,63	0,63	0,66
6S, 7R-bisabolona	1,26	1,16	1,05	1,02	0,91	0,91	0,96
(Z)- α -atlantona	tr	tr	0,48	0,46	0,66	0,66	0,44
(E)- α -Atlantona	tr	tr	0,98	0,83	tr	tr	0,72
Total	75,30	78,14	70,91	75,21	71,99	71,99	76,79

tr=traço, % $\geq 0,25$; n.i.= não identificado

Tabela 4-14. Composição química dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos da Etapa de Taxa Difusional de Extração no período de 350 a 425 min .

Co-solvente Pressão	Condições do Processo (% área)					
	EtOH (200 bar)	EtOH (300 bar)	Iso-C3 (200 bar)	Iso-C3 (300 bar)	EtOH/ Iso-C3 (200 bar)	EtOH/ Iso-C3 (300 bar)
Substâncias						
Felandreno	tr	-	-	-	-	-
α -pineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	tr	tr	0,66	tr	0,66	0,52
α -zingibereno	tr	tr	1,79	2,46	1,36	1,19
β -bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
β -sesquifelandreno	tr	tr	1,52	1,99	1,40	1,15
Ar-turmerol	tr	tr	0,66	tr	0,73	0,69
isômero do ar-turmerol	tr	1,29	0,76	tr	0,82	0,82
Ar-turmerona	21,60	23,77	13,14	15,04	15,01	13,08
(Z)- γ -atlantona	27,81	25,79	34,68	41,49	31,77	28,66
(E)- γ -atlantona	18,56	19,10	15,86	18,52	16,23	14,45
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	0,37
1-epi-cubenol	tr	tr	0,59	tr	0,60	0,59
6S, 7R-bisabolona	tr	1,27	0,87	tr	0,86	0,90
(Z)- α -atlantona	tr	tr	0,61	tr	tr	4,99
(E)- α -Atlantona	tr	tr	tr	tr	0,56	1,53
Total	67,98	71,23	71,16	79,51	70,02	68,97

tr=traço, % $\geq 0,3748$; n.i.= não identificado

A Figura 4-5 mostra uma placa de cromatografia em camada delgada comparativa.

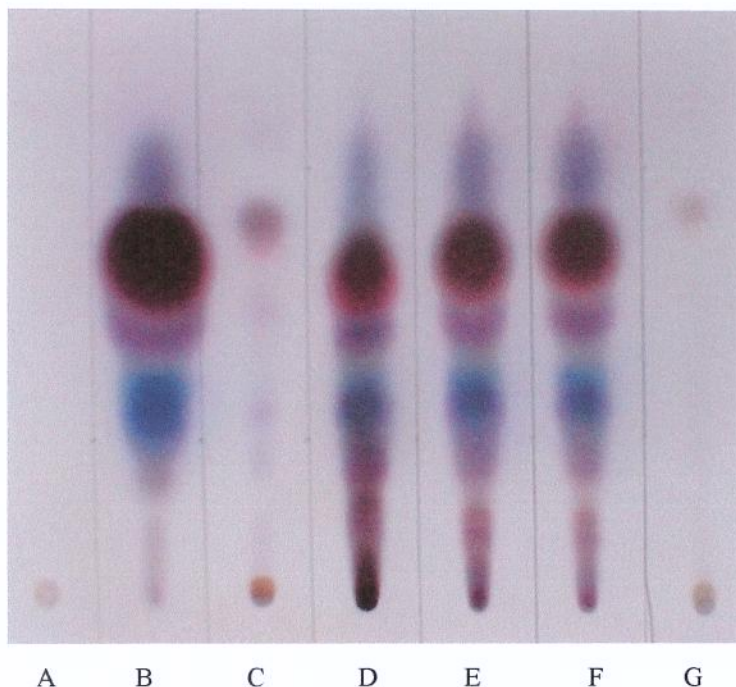


Figura 4-5. CCD realizada com extratos de *C. longa* L. com o padrão de CC (90%) (A), extratos obtidos por Hidrodestilação (B), Soxhlet (C), ESC EtOH (D), ESC CO₂/Iso-C3 (E), ESC CO₂/EtOH/Iso-C3 (F) e Resíduo da ESC CO₂/EtOH (G), com Hexano: Acetato de Etila (8: 2).

A Figura 4-5 permitiu visualizar a presença de compostos polares em maior número quando extraídos com a mistura CO₂/etanol/isopropanol (média de 6,39% em massa). Pode-se verificar uma alteração no perfil fitoquímico das amostras em função da metodologia utilizada na extração. Assim, por Hidrodestilação extraiu-se compostos mais voláteis e não os CC, a extração por Soxhlet extraiu os CC e uma pequena parte do óleo volátil, já a ESC foi capaz de obter tanto a fração leve quanto a fração pesada existente no extrato de cúrcuma e verifica-se que permanece um pequeno teor de CC e óleo essencial no resíduo obtido à partir da ESC de *C. longa* L..

De acordo com cada tratamento, o perfil de concentração dos CC variou, onde verificou-se que existe uma relação entre o tempo de extração do processo em função da massa de CC extraída nos tratamentos, com relação à vazão e contato com o solvente, pois eles aparecem durante o processo com uma tendência de crescimento e decréscimo no final da extração seguido de comportamento semelhante para estes ensaios (Figura 4-6), estes perfis são apresentados no Anexo VII.

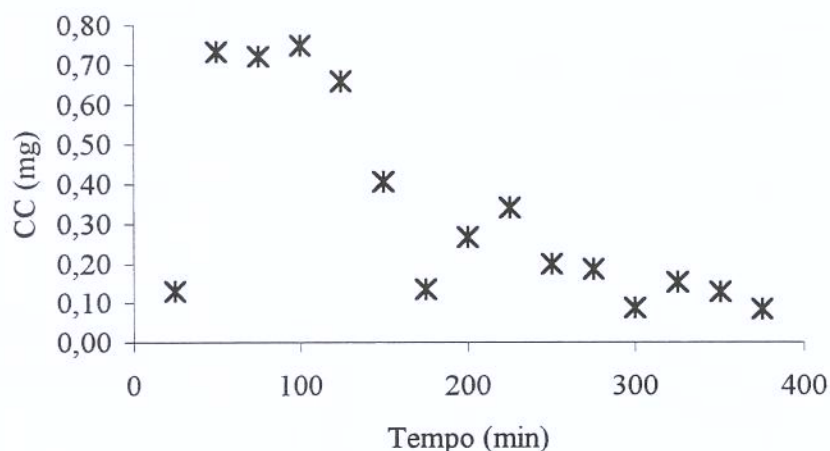
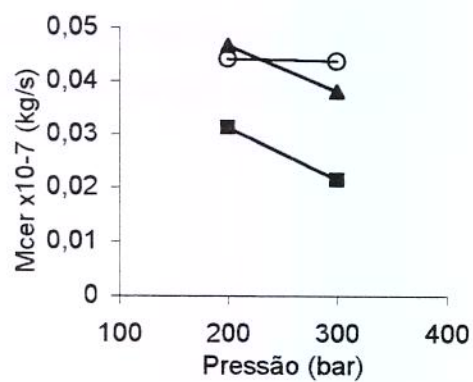


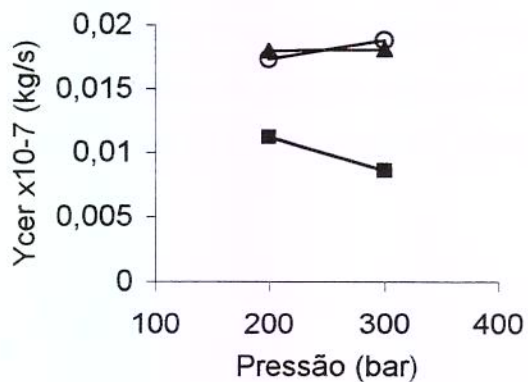
Figura 4-6. Massa de CC (mg) em função do tempo de extração (min) no ensaio com $\text{CO}_2/\text{EtOH}/\text{IsoC}_3$, pressão de 300 bar, temperatura de 303,15 K e vazão total de solvente de $3,54 \times 10^5$ kg/s e porcentagem média de co-solvente de 7,41%.

4.6.2.2.2. Análise Estatística

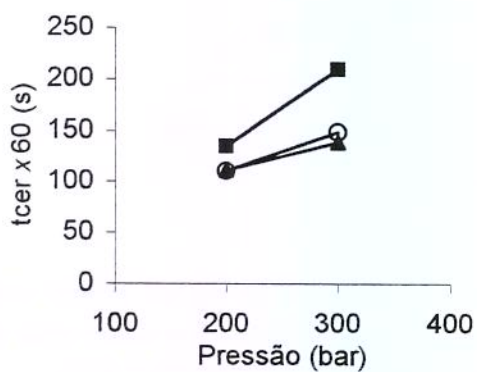
Foi realizada análise descritiva dos dados obtidos nos ensaios pois os mesmos não possuíam graus de liberdade para a realização de uma Análise de Variância. Assim as variáveis foram observadas quanto a sua influência nos parâmetros cinéticos e teor de CC. Na Figura 4-7 são apresentados as influências da pressão e adição de co-solventes nos ensaios.



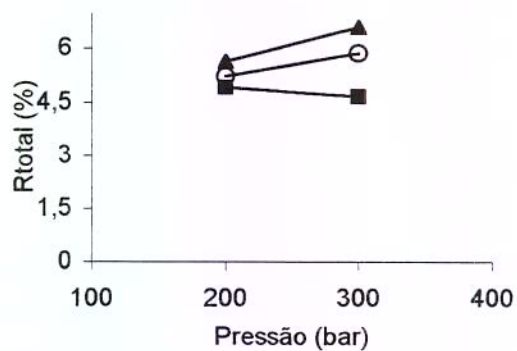
A



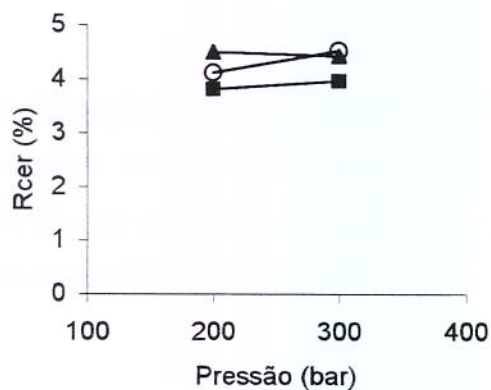
B



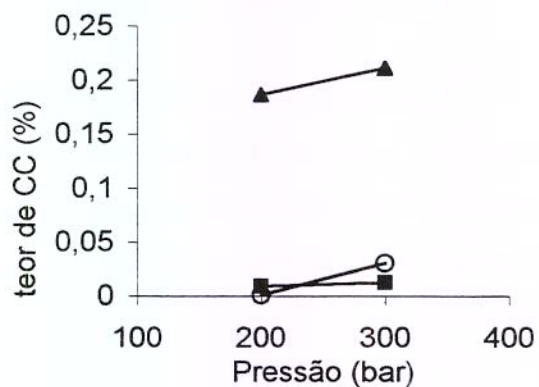
C



D



E



F

Figura 4-7. Influência da pressão e tipo de co-solvente nos parâmetros cinéticos e teor de CC. ■ EtOH ○ Iso-C3 ▲ EtOH/Iso-C3.

A Figura 4-7A mostra a influência da pressão e co-solvente na taxa de transferência de massa, mostrando que à pressão de 300 bar a taxa decresce com a utilização dos co-solventes etanol e a mistura de etanol/isopropanol, mantendo constante para o co-solvente isopropanol. A Figura 4-7B mostra a razão mássica do óleo na saída do extrator, sendo influenciada pela pressão. Quando utilizados os co-solventes isopropanol obteve-se pequeno acréscimo, a mistura de etanol/isopropanol manteve-se constante, decrescendo para o co-solvente etanol. A Figura 4-7C mostra que a duração do período de taxa constante de extração é influenciada pela pressão para todos os co-solventes utilizados, elevando-se com o incremento da pressão. Na Figura 4-7D observa-se que a pressão foi responsável pelo acréscimo do rendimento total num incremento de 100 bar na pressão para o uso de isopropanol e a mistura etanol/isopropanol, já no rendimento para o período CER Figura 4-7E a pressão apresentou efeito somente no ensaio utilizando o co-solvente isopropanol, para os outros ensaios o R_{CER} se manteve constante. A massa de CC foi afetada tanto pela pressão como pelo co-solvente, verificando na Figura 4-7F que o teor de CC obteve um considerável acréscimo, quando utilizado a mistura de co-solvente etanol/isopropanol a 300 bar.

Conclui-se então, a partir deste primeiro grupo de ensaios que o melhor tratamento foi no ensaio nas condições de 300 bar, vazão de $3,54 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$, 303,15K e utilização do co-solvente etanol/isopropanol à percentagem média de 6,39% (em massa), Braga *et al* (2001b).

4.6.2.3 Segundo Grupo de Ensaio

Baseado na conclusão dos resultados para o primeiro grupo de ensaios, no segundo grupo de ensaios foram mantidos fixos a temperatura (303,15K), a pressão (300 bar) e o tipo de co-solvente etanol/isopropanol, utilizando o lote S1 de matéria-prima, variando a vazão total do solvente e a percentagem do co-solvente.

Para a escolha da percentagem do co-solvente, verificou-se que é possível aumentar a percentagem do mesmo para as condições do equipamento até 16% em massa, contanto

que se mantenha resfriado o frasco coletor para condensação do extrato, os dados utilizados como base desta conclusão, encontram-se no Anexo VIII.

A Figura 4-8 compara o rendimento obtido nas diversas condições do processo para o segundo grupo de ensaios, utilizando como co-solvente etanol/ isopropanol, 300 bar e 303,15 K, com variação de vazões e percentagem de co-solvente em massa

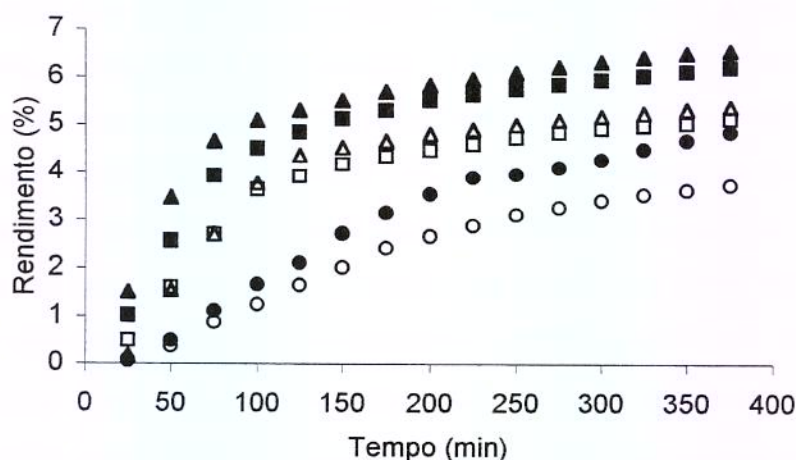


Figura 4-8. ESC de oleoresina e óleo essencial de *C. longa* L. ▲ $3,81 \times 10^{-5}$ kg/s e 13,78%
 △ $4,04 \times 10^{-5}$ kg/s e 6,95% ■ $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s e 13,59% □ $1,97 \times 10^{-5}$ kg/s e 6,66%
 ● $0,82 \times 10^{-5}$ kg/s e 16,11% ○ $0,79 \times 10^{-5}$ kg/s e 8,32%

Os maiores rendimentos no segundo grupo de extrações foram obtidos nos ensaios à vazão total de $3,81 \times 10^{-5}$ kg/s (13,78% de co-solvente) e $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s (13,59% de co-solvente) respectivamente (Figura 4-8).

A Tabela 4-15 mostra os parâmetros cinéticos (M_{CER} , Y_{CER} e T_{CER}), rendimentos (R_{CER} e R_{TOTAL}) e teor de CC obtidos para o segundo grupo de ensaios, utilizando temperatura e pressão constante, 303,15 K e 300 bar.

Tabela 4-15. Parâmetros cinéticos e teor de CC dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos por ESC, com variáveis de processo: vazão e porcentagem de co-solvente.

Tratamento	$M_{CER} \times 10^{-7}$ (kg/s)	$Y_{CER} \times 10^{-7}$ (kg/s)	$t_{CER}/60$ (s)	R_{CER} (%)	R_{Total} (%)	CC(%)
$3,81 \times 10^{-5}$ kg/s (13,78%)	11,80	5,58	80,54	4,75	7,08	0,8842
$4,04 \times 10^{-5}$ kg/s (6,95%)	8,72	3,71	111,90	4,05	5,81	0,7241
$1,93 \times 10^{-5}$ kg/s (13,59%)	11,00	10,20	88,42	4,23	6,60	1,8131
$1,97 \times 10^{-5}$ kg/s (6,66%)	7,62	6,69	107,75	3,71	5,54	0,2575
$0,82 \times 10^{-5}$ kg/s (16,11%)	3,70	8,55	200,07	3,54	5,28	0,6218
$0,79 \times 10^{-5}$ kg/s (8,32%)	3,02	6,58	192,10	2,58	4,14	0,1206

Nos ensaios realizados utilizando o lote S1, observou-se o melhor tratamento para o teor de CC a 13,59% de co-solvente na vazão total de solvente de $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s, seguido do tratamento com 13,78% de co-solvente à vazão de $3,81 \times 10^{-5}$ kg/s. Este último ensaio obteve o melhor M_{CER} e Y_{CER} para um menor t_{CER} , o rendimento deste ensaio é visualizado na Tabela 4-15. O segundo melhor ensaio para estes parâmetros foi à vazão total de solvente de $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s com 13,59% de co-solvente.

Em relação à utilização do co-solvente etanol/isopropanol à maiores porcentagens, observou-se uma maior extração para os CC e também para o rendimento do extrato tanto para o R_{CER} quanto para o R_{TOTAL} . Verificando que essa diferença de massa de CC obtida entre as porcentagens numa mesma vazão aumenta quando a vazão é menor, ou seja, na vazão média de $3,92 \times 10^{-5}$ kg/s a diferença entre 16,85 e 6,19% de co-solvente é de aproximadamente de 35%, na vazão média de $1,95 \times 10^{-5}$ kg/s aumenta essa diferença para 89% e para $0,8 \times 10^{-5}$ kg/s aumenta para 91%. Esta diferença pode ser ocasionada pelo contato do solvente com a matriz que ocorre numa menor velocidade a baixas vazões, com maior contato com altas porcentagens de co-solvente.

A Figura 4-9 também compara os dados experimentais da curva global de extração com o “spline” obtido pelo software SAS 16.2 para ajuste das curvas de extração. O ajuste foi bom para descrever os dados do segundo grupo de ensaios, assim os efeitos do co-solvente e vazão podem ser avaliados utilizando os parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 4-15.

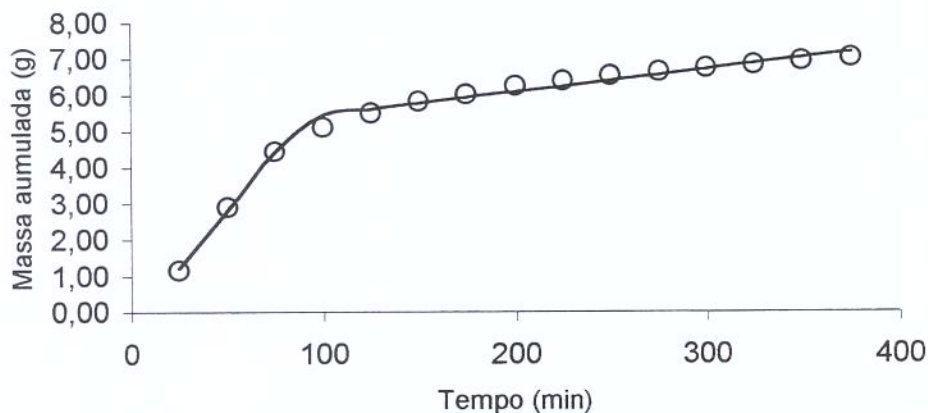


Figura 4-9. Curva global de extração para o ensaio utilizando como co-solvente etanol/ isopropanol (13,59% em massa), pressão de 300 bar, temperatura de 303,15 K, vazão total de solvente $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s. o experimental ; — predito

A variação da porcentagem de co-solvente influenciando a extração de CC pode ser observada na coloração dos extratos, onde a baixa porcentagem de co-solvente o extrato se mantém numa coloração amarela, e a alta porcentagem de co-solvente o extrato possui uma coloração alaranjada devido à alta concentração de CC (Figura 4-10).



Figura 4-10. Extratos obtidos nas mesmas condições operacionais com baixa e alta porcentagem de co-solvente respectivamente.

Com os dados obtidos neste segundo grupo de ensaios, pode-se observar a tendência dos pontos experimentais para Y_{cer} em função da vazão (Tabela 4-12).

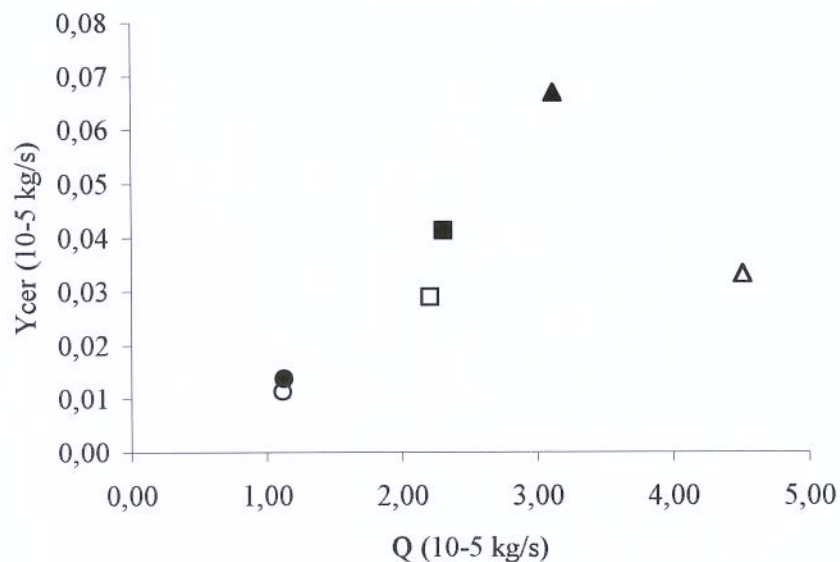


Figura 4-11. Dados de razão mássica do óleo de *C. longa* L. na fase fluida na saída do extrator em função da vazão a 300 bar e 303,15 K. ▲ $3,12 \times 10^{-5}$ kg/s e 13,78%
 △ $4,51 \times 10^{-5}$ kg/s e 6,95% ■ $2,31 \times 10^{-5}$ kg/s e 13,59% □ $2,21 \times 10^{-5}$ kg/s e 6,66%
 ● $1,13 \times 10^{-5}$ kg/s e 16,11% ○ $1,12 \times 10^{-5}$ kg/s e 8,32%

Através da Figura 4-11 observa-se que à altas vazões de co-solvente pode-se obter maior solubilidade dos compostos presentes na matéria-prima. Assim, existe uma tendência em aumentar a solubilidade destes compostos com altas vazões e altas porcentagens de co-solvente.

4.6.2.3.1 Composição Química dos Extratos

A Tabela 4-16 mostra a composição do óleo essencial obtido por Hidrodestilação da matéria-prima do lote S1.

Tabela 4-16. Composição química do óleo essencial de *C. longa* por Hidrodestilação do lote S1.

Substâncias	Hidrodestilação (% área)
Felandreno	n.i.
α -pineno	tr
1,8-cineol	0,91
Trans-cariofileno	tr
Ar-curcumeno	1,13
α -zingibereno	2,12
β -bisabolenol	tr
β -sesquifelandreno	2,03
Ar-turmerol	1,38
isômero do ar-turmerol	tr
Ar-turmerona	20,94
(Z)- γ -atlantona	44,83
(E)- γ -atlantona	20,86
Dihidro-Ar-turmerona	tr
1-epi-cubenol	tr
6S, 7R-bisabolona	tr
(Z)- α -atlantona	0,92
(E)- α -Atlantona	tr
Total	95,13

tr=traço, % $\geq 0,91$; n.i.= não identificado

A Figura 4-12 mostra o cromatograma de uma amostra obtida da curva global de extração indicando as principais substâncias encontradas no extrato de *Curcuma longa* L.

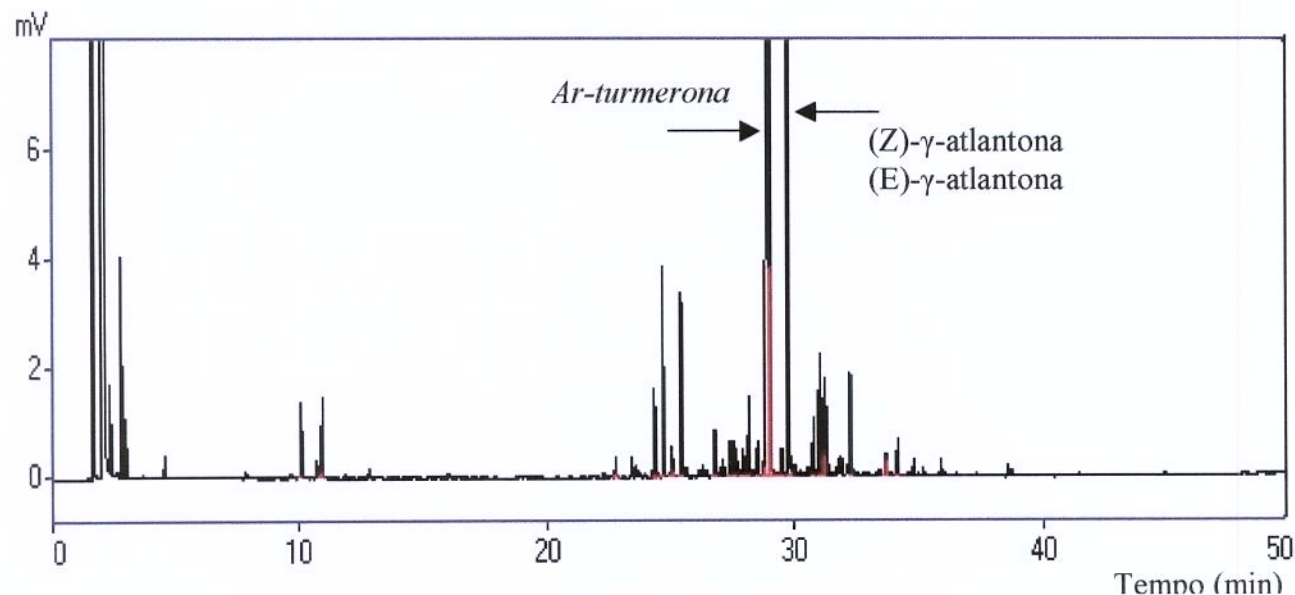


Figura 4-12. Cromatograma do extrato obtido à vazão de $1,12 \times 10^{-5}$ kg/s de CO_2 + EtOH+Iso-C3 e 300 bar, 8,32 % de co-solvente por CG-DIC.

A composição química foi semelhante para todos os tratamentos, independentemente da vazão utilizada para o segundo grupo de ensaios, havendo apenas uma pequena redução na porcentagem relativa quando era reduzida a porcentagem do co-solvente (Tabela 4-17).

Tabela 4-17. Composição química média dos extratos de *Curcuma longa* L.

	Condições de processo (% área)					
Vazão total Co-solvente	3,81x10 ⁻⁵ kg/s 13,78%	4,04x10 ⁻⁵ kg/s 6,95%	1,93x10 ⁻⁵ kg/s 13,59%	1,97x10 ⁻⁵ kg/s 6,66%	0,82x10 ⁻⁵ kg/s 16,11%	0,79x10 ⁻⁵ kg/s 8,32%
Substâncias						
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α-pineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	0,91	tr	tr	tr	tr	tr
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	1,04	1,09	1,01	0,91	0,99	1,02
α-zingibereno	2,11	1,88	2,22	2,04	2,25	2,34
β-bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
β-sesquifelandreno	2,01	1,82	1,97	1,93	2,12	2,19
Ar-turmerol	1,21	1,00	tr	1,03	1,00	0,99
isômero do ar-turmerol	tr	tr	tr	0,68	tr	tr
Ar-turmerona	20,17	18,25	19,32	17,703	17,91	17,68
(Z)-γ-atlantona	44,50	41,53	44,16	41,52	42,59	42,95
(E)-γ-atlantona	22,13	20,97	22,13	20,68	21,02	21,02
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
65, 7R-bisabolona	1,04	1,07	1,07	1,09	1,03	0,98
(Z)-α-atlantona	0,92	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-α-Atlantona	1,47	tr	tr	0,64	tr	tr
total	91,10	87,62	91,88	88,23	88,93	89,19

Tr=traço, % $\geq 0,63$; n.i.= não identificado

Na etapa Constante de Extração (Tabela 4-18) a porcentagem relativa de *Ar-turmerona* se mantém praticamente constante como a *(Z)-γ-atlantona* e *(E)-γ-atlantona*, sendo reduzida a *(Z)-γ-atlantona* na etapa Decrescente (Tabela 4-19) em alguns casos em relação a etapa Constante, mas a *Ar-turmerona* e *(Z)-γ-atlantona* obtiveram um bom acréscimo quando o co-solvente estava em concentração próxima a 13% na etapa Difusional (Tabela 4-20) em relação a etapa anterior (Decrescente), para as três substâncias em baixa porcentagem de co-solvente.

Tabela 4-18. Composição química dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos na Etapa de Taxa Constante de Extração em 75 min .

	Condições de processo (% área)					
Vazão total	3,81x10 ⁻⁵ kg/s	4,04x10 ⁻⁵ kg/s	1,93x10 ⁻⁵ kg/s	1,97x10 ⁻⁵ kg/s	0,82x10 ⁻⁵ kg/s	0,79x10 ⁻⁵ kg/s
Co-solvente	13,78%	6,95%	13,59%	6,66%	16,11%	8,32%
Substâncias						
Felandreno	-	-	-	-	-	-
α-pineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	0,94	1,09	1,01	1,10	1,09	1,09
α-zingibereno	2,21	2,54	2,36	2,58	2,51	2,54
β-bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
β-sesquifelandreno	2,06	2,35	tr	2,39	2,35	2,37
Ar-turmerol	1,04	0,94	tr	0,96	0,94	0,95
isômero do ar-turmerol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-turmerona	17,96	17,60	17,78	17,61	17,64	18,03
(Z)-γ-atlantona	43,29	43,93	43,66	44,40	43,51	44,84
(E)-γ-atlantona	21,19	21,22	21,25	21,35	21,13	21,72
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
6S, 7R-bisabolona	1,04	0,94	0,99	0,92	0,94	0,95
(Z)-α-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-α-Atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
total	89,75	90,63	87,06	91,33	90,12	92,48

tr=traço, % ≥ 0,92; n.i.= não identificado

Tabela 4-19. Composição química dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos na Etapa de Taxa Decrescente de Extração em 175 min .

	Condições de processo (% área)					
Vazão total	3,81x10 ⁻⁵ kg/s	4,04x10 ⁻⁵ kg/s	1,93x10 ⁻⁵ kg/s	1,97x10 ⁻⁵ kg/s	0,82x10 ⁻⁵ kg/s	0,79x10 ⁻⁵ kg/s
Co-solvente	13,78%	6,95%	13,59%	6,66%	16,11%	8,32%
<u>Substâncias</u>						
Felandreno	-	-	-	-	-	-
α-pineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	tr	tr	tr	0,73	1,07	1,08
α-zingibereno	1,98	1,56	2,08	1,69	2,46	2,48
β-bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
β-sesquifelandreno	1,95	1,53	1,97	1,60	2,29	2,34
Ar-turmerol	tr	1,05	tr	1,09	0,99	0,97
isômero do ar-turmerol	tr	tr	tr	0,68	tr	tr
Ar-turmerona	19,45	17,68	18,15	17,14	17,83	17,57
(Z)-γ-atlantona	42,35	39,17	41,54	39,85	43,66	43,26
(E)-γ-atlantona	21,73	20,04	20,84	20,02	21,27	21,02
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
6S, 7R-bisabolona	tr	1,21	1,16	1,18	0,96	0,93
(Z)-α-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-α-Atlantona	1,47	tr	tr	0,64	tr	tr
total	88,94	82,27	85,75	84,62	90,56	89,63

tr=traço, % $\geq 0,63$; n.i.= não identificado

Tabela 4-20. Composição química dos extratos de *Curcuma longa* L. obtidos na Etapa de Taxa Difusional de Extração em 300 min do segundo grupo de ensaios.

	Condições de processo (% área)					
Vazão total	3,81x10 ⁻⁵ kg/s	4,04x10 ⁻⁵ kg/s	1,93x10 ⁻⁵ kg/s	1,97x10 ⁻⁵ kg/s	0,82x10 ⁻⁵ kg/s	0,79x10 ⁻⁵ kg/s
Co-solvente	13,78%	6,95%	13,59%	6,66%	16,11%	8,32%
Substâncias						
Felandreno	-	-	-	-	-	-
α-pineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	tr	tr	tr	tr	0,87	0,89
α-zingibereno	tr	1,55	tr	1,84	1,91	1,99
β-bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr	tr
β-sesquifelandreno	tr	1,57	tr	1,78	1,84	1,89
Ar-turmerol	tr	tr	tr	tr	1,04	1,07
isômero do ar-turmerol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-turmerona	22,34	19,47	22,01	18,35	18,08	17,49
(Z)-γ-atlantona	47,53	41,48	47,28	40,32	40,78	40,67
(E)-γ-atlantona	24,74	21,65	24,29	20,69	20,62	20,30
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr	tr
6S, 7R-bisabolona	tr	tr	tr	1,19	1,12	1,09
(Z)-α-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-α-Atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
total	94,61	85,71	93,58	84,18	86,27	85,42

tr=traço, % $\geq 0,87$; n.i.= não identificado

A composição química das frações obtidas durante a curva de extração e do óleo essencial retido no adsorvente, encontra-se no Anexo VI.

A utilização de cromatografia em camada delgada comparativa permitiu visualizar a presença de compostos polares semelhantes dos tratamentos com variação de porcentagem de co-solvente, estando apenas mais concentrado no extrato obtido a maior porcentagem de co-solvente (Figura 4-13).

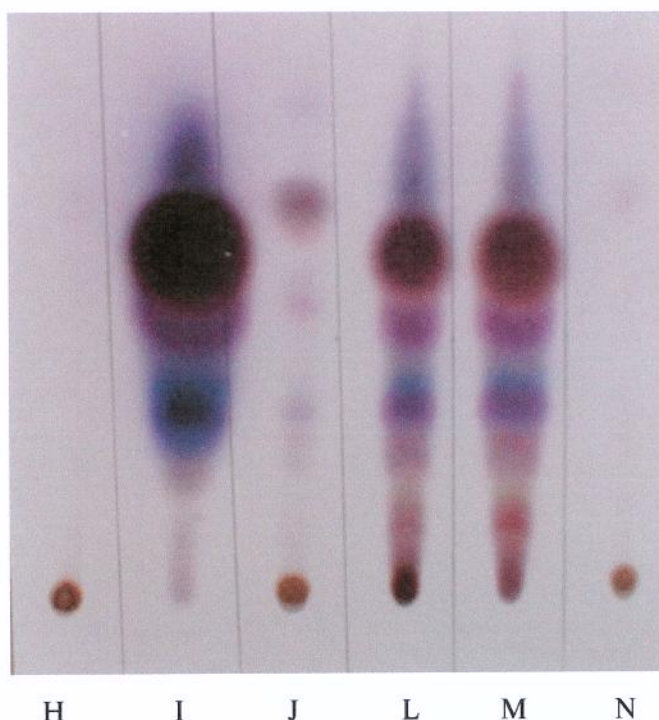


Figura 4-13. CCD realizada com o padrão de CC (90%) (H), extratos de *C. longa* L. obtidos por Hidrodestilação (I), Soxhlet (J), ESC $\text{CO}_2/\text{EtOH}/\text{Iso-C3}/13,59\%$ (L) e ESC $\text{CO}_2/\text{EtOH}/\text{Iso-C3}/6,66\%$ (M) e Resíduo da ESC à 13,59% (N), com Hexano: Acetato de Etila (8: 2).

Verificou-se que o perfil de concentração dos CC se comporta de forma diferenciada em função da vazão. A baixas vazões observa-se que a concentração de CC aumenta com tempo de extração (Figura 4-14).

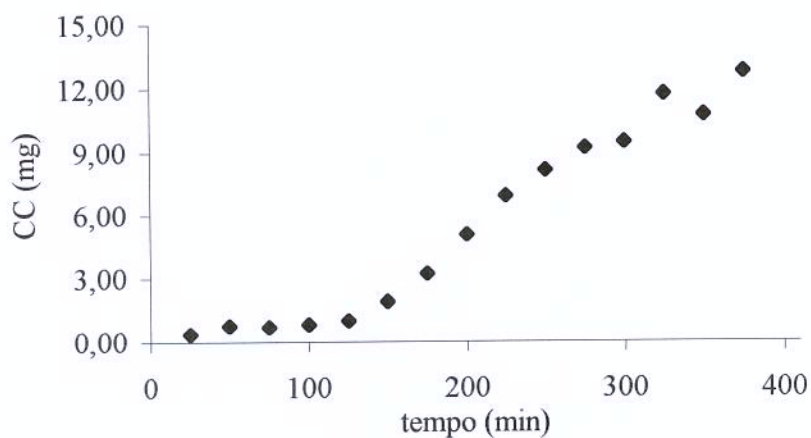


Figura 4-14. Perfil de concentração de CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (13,59% em massa), vazão de $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

4.6.2.3.2 Análise Estatística

Foram observadas a influência das variáveis do processo, apresentados na Figura 4-15, mostrando a influência da vazão e porcentagem de co-solventes sobre os parâmetros cinéticos, rendimento total e teor de CC.

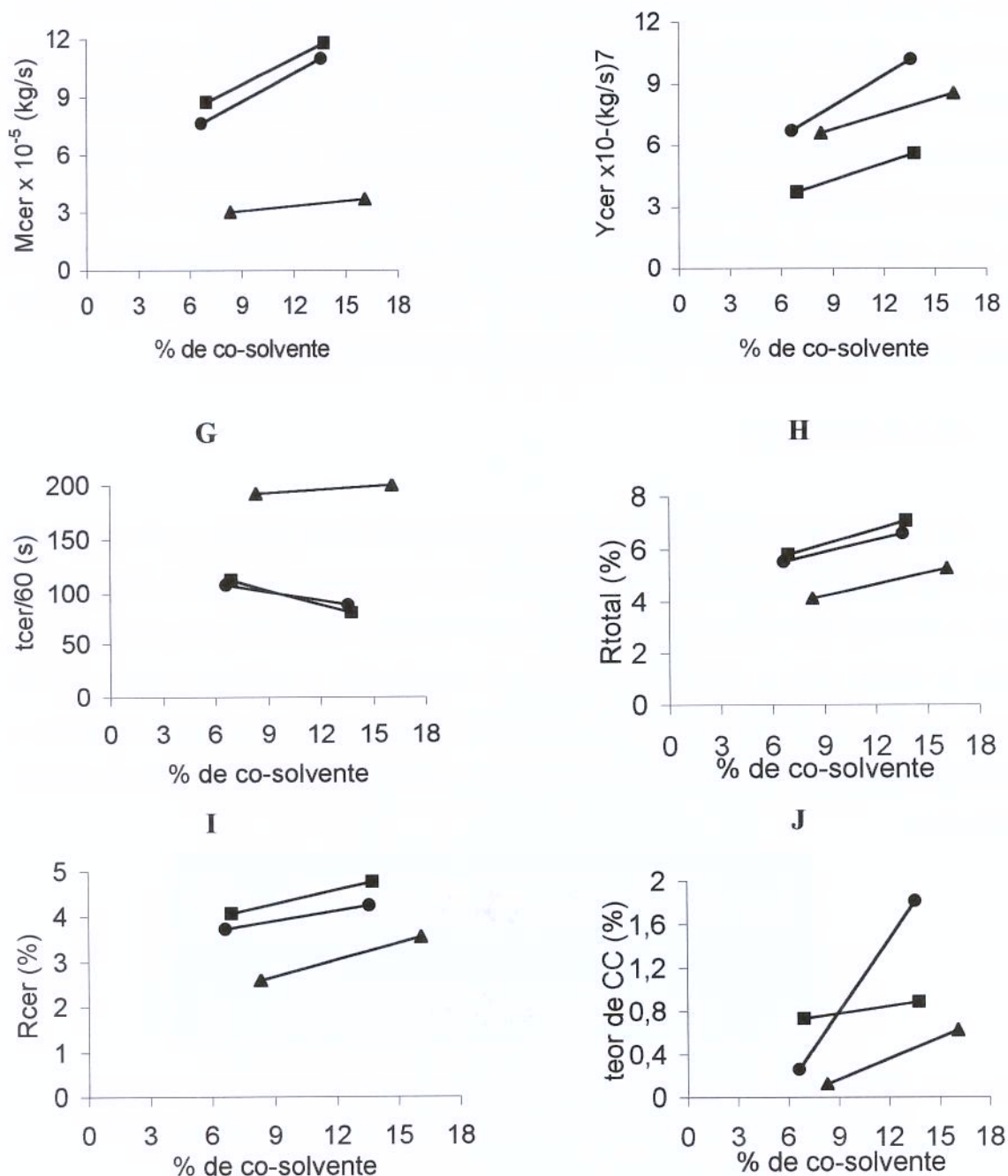


Figura 4-15. Influência da vazão e porcentagem de co-solvente nos parâmetros cinéticos e teor de CC. ■ $4,04 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$ e 6,95% □ $3,81 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$ e 13,78% ● $1,93 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$ e 13,59% ○ $1,97 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$ e 6,66% ▲ $0,82 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$ e 16,11% △ $0,79 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$ e 8,32%.

A Figura 4-15G mostra a influência da pressão e co-solvente na taxa de transferência de massa, mostrando que a pressão de 300 bar a taxa aumenta com o aumento da porcentagem do co-solvente nas altas vazões de solvente, isto também ocorre na Figura 4-15H mostrando a razão mássica do óleo na saída do extrator sendo influenciada pela porcentagem de co-solvente nas vazões mais altas. A Figura 4-15I mostra que a duração do período de taxa constante de extração é influenciada nas altas vazões, sendo reduzido com o incremento da porcentagem de co-solvente para as vazões mais altas. Na Figura 4-15J observa-se que para todas as vazões a porcentagem de co-solvente influenciou o rendimento aumentando-o, na Figura 4-15L a porcentagem de co-solvente mais alta apresentou efeito positivo no R_{CER} em todas as vazões utilizadas. O teor de CC foi afetado tanto pela vazão como pelo co-solvente, verificando na Figura 4-15M que a porcentagem influenciou principalmente na vazão de $1,97 \times 10^{-5}$ kg/s no acréscimo do teor de CC, mas também foi obtido efeito de acréscimo nas outras vazões utilizadas.

4.6.2.4. Adsorvente

As colunas empacotadas com adsorvente Porapak foram eluídas com acetato de etila e o extrato diluído foi analisado igualmente aos outros em CG-DIC. A Figura 4-16 mostra as colunas saturadas de óleo essencial e co-solvente, mostrando que para todos os ensaios à vazões altas e altas porcentagens de co-solvente, o solvente arrasta o óleo essencial numa velocidade muito alta saturando rapidamente as colunas, exigindo o resfriamento dos frascos coletores afim de condensar o extrato para que estes não se percam volatilizados.



Figura 4-16. Adsorvente do tipo Porapak Q utilizado na saída do sistema de ESC para EtOH/IsoC3 à alta e baixa porcentagem de co-solvente, respectivamente.

4.7 Propriedades Funcionais dos Extratos

4.7.1 Atividade Antioxidante

O perfil de Atividade Antioxidante foi seguido conforme metodologia, e apresentado no gráfico abaixo de forma comparativa entre os tratamentos em função do tempo de reação.

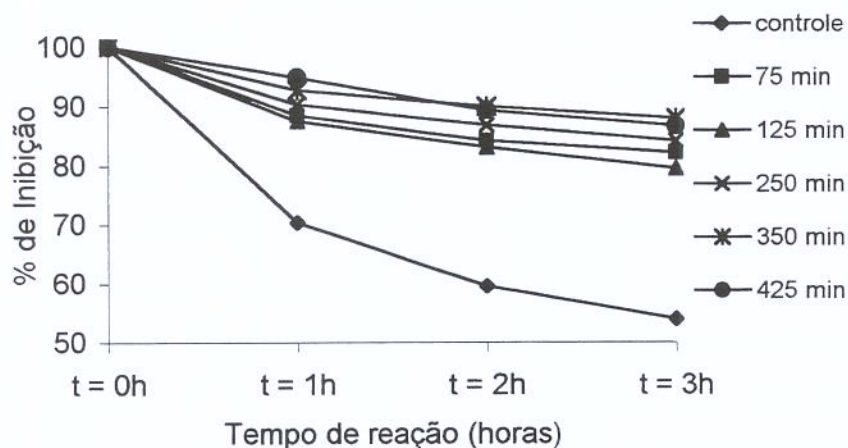


Figura 4-17. Perfil da Ação antioxidante dos extratos de *Curcuma longa* L., avaliando a atividade antioxidante durante a extração no ensaio com CO₂/etanol (7,41%), 300 bar, temperatura 303,15 K e vazão total de solvente de $3,54 \times 10^5$ kg/s, do primeiro grupo de ensaios.

Em relação à atividade antioxidante (Figura 4-17) pode-se observar que no período até 2h, todos os extratos se mantiveram na faixa de 85-95% de inibição e em 3h na faixa de 80-90% de inibição. Os extratos obtidos no final da extração com maior concentração de CC obtiveram maior porcentagem de inibição durante todo o período de análise da atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos extratos independe do tempo de extração da oleoresina, significando que a composição não afeta o poder antioxidante do extrato de cúrcuma. A ação antioxidante dos extratos não varia consideravelmente com as condições de operação, significando que não é a quantidade de certas substâncias que dará ou não a atividade antioxidante dos extratos, mas até certo ponto sua presença no extrato, Braga *et al*, (2001). Os gráficos de ação antioxidante dos ensaios encontram-se em Anexo IX.

4.7.2 Atividade Antibacteriana

Foi realizado o teste MABA para atividade antibacteriana em linhagens causadoras de tuberculose (Tabela 4-21) afim de verificar ação bacteriostática e bactericida. Foram utilizados extratos brutos que continham tanto óleo essencial quanto a oleoresina.

Tabela 4-21. Determinação da Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos de *Curcuma longa* L. frente às micobactérias.

Ensaio	MICOBACTÉRIAS – MIC em $\mu\text{g/mL}$			
	Ra	Rv	Ma	Mk
EtOH/Iso-C3 (5%)/200 bar	>256,0	>256,0	>256,0	>256,0
EtOH/Iso-C3 (5%)/300bar	>256,0	>256,0	>256,0	>256,0
Iso-C3 (5%)/200 bar	>256,0	>256,0	>256,0	>256,0
Iso-C3 (5%)/300 bar	>256,0	>256,0	>256,0	>256,0
EtOH/Iso (5%)-C3/200bar	>256,0	>256,0	>256,0	>256,0
EtOH/Iso (5%)-C3/300bar	>256,0	>256,0	>256,0	>256,0

Ra – *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

RV – *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Ma – *Mycobacterium avium*

Mk – *Mycobacterium kansasii*

A Tabela 4-21 mostra que a 256 $\mu\text{g/mL}$ de extrato não houve inibição do crescimento das micobactérias selecionadas para o teste. Segundo a literatura esta concentração encontra-se em valores maiores de concentração de extrato de cúrcuma para inibição de bactérias (MIC 1600- Allievi, 1984)

4.7.3 Atividade Antiproliferativa

Foi realizada a avaliação em extratos *C. longa* L. obtidos na melhor condição do primeiro grupo de ensaios (etanol/isopropanol, 200 e 300 bar, nos tempos de extração de 75 e 125 min, respectivamente). Nestes ensaios também foram utilizados extratos brutos que continham, tanto óleo essencial quanto a oleoresina extraídos pelo processo. Esta amostra pode ser identificada na Figura 4-5 com a fração F.

As linhagens utilizadas no ensaio de avaliação de atividade antiproliferativa encontram-se na Tabela 4-22.

Tabela 4-22 Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de avaliação de atividade antiproliferativa.

Tipo celular	Nome
Pulmão	NCI-460
Mama	MCF 7
Mama	NCI-ADR *
Melanoma	UACC-62
Ovário	OVCAR-03
Cólon	HT-29
Prostata	PC-03
Renal	786-0
Leucemia	K-562

* linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

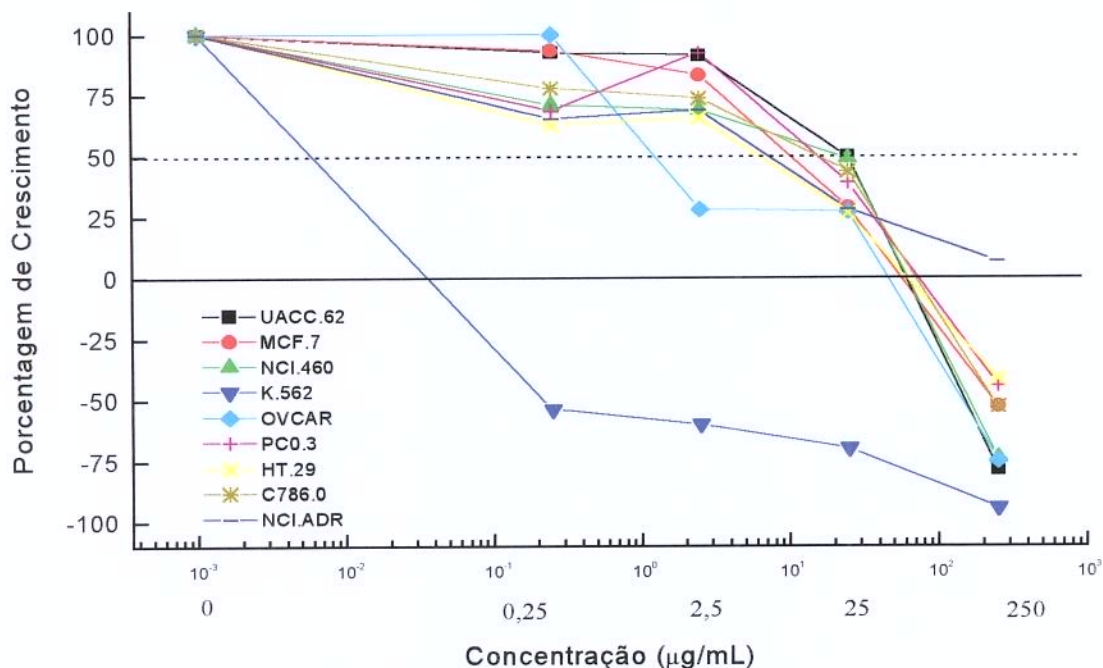


Figura 4-18. Atividade antiproliferativa do extrato de *Curcuma longa* L. para o ensaio CO₂/etanol/isopropanol, 300bar, vazão 3,54x10⁻⁵kg/s, 7,41% de co-solvente, coleta de 75 min.

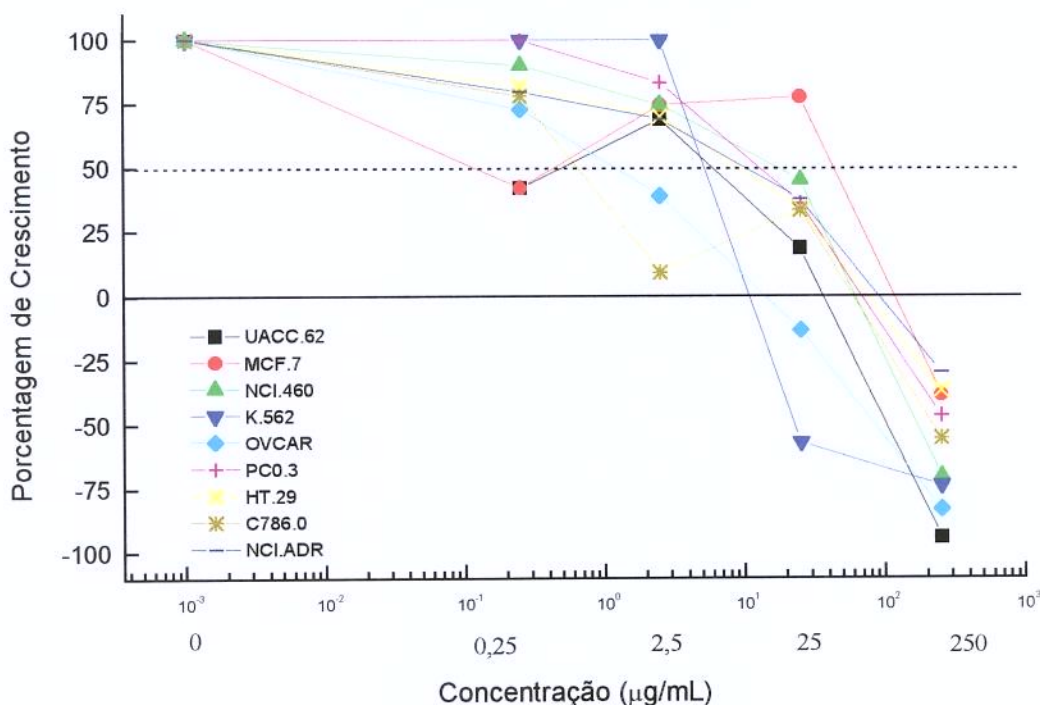


Figura 4-19. Atividade antiproliferativa do extrato de *Curcuma longa* L. para o ensaio CO₂/etanol/isopropanol, 300bar, vazão 3,54x10⁻⁵kg/s, 7,41% de co-solvente, coleta de 125 min.

A Figura 4-18 mostra a atividade antiproliferativa obtida a partir de 0,25 μg/mL de extrato de *Curcuma longa* L. com efeito citostático e citocida (exceto para NCI ADR), com concentração dependente e seletividade celular para a leucemia. Para a linhagem K.562 muito sensível à drogas, obteve-se um efeito citocida com a menor dose aplicada e a linhagem NCI ADR obteve apenas uma inibição do crescimento celular. Na Figura 4-19 observa um comportamento semelhante, porém todas as linhagens obtiveram efeito citostático e citocida.

A Atividade Antiproliferativa foi obtida para os dois extratos avaliados em função do tempo de extração, evidenciando que a composição independe da atividade, mas não se pode relacionar a qual substância presente no extrato influenciou a atividade antiproliferativa, embora dados da literatura atribua esta à curcumina.

Capítulo 5. Conclusões e Sugestões



Curcuma longa L. em pó.

5. Conclusões

A adubação no cultivo da matéria-prima favorece o rendimento de óleo essencial, mas não o teor de CC. Este fato pode ser observado nos tratamentos que utilizaram dosagens diferenciadas de nitrogênio nos ensaios preliminares. Assim a matéria-prima cultivada com adubação rica em nitrogênio favorece o rendimento do óleo essencial.

Constatou-se que a mudança de matéria-prima em relação à origem tem forte influência quanto ao teor de CC revelado pelos tratamentos preliminares com extração por soxhlet, e ESC com etanol/isopropanol à 300 bar, temperatura de 303,15K e tempo de extração de 375 min, vazão de $3,54 \times 10^{-5}$ kg/s e $4,51 \times 10^{-5}$ kg/s com matéria-prima de MG e SP.

Do primeiro grupo de ensaios, o melhor tratamento foi obtido com co-solvente etanol/isopropanol à 300 bar, quando se obteve maior teor de CC (0,18%) durante o período de 375 min.

Para o segundo grupo de ensaios em relação ao rendimento em massa de CC, na extração supercrítica com co-solvente etanol/isopropanol obteve na porcentagem de 13,59% em co-solvente com vazão de $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s altos valores de CC (1,81%), mas os maiores valores de R_{Total} , R_{CER} , Y_{CER} e menor t_{CER} foram obtidos na vazão de $3,81 \times 10^{-5}$ kg/s com 13,78 % de co-solvente.

Assim, constatou-se que o melhor solvente para a obtenção de extratos de *Curcuma longa* L. foi a mistura de etanol e isopropanol (1:1) na extração com dióxido de carbono à 90% (massa), a vazão que proporcionou maior rendimento foi de $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s.

Observou-se a diferença dos extratos obtidos a partir das diferentes metodologias: a extração com solvente orgânico em aparelho soxhlet extraiu a oleoresina (fração pesada do óleo) da cúrcuma, a Hidrodestilação extraiu o óleo essencial (fração leve do óleo) e a ESC extraiu ambas as frações do óleo de *Curcuma longa* L., porém em menor quantidade. Se a obtenção das duas frações forem importantes, a ESC torna-se mais viável.

Em relação ao resíduo do processo da ESC, este mantém traços de CC que lhe confere o flavor e a cor característica da espécie, podendo ser reutilizado na obtenção de amido com características especiais.

Através da comprovação das atividades funcionais dos extratos, conclui-se que o extrato bruto de *Curcuma longa* L. apresenta atividade antioxidante, e esta independe da concentração dos CC mas sim da presença deles. O extrato possui atividade antiproliferativa para nove linhagens de células cancerosas, com concentração dependente para efeito citostático e citocida.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Caracterização da matéria-prima quanto à presença de pesticidas, agrotóxicos e metais pesados, afim de caracterizá-la na produção de fitoterápicos.

Estudo granulométrico para esta matéria-prima (*C. longa* L.) de acordo com recomendações para droga vegetal.

Repetição dos ensaios a fim de estabelecer uma reprodutibilidade dos dados nas condições utilizadas.

Realização de extrações mantendo um período estático no sistema após pressurização, a fim de que o solvente em contato com a matéria-prima proporcione maior solubilização das substâncias a serem extraídas.

Aumento da temperatura de extração se o objetivo for obter somente os curcuminóides, visto que a extração por solvente orgânico em soxhlet obtém maior rendimento de CC em temperaturas aproximadas a 80 °C.

Caracterização dos CC por CLAE na validação do método de quantificação de CC utilizado, concordando com recomendações literárias no uso de CG para caracterização dos voláteis e CLAE para a fração pesada (CC).

Estudo de solubilidade na região de tendência indicada pela vazão igual ou acima de $4,04 \times 10^{-5}$ kg/s utilizando etanol/isopropanol, 300bar e porcentagens de co-solvente maiores e/ou igual a 16% (em massa).

Identificação dos principais ativos responsáveis pela atividade antiproliferativa e antioxidante.

Capítulo 6. Referências



Curcuma longa L.: rizomas, sementes, fatias e pó.

6. Referências Bibliográficas

- ABREU MATOS, F. J. **Farmácias Vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 2 ed. Fortaleza: EUFC. 1994. 180p.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 1st Ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, p. 468, 1995.
- AHSAN, H; PARVEEN, N; KHAN, N.U; HADI, S.M. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Chemico-Biological Interactions**. V. 121, n. 2,p. 161-175, 1999.
- ALLIEVI, L.; GUALANDRIS, R. Ricerca sull'attività antimicrobica dell'estratto di Ocurcuma (Turmeric). **Industrie Alimentari** (Italy). v.23, n. 11, p. 867-870, 1984.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists**. St. Paul, 1975.
- AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS (ASAE). Method of determining and expressing fineness of feed materials by sieving. **American Society of Agricultural Engineers Standard**, p447-448, 1993.
- ANDRES, C. What are alternatives to use of FD & C yellow 5 in food? **Food Process**. v.41, p. 211-217, 1980.
- ASHRAF, M. Z.; KHAN, M. S. Y.; HAMEED, H. A.; HUSSAIN, M. E.; FAHIM, M. Endothelium modulated vasorelaxant response of a polypharmaceutical herbal drug (lipotab) and its individual constituents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 66, n.1, p. 97-102, 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 14.ed., Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1984. 1053p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 12^a ed, Washington, 1975. 1094 p.

- BADALYAN, A. G.; WILKINSON, G. T.; CHUN, B. Extraction of Australian ginger root with carbon dioxide and ethanol entrainer. **Journal of Supercritical Fluids**. v.13, p. 319-324, 1998.
- BEGAN G.; GOTO, M.; KODAMA, A ; HIROSE, T. Response Surfaces of total oil yield of turmeric (*Curcuma longa*) in supercritical carbon dioxide. **Food Research International** v. 33 (2000), 341-345.
- BOBBIO, P.A. Química do processamento de alimentos. São Paulo, 1992, 51p.
- BRAGA, M. E. M.; LEAL, P. F.; MARQUES, M. O.M.; M.A.A. MEIRELES. Extração Supercrítica de *Curcuma longa* L. Utilizando CO₂ + Etanol, Isopropanol Ou Etanol/Isopropanol: A Ação Antioxidante Dos Extratos- In: **Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos**, 4. Campinas, SP, p.223, 2001a. Livro de Programa e Resumos- Resumo: 0734-609.5.
- BRAGA, M. E. M.; LEAL, P. F.; MARQUES, M. O.M.; M.A.A. MEIRELES. SFE of Turmeric Using CO₂ and Co-solvents: selection of co-solvent. In: **IV Encontro Brasileiro sobre Fluidos Supercríticos –EBFS 2001. Salvador, BA** , 2001b.
- BROD, F.P.R.; OLIVEIRA, R.A; PARK, K.J. Estudo de um secador convectivo conjugado de fluxo perpendicular e paralelo. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 29, 2000, Fortaleza-CE. **Anais**. Fortaleza-CE: SBEA, 2000. CD-ROM.
- BROGLE, H. CO₂ as a Solvent: its properties and applications. **Chemistry and Industry**. v.12, p.385-390, 1982.
- BRUNNER, G. **Gas Extraction**: Na Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Applications to Separation processes. 1^a ed. Darstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994.
- CHAN, M.M; HUANG, H.; FENTON, M. R.; FONG, D. In Vivo Inhibition of Nitric Oxide Synthase Gene Expression by Curcumin, a Cancer Preventive Natural Product with Anti-Inflammatory Properties. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 12, p. 1955-1962. 1998.
- CHANG, C. J.; CHIU, K.; CHEN. Y.; CHANG, C. Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**. Analytical, Nutrition and Clinical Methods Section. v.68, p. 109-113, 2000.

- CHASSAGNEZ, A.L.C.M. Extração de produtos de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) com CO₂ supercrítico. Belém, 1998. 88p. Tese (Mestre em Engenharia Química)-Centro Tecnológico da Universidade federal do Pará.
- CHUN, K; SOHN, Y; KIM, H. ; KIM, O.; PARK, K; LEE, J. ; LEE, J.; LEE, J. ; MOON, A.; LEE, S.; SURH, Y. Anti-tumor promoting potential of naturally occurring diarylheptanoids structurally related to curcumin. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. V. 428, n.1-2, p.49-57, 1999.
- COLLINS, L.A.; FRANZBLAU, S.G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother* , v. 41, n. 5, p. 1004-9, 1997.
- CRUZ, R. Isolamento, caracterização e modificações de amido de chuchu. Campinas, 1982, 266p. Tese (Doutor em Engenharia Agrícola)-FEAGRI-UNICAMP.
- DONALÍSIO, M.G.Instruções para o cultivo de Cúrcuma. **O Agrônomo**, n.32, p.171-175, Campinas, 1980.
- DUNCAN, W. G.; OHLROGGE, A. J. Principles of nutrient from fertilizer bands: II. **Agronomy Journal**, Madison, v. 50, p. 605-608, 1958.
- FERREIRA, L. A, HENRIQUES, O.B., ANDREONI, A.A., VITAL, G.R., CAMPOS, M.M, HABERRMEHL, G.G., MORAES, V.L. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon**. v.30, 1992, p.1211-1218.
- FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z. L.;DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M.A.A.; PETENATE, A. J. Supercritical Fluid Extraction of black pepper (*Piper nigrum*) essential oil. **Journal Supercritical Fluids**, 14, 235-246, 1999.
- FILLIPI, R. P. CO₂ as a Solvente: Application to Fats, Oils and Other Materials. **Chemistry and Industry**. v.12, p.390-394, 1982.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF DE UNITED STATES.
<http://www.fao.org>

- FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; McLAUGHLIN, J.C.; TORRES, P.; FUENTES, P.; COOK, M.B.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M.T.; QUENZER, V.K.; FEERGUSON, R.M.; SHEEN, P.; GILMAN, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 2, p. 362-6, 1998.
- FREUD, R. J.; LITTLE, R. C.; **SAS System for Regression-** SAS Series in Statistical Applications, SAS Institute Inc., 2nd Ed, N Carry, USA, 1995.
- GOMIDE, R. **Operações Unitárias**. Operações com sistemas sólidos granulares. v.1, p.293, 1983.
- GOTO, R. Épocas de plantio, adubações fosfatadas e unidades térmicas em cultura de açafrão (*Curcuma longa* L.). Jaboticabal, 1993. 93p. Tese (Doutor em Agronomia)-UNESP.
- GOTO, R.; CASTELLANE, P.D. Sistema de cultivo e adubação nitrogenada em cobertura na cultura de açafrão (*Curcuma longa* L.). In: Congresso Latino Americano de raízes tropicais, I, in: Congresso Brasileiro de mandioca, IX, São Pedro - SP. 1996. **Resumo** nº156.
- GOVINDARAJAN, V. S. Turmeric-Chemistry, technology, and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.12, n.3, p.199-301, 1980.
- GOYAL, R. K.; KORLA, B. N. Changes in the quality of turmeric rhizomes during storage. *J. Food Sci. Technol.* v.30, n.5, p.362-364, 1993.
- HALLAGAN, J.B. The Use of Certified Food Color Additives in the United States. **Cereal Foods World**. v. 36, n. 11, 1991.
- HE, X. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **Journal of Chromatography A**. v. 880, n. 1-2, Junho 2, p. 203-232, 2000.
- JACOBS, M. **The chemical analysis of foods and food products**. 3^o ed. Robert Krieger Publishing Co. inc., p.21-28, 1973.

- KELKHAR, N. C. ; RAO, B. S. Studies in Indian essential oils from rhizomes of *Curcuma longa* Linn. **Journal Indian Inst. Sci.** v.17A, p. 7-24, 1934.
- KIRAN, E; BRENNEECKE, J. F. **Supercritical Fluid Engineering Science: Fundamentals and Applications.** Washington: ACS, 410p. 1993.
- KÖHLER, F. E. - Köhler'S Medizinal Pflanzen In Naturgetreuen Abbildungen Mit Kurz Erläuterndem Texte. www.mobot.org
- KRISHNAMURTHY, N. MATHEW, A. G.; NAMBUDIRI, E. S.; SHIVASHANKAR, S.; LEWIS, Y. S.; NATARAJAN, C. P. Oil and oleoresin of turmeric. **Tropical Science.** v.18, n.1, 1976.
- KRISHNASWANY, K; RAGHURAMULU, N. Bioactive phytochemicals with emphasis on dietary practices. **Indian Journal of Medical Research.** V. 108, n.5, p.167-181, 1998.
- LAURO, G. J. **A primer on natural colors.** **Cereal Foods World.** v.36, p. 949-953, 1991.
- MANGALAKUMARY, C.K.; MATHEU, A.G. Localization of significant constitutintes of turmeric. **J. Food. Sci. Technol.** v.23, p. 93-96 .1986.
- MARTINS, M.C. Obtenção e avaliação de curcumina a partir de rizomas secos de cúrcuma (*Curcuma longa* L.). Campinas. (Tese: Mestrado na FEA), 1993. 176 p
- MATHAI, C.K. The pattern of rhizome yield and their accumulation of commercially important chemical constituents in Turmeric during growth and development. **Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition.** v. 36, n.3, p. 219-215, 1979.
- McLAFERTY, F.W.; STAUFFER, D.B. **The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data.** v.1, John Wiley and Sons, New York ,1989.
- MEIRELES, M.A.A.; NIKOLOV Z.L. Extraction and fractionation of essential oil with liquid carbon dioxide, In: **Spices, Herbs and Edible Fungi.** G. Charalambous Ed, 1994, 171p.
- Merck & Co. **Reagents, chemicals diagnostics.** n. 2744, 1999.
- MILLER, M. H. ; MAMARIL, C. P; BLAIR, G. J. Ammonium effects on phosphorus absrtion yough ph changes and phosphorus precipitation at the soil-root interface. **Agronomy Journal,** Madison: v.62, p. 524-527, 1965.

- MONTALDO, A. Cultivo de raices y tuberculos tropicales, **Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA**, Lima, Peru, p.257, 1972.
- MONTEIRO, A. R. Extração de óleo essencial/oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) com CO₂ supercrítico: uma avaliação do pré-tratamento e das variáveis de processo. Campinas, 1999. Tese (Doutor em Engenharia de alimentos)-FEA-UNICAMP.
- MORS, B. W., NASCIMENTO, M. C., PEREIRA, B. M. R., PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v.55, 2000, p.627-642.
- MUELAS-SERRANO, S., NOGAL, J. J., MARTÍNEZ-DIAS, R. A. , ESCARIO, J. A., MARTÍNEZ-FERNANDEZ, GÓMEZ-BARRIO, A. In vito screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v71, 2000, p.101-107.
- MUKUNDAN, M. A.; CHACKO, M. C. ANNAPURNA, V. V.; KRINSNASWAMY, K. Effect of turmeric and Curcumin on BP-DNA adducts. **Carcinogenesis**, v.14, n.3, p.493-496, 1993.
- NAZÁRIO, G. **Avaliação toxicológica de corantes naturais**. In: CARVALHO, P. R. N., Coord. Corantes Naturais para Alimentos, Campinas: ITAL, p.1-6, 1989.
- OLAJIDE, O. A. Investigation of the effects of selected medicinal plants on experimental thrombosis. **Phytotherapy Research**. v.13, p.2, 1999.
- PASQUEL-RUIZ, A. P. Extração dos glicosídeos da estévia com fluidos pressurizados. Campinas, 1999, p.170. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos)-FEA-UNICAMP.
- PELLERIN, P. Extraction of natural raw materials for the flavor industry. **Perfumer & Flavorist**. v. 56, p. 37-41, 1991.
- PEROTTI, A. G. Curcumin: a useful vegetable color, which is not well known. **Industri Alimentari** (Italy). v. 14, n.6, p.66-68, 1975.
- PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. **Manual de Engenharia Química**. Trad. Macedo, H., Barbosa, L. M.; Barbosa, P. E. F. 5ª Edição. Rio de Janeiro-RJ, p. 3-93 e 3-95, 1986.

- PEZZUTO, J. M. **Cancer Chemopreventive Agents from Plants Materials to Clinical Intervention Trials.** In: KINGHORN, A. D.; BALANDRIN, M. F. Human Medicinal Agents from Plants. American Chemical Society, Washington, DC, 1993, p. 205-215
- PORTILLO-PRIETO, R. Extração do óleo Essencial da Khoa (*Satureja boliviana* B.) por diferentes processos: hidrodestilação, extração com solventes orgânicos e dióxido de carbono pressurizado. Campinas, 1999. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos)-FEA-UNICAMP.
- PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science.** v.44, p. 1720-1722, 1979.
- PRICE, L. C.; BUESCHER, R. W. Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids. **Journal of Food Science (USA).** v. 62, n.2, p.267-269, 1997.
- PRIYADARSINI, K. **Free Radical Reactions of Curcumin in Membrane Models. Free Radical Biology and Medicine.** V. 23, n. 6, p. 838-843, 1997.
- RANDHAWA, K. S.; NANDPURI, K. S.; BAJWA, M. S. **Response of turmeric (*Curcuma longa*) to NPK fertilization.** J. Rres. Punjab Agric. Univ., n. 10, p. 45-48, 1974.
- RAO-MR; REDDY-VR. Effect of different levels of nitrogen, phosphorus and potassium on yield of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Journal of Plantation Crops.** v.5,n.1, p. 60-63.1977.3 ref.
- RATNAMBAL, M. J. Evaluation of turmeric accessions for quality. **Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition,** v.36, n.3, p. 243-252, 21 ref., 1986.
- RODRIGUES, V.M. CD Room 2000-Atlanta. **Proceeding of the 5TH International Symposium on Supercritical Fluids.** Atlanta, Georgia, USA April 8-12, 2000.
- SAMPATHU, S.R.; KRISHNAMURTHY. N, SOWBHAGYA, H. B.; SHANKARANARAYANA, M. L. . Studies on quality of turmeric (*Curcuma longa*) in relation to curing methods. **Journal of Food Science and Technology,** India, v.25, n.3, p.152-155, 12 ref. 1988.

- SANDLER, I.S. **Chemical and Engineering Thermodynamics**. New York: John Wiley & Sons, 1989. 622 p.
- SANTOS, G de O. Organogênese do gengibre (*Zingiber officinale* R.) e seu crescimento em dois solos e cinco doses de nitrogênio. Viçosa. (Tese: Mestrado na UFV), 1992. 72 p.
- SEARS, C. The easy way sell drugs. **New scientist**. 4 nov, 1995.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G., MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. rev. – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, p. 833, 2001
- SMITH, R. M. Supercritical fluids in separation science-the dreams, the reality and the future. **Journal of Chromatography A**, v856, n.1-2, 1999, p.83-115.
- SRINAVASAN, K. R. Chromatographic study of the curcuminoids in *Curcuma longa* L., **J. Pharm. Pharmacol.**, v.5, p. 448-457, 1953.
- STAUB, C. Supercritical fluid extraction and hair analysis: the situation in 1996. **Forensic Science International**. v.84, p. 295-304, 1997.
- TAKAHASHI, M.Y. **Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: Padrões de Qualidade e Identidade**. 2 ed., São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 1987.
- TAYLOR, L. T. **Supercritical Fluid Extraction**. John Wiley & Sons Inc., Canada, p181, 1996.
- TONNESEN, H. H. KARLSEN, J.; GRISLINGAAS, A. L.; BALAKRISHNAN, K.V.N.; AYYAPPAN, P.; VERGHESE, J. Studies on curcumin and curcuminoids XXI. Variation in the content of curcuminoids in *Curcuma longa* L. and *Curcuma aromatica* Salisb. from India during one season. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. v. 194, n.6, p.570-572, 13 ref., 1992.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ. P. D. J. A generalization of the Retention Index System Including Liner Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J. Chromatography*. 11, 463-467 (1963).

- VIMALA, S.; NORHANOM, A. W.; YADAV, M. Anti-tumor promoter activity in Malaysian ginger rhizobia used in traditional medicine. **British Journal of Cancer**. v. 80, p.110-116, 1999.
- VON HERTWIG, I. F. **Plantas medicinais e aromáticas**: plantio, colheita, secagem e comercialização. 2 ed. São Paulo: ICONE, 414p, 1991.
- WALTON, K.; WALKER, R.; van de SANT, J. J. M.; CASTELL, J. V.; KNAPP, A. G. A. A.; KOZIANWSKI, G.; ROBERFROID, M.; SCHILTER, B.. The application of *in vitro* data in the derivation of the acceptable daily intake of food additives. **Food and Chemical Toxicology**. v.37, p.1175-1197, 1999.
- WANG, H.; CHEN, C.; CHANG, C. J. Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. **Food Chemistry**. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section. v.72, p. 505-509, 2001.

Capítulo 7. Apêndices e Anexos



Curcuma longa L. cultivada e colhida em Maria-da-Fé/ Minas Gerais.

Anexo I- Estufa e Secador utilizados para secagem da matéria-prima



Figura 1. Bandejas da estufa pertencente a UFLA localizada na EPAMIG-MG.



Figura 2. Secador pertencente a Faculdade de Engenharia Agrícola-Unicamp. Brod, 2000.

Anexo II- Curva de Calibração de glicose

Curva de Calibração de glicose utilizada para cálculo da massa de glicose presente nas matérias-primas para desenvolvimento do experimento.

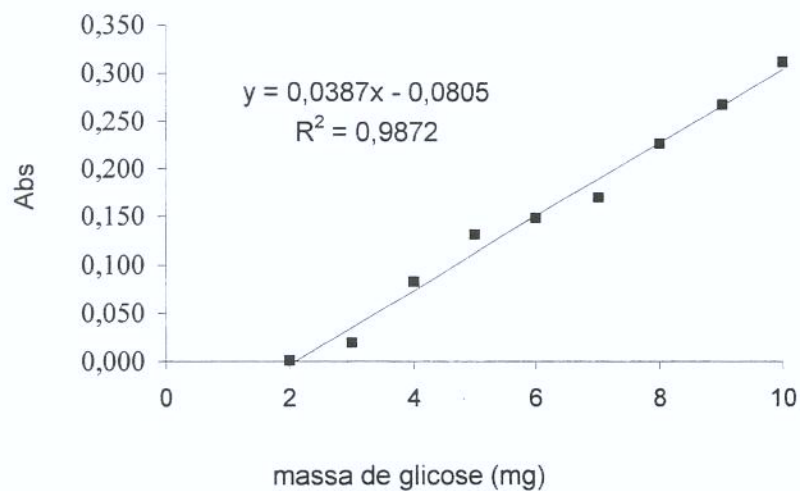


Figura 1. Curva padrão de glicose.

Anexo III- Treinamento na Unidade de Extração Supercrítica

Condições Operacionais de Extração Supercrítica de Stévia

Solvente	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Granulometria (mesh)	Vazão (g/min)	Rendimento (%)
CO ₂	200	30	16 (60%) e 24 (40%)	0,996	0,9240

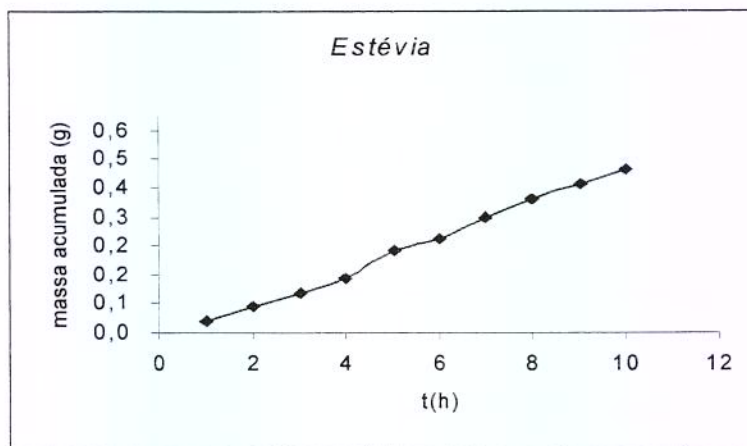


Figura 1 Curva Global de Extração de Stévia com CO₂.

Condições Operacionais de Extração Supercrítica de Stévia

Solvente	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Granulometria (mesh)	Vazão (g/min)	Rendimento (%)
CO ₂ +água	250	16	16 (60%) e 24 (40%)	1,014	73,46

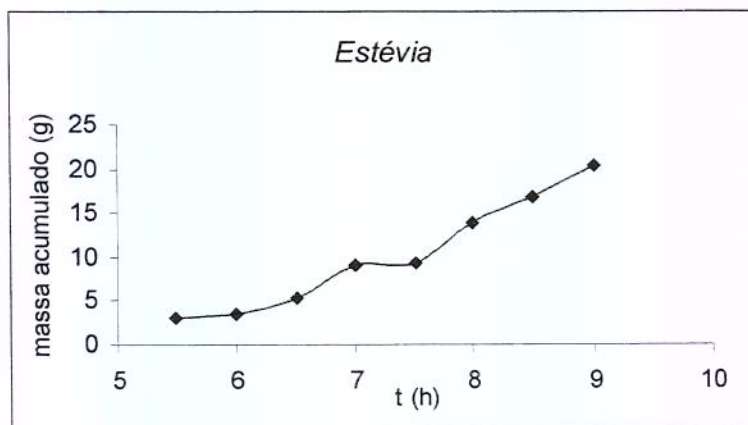


Figura 2. Curva Global de Extração de Stévia CO₂+água.

Condições Operacionais de Extração Supercrítica de Cravo-da-Índia

Solvente	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Granulometria (mesh)	Vazão (g/min)	Rendimento (%)
CO ₂	250	30	16 (60%) e 24 (40%)	3,50	13,65

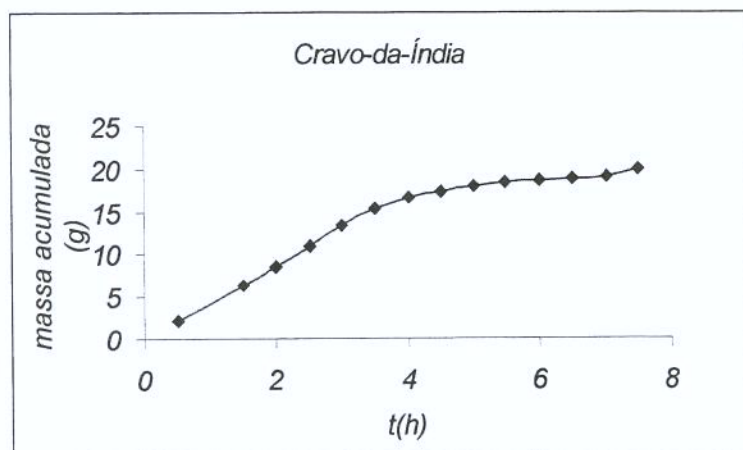


Figura 3. Curva Global de Extração de Cravo-da-Índia com CO₂.

Condições Operacionais de Extração Supercrítica de Gengibre

Solvente	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Granulometria (mesh)	Vazão (g/min)	Rendimento (%)
CO ₂ +etanol	200	30	16, 24, 32 e 48 (25%)	3,48	2,09

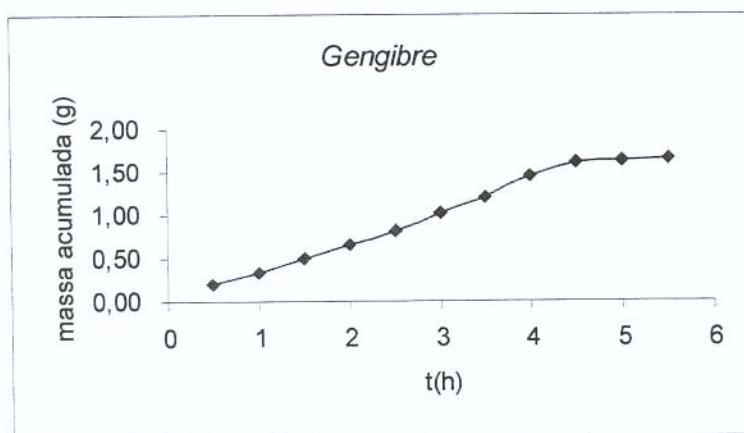


Figura 4. Curva Global de Extração de Gengibre com CO₂.

Anexo IV-A Dados Experimentais, Preditos e Resíduo obtidos no SAS 6.12

Primeiro grupo de ensaios

Tabela 1 . Dados de extração do ensaio com co-solvente etanol (5,58% massa), vazão de $4,45 \times 10^5$ kg/s temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar, com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,3137	0,3137	0,3394	0,4485	-0,1348
50	0,9450	1,2587	1,3618	1,2271	0,0315
75	0,9089	2,1676	2,3451	2,0057	0,1618
100	0,7347	2,9023	3,1400	2,7843	0,1179
125	0,4910	3,3933	3,6712	3,5629	-0,1696
150	0,3288	3,7221	4,0269	3,9212	-0,1991
175	0,2757	3,9978	4,3252	3,9993	-0,0015
200	0,1482	4,1460	4,4856	4,0774	0,0685
225	0,1219	4,2679	4,6174	4,1555	0,1123
250	0,0182	4,2861	4,6371	4,2336	0,0524
275	0,0876	4,3737	4,7319	4,3118	0,0618
300	0,0543	4,4280	4,7907	4,3899	0,0380
325	0,0481	4,4761	4,8427	4,4680	0,0080
350	0,0132	4,4893	4,8570	4,5461	-0,0568
375	0,0442	4,5335	4,9048	4,6242	-0,0907

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 0,4732 g

Massas de solvente: M0= 59,25 g

M1= 6,02 g

M2= 1,72 g

M3= 51,51 g

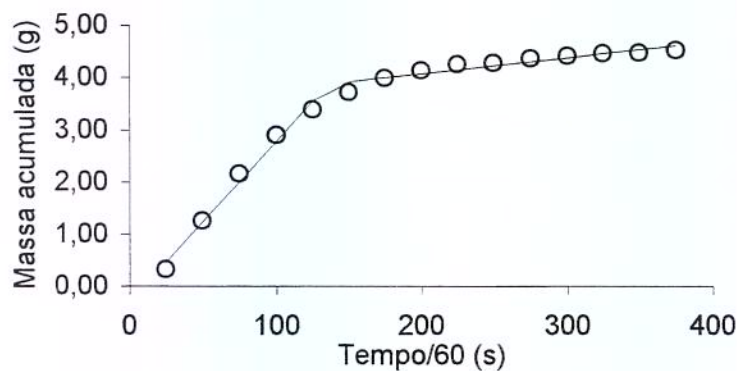


Figura 1. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol (5,58% massa), vazão de $4,45 \times 10^5$ kg/s temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar . o experimental; — predito

Tabela 2 . Dados de extração do ensaio com co-solvente etanol (6,43% massa) , vazão de $3,38 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar, com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,0030	0,0030	0,0032	0,1196	0,1225
50	0,3171	0,3201	0,3461	0,4285	-0,1084
75	0,5648	0,8849	0,9569	0,9765	-0,0916
100	0,6794	1,5643	1,6915	1,5246	0,0396
125	0,5303	2,0946	2,2649	2,0727	0,0218
150	0,5464	2,6410	2,8558	2,6207	0,0202
175	0,5138	3,1548	3,4113	3,1688	-0,0140
200	0,4170	3,5718	3,8622	3,7169	-0,1451
225	0,2592	3,8310	4,1425	3,8137	0,0172
250	0,1680	3,9990	4,3242	3,9105	0,0884
275	0,1054	4,1044	4,4381	4,0073	0,0970
300	0,0392	4,1436	4,4805	4,1041	0,0394
325	0,0848	4,2284	4,5722	4,2009	0,0274
350	0,0465	4,2749	4,6225	4,2978	-0,0229
375	0,0279	4,3028	4,6527	4,3946	-0,0918

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 0,6645 g

Massas de solvente: M0= 59,25 g

M1= 7,27 g

M2= 0,93 g

M3= 51,05 g

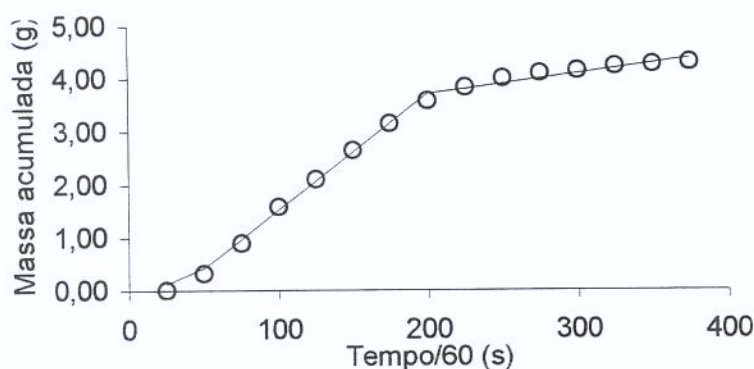


Figura 2. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol (6,43% massa), vazão de $3,38 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar . o experimental; — predito

Tabela 3. Dados de extração de extração do ensaio com co-solvente isopropanol (6,23% massa), vazão de $3,94 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,7911	0,7911	0,7684	0,7907	0,0003
50	1,0785	1,8696	1,8160	1,8967	-0,0271
75	1,1896	3,0592	2,9715	3,0027	0,0565
100	1,0113	4,0705	3,9539	4,1086	-0,0381
125	0,4078	4,4783	4,3500	4,6012	-0,1229
150	0,1796	4,6579	4,5244	4,6847	-0,0268
175	0,1345	4,7924	4,6551	4,7682	0,0241
200	0,1282	4,9206	4,7796	4,8517	0,0688
225	0,0824	5,0030	4,8596	4,9352	0,0677
250	0,0769	5,0799	4,9343	5,0187	0,0611
275	0,0610	5,1409	4,9936	5,1023	0,0385
300	0,0713	5,2122	5,0628	5,1858	0,0263
325	0,0485	5,2607	5,1100	5,2693	-0,0086
350	0,0485	5,3092	5,1571	5,3528	-0,0436
375	0,0508	5,3600	5,2064	5,4363	-0,0763

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 1,1087 g

Massas de solvente: M0= 58,95 g

M1= 5,64 g

M2= 2,46 g

M3= 50,84 g

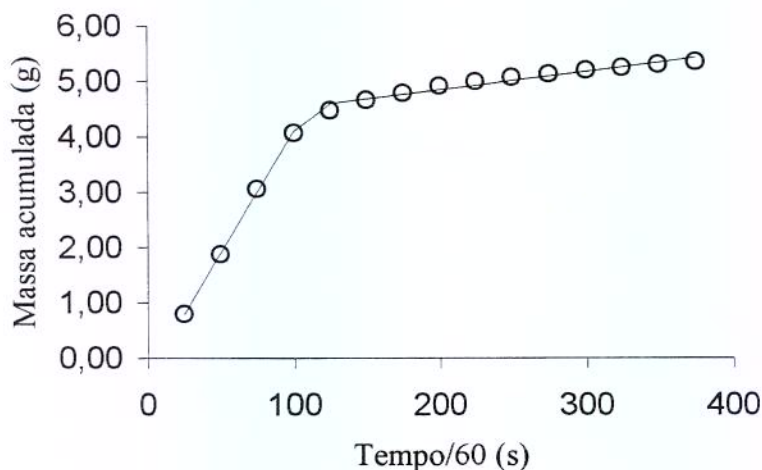


Figura 3. Curva global de extração do ensaio com co-solvente isopropanol (6,23% massa), vazão de $3,94 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar. o experimental; — predito

Tabela 4. Dados de extração de extração do ensaio com co-solvente isopropanol (6,68% massa), vazão de $3,66 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,2281	0,2281	0,1938	0,1968	0,0312
50	0,9971	1,2252	1,0410	1,2777	-0,0525
75	1,1003	2,3255	1,9760	2,3587	-0,0332
100	1,1801	3,5056	2,9787	3,4396	0,0659
125	1,0367	4,5423	3,8595	4,5205	0,0217
150	0,7591	5,3014	4,5045	5,6014	-0,3000
175	0,3055	5,6069	4,7641	5,7683	-0,1614
200	0,3674	5,9743	5,0763	5,9353	0,0389
225	0,3724	6,3467	5,3927	6,1022	0,2444
250	0,1513	6,4980	5,5213	6,2691	0,2288
275	0,1241	6,6221	5,6267	6,4361	0,1859
300	0,0518	6,6739	5,6707	6,6030	0,0708
325	0,0792	6,7531	5,7380	6,7699	-0,0168
350	0,0711	6,8242	5,7985	6,9369	-0,1127
375	0,0685	6,8927	5,8567	7,1038	-0,2111

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 1,5189 g

Massas de solvente: M0= 58,95 g

M1= 8,10 g

M2= 1,45 g

M3= 49,40 g

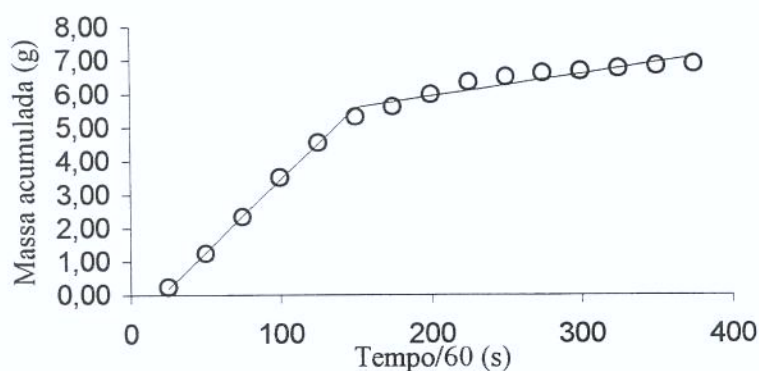


Figura 4. Curva global de extração do ensaio com co-solvente isopropanol (6,68% massa), vazão de $3,66 \times 10^5$ kg/s temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar. o experimental; — predito

Tabela 5 . Dados de extração de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,03% massa), vazão de $4,09 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,4765	0,4765	0,5237	0,4428	0,0337
50	1,1320	1,6085	1,7678	1,6824	-0,0738
75	1,4044	3,0129	3,3112	2,9220	0,0909
100	0,8766	3,8895	4,2746	4,1616	-0,2720
125	0,4630	4,3525	4,7835	4,4759	-0,1233
150	0,2758	4,6283	5,0866	4,5588	0,0694
175	0,1287	4,7570	5,2280	4,6418	0,1152
200	0,0759	4,8329	5,3115	4,7247	0,1081
225	0,0773	4,9102	5,3964	4,8077	0,1025
250	0,0762	4,9864	5,4802	4,8906	0,0958
275	0,0183	5,0047	5,5003	4,9736	0,0311
300	0,1090	5,1137	5,6201	5,0565	0,0572
325	0,0057	5,1194	5,6263	5,1395	-0,0200
350	0,0723	5,1917	5,7058	5,2224	-0,0307
375	0,0705	5,1212	5,6283	5,3053	-0,1841

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 0,2808 g

Massas de solvente: M0= 59,25 g

M1= 5,61 g

M2= 1,45 g

M3= 52,18 g

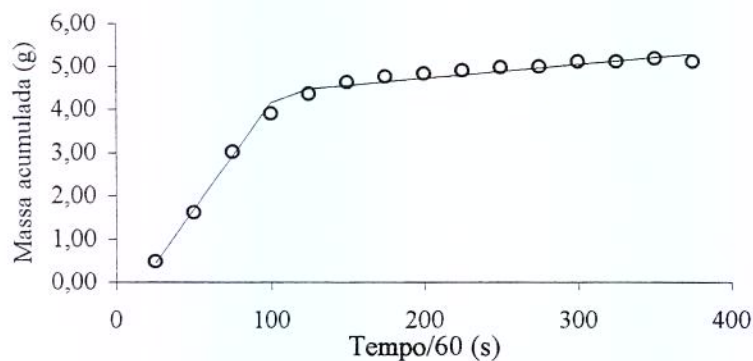


Figura 5. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,03% massa), vazão de $4,09 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar . o experimental;

— predito

Tabela 6 . Dados de extração de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (7,41% massa), vazão de $3,54 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,1850	0,1850	0,1930	0,2956	-0,1106
50	1,0716	1,2566	1,3111	1,2327	0,0238
75	1,1583	2,4149	2,5197	2,1699	0,2449
100	0,5472	2,9621	3,0907	3,1071	-0,1450
125	1,1124	4,0745	4,2514	4,0442	0,0302
150	0,3284	4,4029	4,5940	4,6755	-0,2726
175	0,4291	4,8320	5,0417	4,8477	-0,0157
200	0,2913	5,1233	5,3457	5,0200	0,1032
225	0,2686	5,3919	5,6259	5,1922	0,1996
250	0,0801	5,4720	5,7095	5,3645	0,1074
275	0,1035	5,5755	5,8175	5,5368	0,0386
300	0,1388	5,7143	5,9623	5,7090	0,0052
325	0,0310	5,7453	5,9947	5,8813	-0,1360
350	0,1241	5,8694	6,1242	6,0536	-0,1842
375	0,4675	6,3369	6,6120	6,2258	0,1110

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 0,5822 g

Massas de solvente: M0= 59,25 g

M1= 8,36 g

M2= 0,99 g

M3= 49,89 g

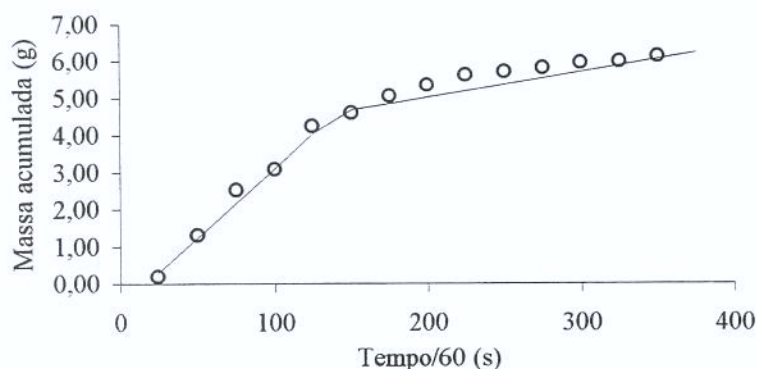


Figura 6. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (7,41% massa), vazão de $3,54 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar . o experimental; — predito

Segundo grupo de ensaios

Tabela 7. Dados de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (13,78% em massa), vazão de $3,81 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	1,6903	1,6903	1,5001	1,9825	-0,2922
50	2,2073	3,8976	3,4590	3,5039	0,3938
75	1,3436	5,2412	4,6514	5,0253	0,2160
100	0,4823	5,7235	5,0794	5,9917	-0,2682
125	0,2561	5,9796	5,3067	6,1258	-0,1462
150	0,2270	6,2066	5,5082	6,2599	-0,0533
175	0,2020	6,4086	5,6874	6,3939	0,0147
200	0,1498	6,5584	5,8204	6,5280	0,0304
225	0,1392	6,6976	5,9439	6,6621	0,0355
250	0,1590	6,8566	6,0850	6,7962	0,0604
275	0,1381	6,9947	6,2076	6,9302	0,0645
300	0,1179	7,1126	6,3122	7,0643	0,0483
325	0,1103	7,2229	6,4101	7,1984	0,0245
350	0,0842	7,3071	6,4848	7,3325	-0,0254
375	0,0567	7,3638	6,5351	7,4665	-0,1027

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 0,6438 g

Massas de solvente: M0= 118,50 g

M1= 4,12 g

M2= 66,33 g

M3= 48,05 g

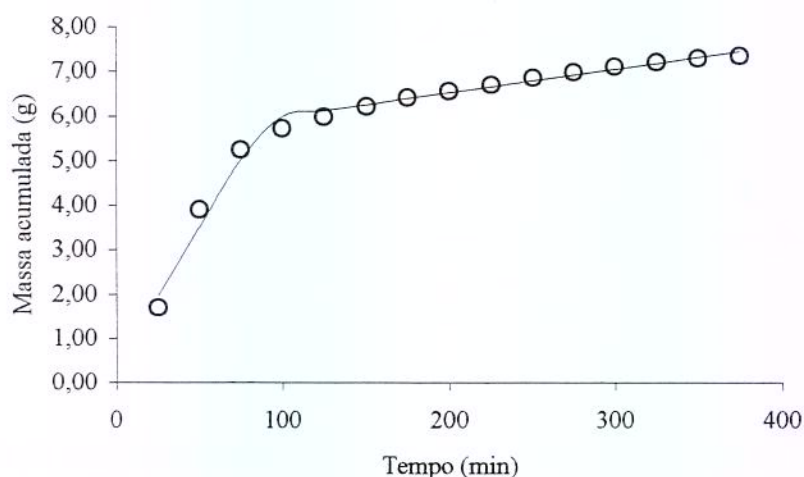


Figura 7. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (13,78% em massa), vazão de $3,81 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

o experimental; — predito

Tabela 8. Dados de extração de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,95% em massa), vazão de $4,04 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,1852	0,1852	0,1693	0,1805	0,0047
50	1,4942	1,6794	1,5354	1,6188	0,0606
75	1,2753	2,9547	2,7013	3,0557	-0,1025
100	1,1672	4,1219	3,7684	4,4955	-0,3736
125	0,6550	4,7769	4,3673	4,7308	0,0461
150	0,1820	4,9589	4,5336	4,8614	0,0975
175	0,1434	5,1023	4,6647	4,9920	0,1103
200	0,1602	5,2625	4,8112	5,1227	0,1398
225	0,1012	5,3637	4,9037	5,2533	0,1104
250	0,1090	5,4727	5,0034	5,3839	0,0888
275	0,1099	5,5826	5,1039	5,5146	0,0680
300	0,0811	5,6637	5,1780	5,6452	0,0185
325	0,0795	5,7432	5,2507	5,7758	-0,0326
350	0,0809	5,8241	5,3246	5,9065	-0,0824
375	0,0594	5,8835	5,3790	6,0371	-0,1536

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 0,3458 g

Massas de solvente: M0= 59,25 g

M1= 6,35 g

M2= 26,18 g

M3= 26,71 g

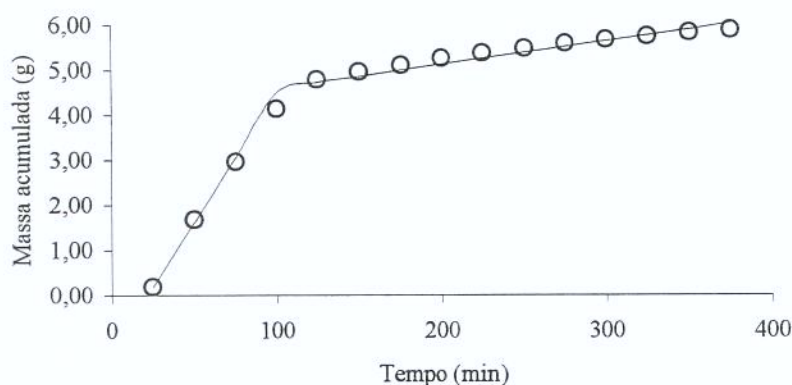


Figura 8. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,95% em massa), vazão de $4,04 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

o experimental; — predito

Tabela 9. Dados de extração de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (13,59% em massa), vazão de $1,93 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	1,1491	1,1491	1,0131	1,2040	-0,0549
50	1,7407	2,8898	2,5479	2,8090	0,0808
75	1,5464	4,4362	3,9113	4,4140	0,0222
100	0,6710	5,1072	4,5029	5,4405	-0,3333
125	0,3852	5,4924	4,8425	5,5992	-0,1068
150	0,3233	5,8157	5,1276	5,7580	0,0577
175	0,1900	6,0057	5,2951	5,9167	0,0890
200	0,2424	6,2481	5,5088	6,0755	0,1726
225	0,1386	6,3867	5,6310	6,2342	0,1525
250	0,1359	6,5226	5,7508	6,3930	0,1296
275	0,1056	6,6282	5,8439	6,5517	0,0765
300	0,1059	6,7341	5,9373	6,7105	0,0236
325	0,0875	6,8216	6,0145	6,8692	-0,0476
350	0,1074	6,9290	6,1092	7,0280	-0,0990
375	0,0947	7,0237	6,1926	7,1867	-0,1630

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 1,1999g

Massas de solvente: M0= 59,25 g

M1= 12,39 g

M2= 31,83 g

M3= 15,03 g

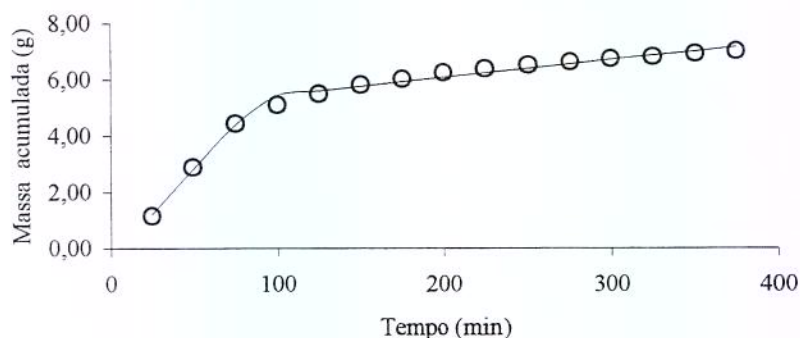


Figura 9. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (13,59% em massa), vazão de $1,93 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

o experimental; — predito

Tabela 10 . Dados de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,66% em massa), vazão de $1,97 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,5335	0,5335	0,4894	0,5478	-0,0143
50	1,2027	1,7362	1,5928	1,7230	0,0132
75	1,1967	2,9329	2,6907	2,8982	0,0347
100	1,0153	3,9482	3,6222	4,0734	-0,1252
125	0,3121	4,2603	3,9085	4,4117	-0,1514
150	0,2934	4,5537	4,1777	4,5407	0,0130
175	0,1748	4,7285	4,3381	4,6697	0,0588
200	0,1469	4,8754	4,4728	4,7987	0,0767
225	0,1333	5,0087	4,5951	4,9277	0,0810
250	0,1568	5,1655	4,7390	5,0567	0,1088
275	0,1054	5,2709	4,8357	5,1857	0,0852
300	0,0908	5,3617	4,9190	5,3147	0,0470
325	0,0615	5,4232	4,9754	5,4437	-0,0205
350	0,0564	5,4796	5,0272	5,5727	-0,0931
375	0,1080	5,5876	5,1262	5,7017	-0,1141

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 0,6888 g

Massas de solvente: M0= 28,62 g

M1= 9,28 g

M2= 10,76 g

M3= 9,59 g

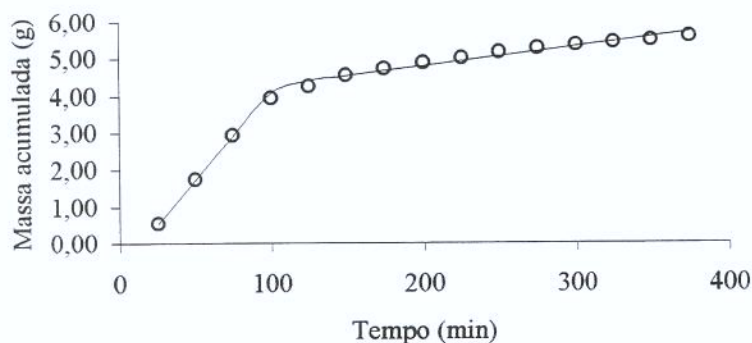


Figura 10. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,66% em massa), vazão de $1,97 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

o experimental; — predito

Tabela 11. Dados de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (16,11% em massa), vazão de $0,82 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,0824	0,0824	0,0756	0,1612	-0,0788
50	0,4398	0,5222	0,4793	0,6801	-0,1579
75	0,6855	1,2077	1,1086	1,1989	0,0088
100	0,6004	1,8081	1,6597	1,7178	0,0903
125	0,4907	2,2988	2,1102	2,2367	0,0621
150	0,6597	2,9585	2,7157	2,7556	0,2029
175	0,4717	3,4302	3,1487	3,2745	0,1557
200	0,4259	3,8561	3,5397	3,7934	0,0627
225	0,3779	4,2340	3,8865	4,3123	-0,0783
250	0,0681	4,3021	3,9491	4,4596	-0,1575
275	0,1678	4,4699	4,1031	4,6069	-0,1370
300	0,1891	4,6590	4,2767	4,7542	-0,0952
325	0,2271	4,8861	4,4851	4,9014	-0,0153
350	0,2084	5,0945	4,6764	5,0487	0,0458
375	0,1931	5,2876	4,8537	5,1960	0,0916

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 0,5482 g

Massas de solvente: M0= 29,62 g

M1= 12,32 g

M2= 10,43 g

M3= 6,87 g

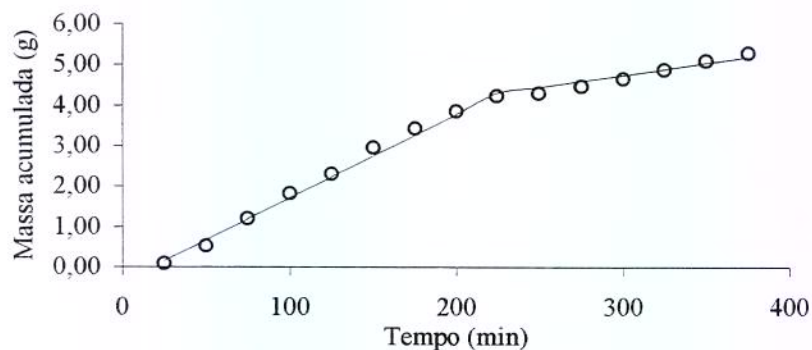


Figura 11. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (16,11% em massa), vazão de $0,82 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

○ experimental; — predito

Tabela 12. Dados de extração de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (8,32% em massa), vazão de $0,79 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar com valores Preditos e Resíduo da massa acumulada obtido pelo SAS 6.12.

T (s/60)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento CG (%)	Predito (massa acumulada)	Resíduo
25	0,0633	0,0633	0,0556	0,0169	0,0464
50	0,3530	0,4163	0,3657	0,4845	-0,0682
75	0,5795	0,9958	0,8747	0,9521	0,0437
100	0,4223	1,4181	1,2456	1,4197	-0,0016
125	0,4589	1,8770	1,6487	1,8873	-0,0103
150	0,4162	2,2932	2,0142	2,3549	-0,0617
175	0,4538	2,7470	2,4128	2,8225	-0,0755
200	0,2823	3,0293	2,6608	3,0629	-0,0336
225	0,2403	3,2696	2,8718	3,2465	0,0231
250	0,2657	3,5353	3,1052	3,4301	0,1052
275	0,1659	3,7012	3,2509	3,6137	0,0875
300	0,1624	3,8636	3,3936	3,7974	0,0663
325	0,1458	4,0094	3,5217	3,9810	0,0284
350	0,1123	4,1217	3,6203	4,1646	-0,0429
375	0,1197	4,2414	3,7254	4,3482	-0,1068

Massa de óleo essencial retida no adsorvente = 0,9696 g

Massas de solvente: M0= 14,81 g

M1= 1,01 g

M2= 4,24 g

M3= 9,57 g

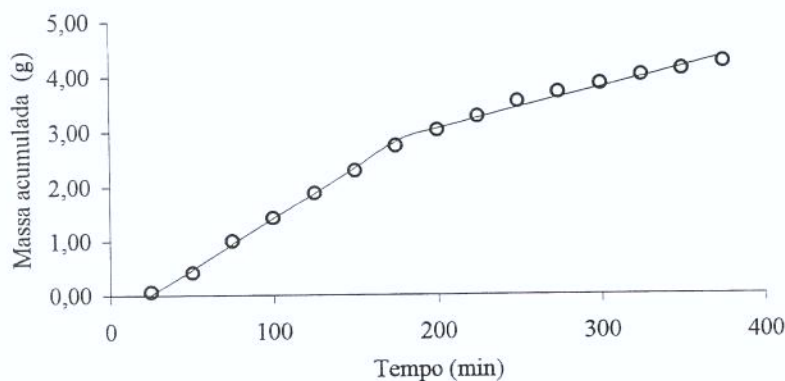


Figura 12. Curva global de extração do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (8,32% em massa), vazão de $0,79 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

o experimental; — predito

Anexo V- Programa de Ajuste Linear – SAS 6.12

Ensaio Preliminares

Title'Ensaio-Curcuma-BTU:250bar/30oC/3.7 l/min, CO2+etanol, Mara';

data m180701; input tmin mext;

AL1 = max(tmin-120,0);

Cards;

30	1.2523
60	1.9207
90	2.6384
120	3.3162
150	3.6259
180	3.7986
210	4.0063
240	4.1297
270	4.2900
300	4.4465
330	4.5154
360	4.5858
390	4.6649

Proc Reg;

Model mext = tmin AL1;

Output out = a p=mextthat r= Mres;

Proc print;

Axis1 order = (0 to 4.7 by 0.5);

Proc gplot; Plot Mres*mextthat;

Proc gplot;

Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color = black;

Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 mextthat*tmin/legend overlay vaxis = axis1;

Run;

Programa de Ajuste Não Linear –SAS 6.12

Title 'Ensaio-Curcuma-BTU:250bar/30oC/3.7 ml/min, CO2+etanol, Mara';

data m180701; input tmin mext;

AL1 = max(tmin-120,0);

Cards;

30	1.2523
60	1.9207
90	2.6384
120	3.3162
150	3.6259
180	3.7986
210	4.0063
240	4.1297
270	4.2900
300	4.4465
330	4.5154
360	4.5858
390	4.6649

Proc Nlin; parms b0 = 0.45008

 b1 = 0.02512

 b2 = -0.02018

 knot1 = 120,;

 AL1 = max(tmin-knot1,0);

Model mext = b0 + b1*tmin + b2*AL1;

Output out = a p=mextthat r= Mres;

Axis order = (0 to 4.7 by 0.5);

Proc gplot; Plot Mres*mextthat; **Proc gplot;**

Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color = black;

Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 mextthat*tmin/legend overlay vaxis = axis1;

Run;

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-BTU:250bar/30oC/3.7 ml/min, CO2+etanol, Mara 3

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	0.4501	0.0251	-0.0202	120.0	0.0851
1	0.5510	0.0231	-0.0183	128.0	0.0540
2	0.5545	0.0230	-0.0187	133.9	0.0315
3	0.5546	0.0230	-0.0187	133.7	0.0315

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	3
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000932
Object	0.001549
Objective	0.031494
Observations Read	13
Observations Used	13
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	185.2	46.3052	1325.57	<.0001
Residual	9	0.0315	0.00350		
Uncorrected Total	13	185.3			
Corrected Total	12	13.9474			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	0.5546	0.0725	0.3907	0.7184
b1	0.0230	0.000882	0.0210	0.0250
b2	-0.0187	0.000918	-0.0207	-0.0166
knot1	133.7	3.8441	125.0	142.4

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8770580	0.4906644
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9607689	-0.7218154
b2	0.8770580	-0.9607689	1.0000000	0.5594435
knot1	0.4906644	-0.7218154	0.5594435	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Title 'Ensaio-Curcuma-MF:200/300bar/30oC/4.0 ml/min, CO2+etanol, Mara';

Iterative Phase

Dependent Variable mext

Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.1567	0.0160	-0.0123	160.0	0.0245
1	-0.1303	0.0155	-0.0121	165.8	0.0200
2	-0.1303	0.0155	-0.0121	165.9	0.0199

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.00066
Object	0.000787
Objective	0.019942
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	83.9985	20.9996	2254.66	<.0001
Residual	11	0.0199	0.00181		
Uncorrected Total	15	84.0185			
Corrected Total	14	12.2823			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.1303	0.0396	-0.2176	-0.0431
b1	0.0155	0.000407	0.0146	0.0164
b2	-0.0121	0.000463	-0.0131	-0.0111
knot1	165.9	3.7941	157.5	174.2

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8987170	0.7907656	0.4597188
b1	-0.8987170	1.0000000	-0.8798827	-0.6967287
b2	0.7907656	-0.8798827	1.0000000	0.3640858
knot1	0.4597188	-0.6967287	0.3640858	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Title 'Ensaio-Curcuma-MF:150bar/30oC/3.0ml/min, CO2+etanol, Mara';

Iterative Phase

Dependent Variable mext

Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.1725	0.00519	-0.00238	200.0	0.0158
1	-0.1509	0.00491	-0.00226	224.0	0.0152
2	-0.1628	0.00506	-0.00247	217.2	0.0141
3	-0.1628	0.00506	-0.00247	217.8	0.0141

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	3
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.002678
Object	0.001027
Objective	0.014099
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	11.4250	2.8563	746.24	<.0001
Residual	11	0.0141	0.00128		
Uncorrected Total	15	11.4391			
Corrected Total	14	2.8836			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.1628	0.0279	-0.2242	-0.1014
b1	0.00506	0.000221	0.00458	0.00555
b2	-0.00247	0.000349	-0.00324	-0.00171
knot1	217.8	15.0105	184.8	250.8

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8911328	0.5636019	0.4035770
b1	-0.8911328	1.0000000	-0.6324555	-0.6263971
b2	0.5636019	-0.6324555	1.0000000	-0.0677988
knot1	0.4035770	-0.6263971	-0.0677988	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Title 'Ensaio-Curcuma-MF(junto):150bar/30oC/3.0ml/min, CO2+etanol, Mara';

Iterative Phase

Dependent Variable mext

Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	0.5375	0.0247	-0.0221	200.0	1.2281
1	0.2052	0.0290	-0.0239	161.7	0.6727
2	0.0604	0.0310	-0.0264	159.5	0.5513
3	0.0604	0.0310	-0.0264	159.7	0.5510

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	3
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.001284
Object	0.000478
Objective	0.551003
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	329.9	82.4873	201.30	<.0001
Residual	10	0.5510	0.0551		
Uncorrected Total	14	330.5			
Corrected Total	13	33.8266			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	0.0604	0.2462	-0.4882	0.6089
b1	0.0310	0.00247	0.0255	0.0366
b2	-0.0264	0.00276	-0.0325	-0.0203
knot1	159.7	9.8850	137.7	181.7

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9045340	0.8122955	0.4262108
b1	-0.9045340	1.0000000	-0.8980265	-0.6607460
b2	0.8122955	-0.8980265	1.0000000	0.3476672
knot1	0.4262108	-0.6607460	0.3476672	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Primeiro grupo de ensaios

Ensaio-Curcuma-MF:200bar/30oC/4ml/min, CO2+isopropanol, Mara 21

The NLIN Procedure
Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.3153	0.0442	-0.0409	110.0	0.0449
1	-0.3094	0.0441	-0.0408	110.3	0.0448
2	-0.3094	0.0441	-0.0408	110.3	0.0448

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	6.948E-6
Object	2.4E-7
Objective	0.044759
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	308.0	76.9896	2149.93	<.0001
Residual	11	0.0448	0.00407		
Uncorrected Total	15	308.0			
Corrected Total	14	26.2886			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.3094	0.0781	-0.4813	-0.1374
b1	0.0441	0.00114	0.0416	0.0466
b2	-0.0408	0.00117	-0.0434	-0.0382
knot1	110.3	1.8207	106.3	114.3

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8928054	0.4948474
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9780193	-0.7341466
b2	0.8928054	-0.9780193	1.0000000	0.6225691
knot1	0.4948474	-0.7341466	0.6225691	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-MF:300bar/30oC/4ml/min, CO2+isopropanol, Mara 27

The NLIN Procedure
Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.8841	0.0432	-0.0366	150.0	0.3366
1	-0.9073	0.0436	-0.0369	148.7	0.3350
2	-0.9073	0.0436	-0.0369	148.7	0.3350

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000078
Object	5.45E-6
Objective	0.335
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	445.4	111.3	735.05	<.0001
Residual	11	0.3350	0.0305		
Uncorrected Total	15	445.7			
Corrected Total	14	67.4916			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.9073	0.1830	-1.3101	-0.5045
b1	0.0436	0.00221	0.0388	0.0485
b2	-0.0369	0.00234	-0.0420	-0.0317
knot1	148.7	5.6383	136.3	161.1

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9045340	0.8542422	0.5475568
b1	-0.9045340	1.0000000	-0.9444003	-0.7822487
b2	0.8542422	-0.9444003	1.0000000	0.6004846
knot1	0.5475568	-0.7822487	0.6004846	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-MF:200bar/30oC/4ml/min, CO2+isoeta, Mara 31

The NLIN Procedure
 Iterative Phase
 Dependent Variable mext
 Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.7968	0.0496	-0.0463	105.0	0.1931
1	-0.6640	0.0466	-0.0437	110.9	0.1356
2	-0.6640	0.0466	-0.0437	111.2	0.1331

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.003079
Object	0.018077
Objective	0.133104
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	292.8	73.1996	775.54	<.0001
Residual	11	0.1331	0.0121		
Uncorrected Total	15	292.9			
Corrected Total	14	28.2860			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.6640	0.1347	-0.9605	-0.3675
b1	0.0466	0.00197	0.0422	0.0509
b2	-0.0437	0.00201	-0.0482	-0.0393
knot1	111.2	2.9556	104.7	117.7

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8928054	0.5032046
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9780193	-0.7415739
b2	0.8928054	-0.9780193	1.0000000	0.6313153
knot1	0.5032046	-0.7415739	0.6313153	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-MF:300bar/30oC/4ml/min, CO2+isoeta, Mara 37

The NLIN Procedure
 Iterative Phase
 Dependent Variable mext
 Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.6416	0.0375	-0.0306	140.0	0.2977
1	-0.6667	0.0379	-0.0309	138.2	0.2953
2	-0.6667	0.0379	-0.0309	138.2	0.2953

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000145
Object	0.000013
Objective	0.295267
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	331.9	82.9692	585.03	<.0001
Residual	11	0.2953	0.0268		
Uncorrected Total	15	332.2			
Corrected Total	14	47.4063			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.6667	0.1718	-1.0449	-0.2885
b1	0.0379	0.00207	0.0334	0.0425
b2	-0.0309	0.00219	-0.0358	-0.0261
knot1	138.2	5.8936	125.3	151.2

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9045340	0.8542422	0.4785439
b1	-0.9045340	1.0000000	-0.9444003	-0.7184398
b2	0.8542422	-0.9444003	1.0000000	0.5168371
knot1	0.4785439	-0.7184398	0.5168371	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-MF:200bar/30oC/4ml/min, CO2+eta, Mara

42

The NLIN Procedure
 Iterative Phase
 Dependent Variable mext
 Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.3301	0.0311	-0.0280	135.0	0.1646
1	-0.3337	0.0312	-0.0281	134.7	0.1645
2	-0.3337	0.0312	-0.0281	134.7	0.1645

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	3.873E-6
Object	1.303E-8
Objective	0.164543
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	209.2	52.3111	528.07	<.0001
Residual	11	0.1645	0.0150		
Uncorrected Total	15	209.4			
Corrected Total	14	23.8617			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.3337	0.1283	-0.6161	-0.0514
b1	0.0312	0.00155	0.0278	0.0346
b2	-0.0281	0.00164	-0.0317	-0.0245
knot1	134.7	4.7473	124.3	145.2

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9045340	0.8542422	0.4519348
b1	-0.9045340	1.0000000	-0.9444003	-0.6931307
b2	0.8542422	-0.9444003	1.0000000	0.4847471
knot1	0.4519348	-0.6931307	0.4847471	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-MF:300bar/30oC/4ml/min, CO2+eta, Mara

47

The NLIN Procedure
 Iterative Phase
 Dependent Variable mext
 Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.6676	0.0219	-0.0181	200.0	0.0877
1	-0.6635	0.0219	-0.0180	200.6	0.0844
2	-0.6289	0.0214	-0.0184	209.7	0.0607
3	-0.6289	0.0214	-0.0184	209.5	0.0606

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	3
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000923
Object	0.001466
Objective	0.060562
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	156.7	39.1743	1982.79	<.0001
Residual	11	0.0606	0.00551		
Uncorrected Total	15	156.8			
Corrected Total	14	32.8100			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.6289	0.0578	-0.7562	-0.5017
b1	0.0214	0.000458	0.0204	0.0224
b2	-0.0184	0.000724	-0.0200	-0.0168
knot1	209.5	4.2140	200.2	218.8

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8911328	0.5636019	0.3567170
b1	-0.8911328	1.0000000	-0.6324555	-0.5723872
b2	0.5636019	-0.6324555	1.0000000	-0.1445041
knot1	0.3567170	-0.5723872	-0.1445041	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Segundo grupo de ensaios

Ensaio-Curcuma-MF:300bar/30oC/4ml/min, CO2+eta/iso (10%), Mara 3

The NLIN Procedure
Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	0.4611	0.0609	-0.0555	90.0000	0.4075
1	0.0588	0.0710	-0.0651	78.8971	0.3494
2	0.0588	0.0710	-0.0651	80.5406	0.2119

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.020831
Object	0.393566
Objective	0.211863
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	587.6	146.9	560.07	<.0001
Residual	11	0.2119	0.0193		
Uncorrected Total	15	587.8			
Corrected Total	14	32.5733			
Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		
b0	0.0588	0.2120	-0.4078	0.5254	
b1	0.0710	0.00393	0.0624	0.0797	
b2	-0.0651	0.00395	-0.0738	-0.0564	
knot1	80.5406	2.5556	74.9156	86.1655	

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9258201	0.9194130	0.4848545
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9930795	-0.7202237
b2	0.9194130	-0.9930795	1.0000000	0.6638285
knot1	0.4848545	-0.7202237	0.6638285	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-MF:300bar/30oC/4ml/min, CO2+etanol/isopropanol (5%), Mara 13

The NLIN Procedure
Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-1.2579	0.0575	-0.0523	102.0	0.2536
1	-1.0361	0.0523	-0.0480	111.1	0.0750
2	-1.0361	0.0523	-0.0480	111.9	0.0581

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.007354
Object	0.225602
Objective	0.058066
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	353.1	88.2841	2502.61	<.0001
Residual	11	0.0581	0.00528		
Uncorrected Total	15	353.2			
Corrected Total	14	39.6897			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-1.0361	0.0890	-1.2319	-0.8402
b1	0.0523	0.00130	0.0495	0.0552
b2	-0.0480	0.00133	-0.0509	-0.0451
knot1	111.9	1.7907	108.0	115.9

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8928054	0.5095571
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9780193	-0.7471946
b2	0.8928054	-0.9780193	1.0000000	0.6379546
knot1	0.5095571	-0.7471946	0.6379546	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-MF:300bar/30oC/2ml/min, CO2+eta/iso (10%), Mara 18

The NLIN Procedure
Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.4010	0.0642	-0.0579	90.0000	0.2587
1	-0.4621	0.0657	-0.0593	88.3843	0.2542
2	-0.4621	0.0657	-0.0593	88.4241	0.2542

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000451
Object	0.000264
Objective	0.254166
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	Approx F Value	Pr > F
Regression	4	510.8	127.7	551.63	<.0001
Residual	11	0.2542	0.0231		
Uncorrected Total	15	511.0			
Corrected Total	14	38.4922			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.4621	0.2322	-0.9731	0.0490
b1	0.0657	0.00430	0.0563	0.0752
b2	-0.0593	0.00433	-0.0688	-0.0498
knot1	88.4241	3.4824	80.7593	96.0889

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9258201	0.9194130	0.5798770
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9930795	-0.7997969
b2	0.9194130	-0.9930795	1.0000000	0.7511635
knot1	0.5798770	-0.7997969	0.7511635	1.0000000

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-BTU:300bar/30oC/2.0 ml/min, CO2+etanol/isopropanol(5%), Mara 3

Non-Linear Least Squares Iterative Phase
Dependent Variable MEXT
Method: Gauss-Newton

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.627453	0.047009	-0.041849	105.000000	0.099673
1	-0.572500	0.045763	-0.040796	107.680381	0.089487
2	-0.572500	0.045763	-0.040796	107.749546	0.089400
3	-0.572500	0.045763	-0.040796	107.749546	0.089400

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	311.37244	77.843110
Residual	11	0.0893996	0.008127
Uncorrected Total	15	311.46184	
(Corrected Total)	14	30.956177	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.5725000	0.1104122370	-0.81551662	-0.32948338
B1	0.0457632	0.0016126739	0.04221372	0.04931268
B2	-0.0407963	0.0016489183	-0.04442555	-0.03716703
KNOT1	107.7495459	2.5102722053	102.22445289	113.27463883

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.912870929	0.8928053815	0.4707818706
B1	-0.912870929	1	-0.978019294	-0.712556484
B2	0.8928053815	-0.978019294	1	0.5973113858
KNOT1	0.4707818706	-0.712556484	0.5973113858	1

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-BTU:300bar/30oC/1,0 ml/min, CO2+etanol/iso (10%), Mara 1

Non-Linear Least Squares Iterative Phase
Dependent Variable MEXT Method: Gauss-Newton

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.357719	0.020755	-0.014864	225.000000	0.181992
1	-0.481232	0.022238	-0.014864	200.071361	0.053846
2	-0.481232	0.022238	-0.014864	200.070722	0.053846
3	-0.481232	0.022238	-0.014864	200.070722	0.053846

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	201.53410944	50.38352736
Residual	11	0.05384564	0.00489506
Uncorrected Total	15	201.58795508	
(Corrected Total)	14	40.88561856	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.4812321	0.0545160483	-0.60122161	-0.36124267
B1	0.0222376	0.0004318314	0.02128716	0.02318808
B2	-0.0148636	0.0006827855	-0.01636643	-0.01336081
KNOT1	200.070722	5.0050905177	189.05455035	211.08689440

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.891132789	0.563601862	0.3021086753
B1	-0.891132789	1	-0.632455532	-0.508319416
B2	0.563601862	-0.632455532	1	-0.228800761
KNOT1	0.3021086753	-0.508319416	-0.228800761	1

Saída do Programa de Ajuste Não Linear-SAS 6.12

Ensaio-Curcuma-MF:300bar/30oC/1ml/min, CO2+etaiso (5%), Mara 8

The NLIN Procedure
Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.4507	0.0187	-0.0114	180.0	0.0572
1	-0.4108	0.0181	-0.0113	192.0	0.0398
2	-0.4108	0.0181	-0.0113	192.1	0.0398

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000337
Object	0.000107
Objective	0.039785
Observations Read	15
Observations Used	15
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	131.5	32.8782	2494.16	<.0001
Residual	11	0.0398	0.00362		
Uncorrected Total	15	131.6			
Corrected Total	14	27.1026			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.4108	0.0508	-0.5226	-0.2989
b1	0.0181	0.000455	0.0171	0.0191
b2	-0.0113	0.000587	-0.0126	-0.0100
knot1	192.1	5.5803	179.8	204.4

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8944272	0.6928203	0.4326019
b1	-0.8944272	1.0000000	-0.7745967	-0.6639153
b2	0.6928203	-0.7745967	1.0000000	0.1589995
knot1	0.4326019	-0.6639153	0.1589995	1.0000000

Anexo VI- Perfil Fitoquímico dos ensaios de ESC e do óleo volátil capturado em adsorvente

Primeiro grupo de ensaios

Tabela 1. Perfil Fitoquímico da Extração de C. longa por ESC com de co-solvente Etanol (5,58% massa), com vazão de $4,45 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar.

Substâncias	Tempo de Extração					A.1	A.2	Média
	75 min	175 min	225 min	375 min	Média			
	Composição (%área)							
Felandreno	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
α -pineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	1,2341	1,9914	1,6128
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	tr	2,0617	2,0617
Ar-curcumeno	2,4766	2,0595	tr	tr	2,2681	1,4913	2,3263	1,9088
α -zingibereno	1,5900	tr	tr	tr	1,5900	3,4287	5,0020	4,2154
β -bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr	0,4957	tr	0,4957
β -sesquifelandreno	3,0889	2,3486	1,6424	tr	2,3600	2,8273	4,0843	3,4558
Ar-turmerol	1,1581	1,2858	tr	tr	1,2220	0,7347	0,8909	0,8128
isômero do ar-turmerol	1,0774	1,3514	1,4201	tr	1,2830	0,7196	0,9241	0,8219
Ar-turmerona	31,4190	33,7800	25,7739	21,6049	28,1445	19,6766	16,3473	18,0120
(Z)- γ -atlantona	24,6643	18,7789	25,6203	27,8138	24,2193	32,8628	33,6934	33,2781
(E)- γ -atlantona	21,8869	20,9759	19,5870	18,5607	20,2526	17,3289	17,0258	17,1774
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	0,3793	tr	0,3793
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr	0,5516	tr	0,5516
6S, 7R-bisabolona	1,0743	1,2108	1,2650	tr	1,1834	0,7616	0,8910	0,8263
(Z)- α -atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	0,5050	tr	0,5050
(E)- α -Atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	0,3238	tr	0,3238
Total	88,4355	81,7909	75,3087	67,9794	78,3786	83,3210	85,2382	84,2796

A= Adsorvente

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 2 Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com de co-solvente Etanol (6,43% massa), com vazão de $3,83 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

Substâncias	Tempo de Extração					A.1	A.2	Média
	75 min	150 min	225 min	375 min	Média			
	Composição (%área)							
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α -pineno	tr	tr	tr	tr	tr	0,5036	0,5000	0,5018
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	1,6617	0,6684	1,1651
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	0,7993	1,1059	0,9526
Ar-curcumeno	2,1983	1,7152	1,9558	tr	1,9564	1,7957	1,6864	1,7411
α -zingibereno	1,7180	2,0821	tr	tr	1,9001	3,6005	4,0042	3,8024
β -bisaboleno	tr	0,5121	tr	tr	0,5121	0,5702	0,5659	0,5681
β -sesquifelandreno	2,8654	2,6008	2,2177	tr	2,5613	3,1561	3,1513	3,1537
Ar-turmerol	0,9652	0,9018	1,2230	tr	1,0300	0,7766	0,8407	0,8087
isômero do ar-turmerol	0,9249	0,9331	1,2943	1,2951	1,1119	0,7270	0,8527	0,7899
Ar-turmerona	27,9814	23,1334	32,7636	23,7714	26,9125	19,1733	15,3847	17,2790
(Z)- γ -atlantona	25,7539	30,7938	16,6193	25,7914	24,7396	32,1375	35,4858	33,8117
(E)- γ -atlantona	20,2571	19,6185	20,0851	19,1033	19,7660	17,1574	16,7196	16,9385
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	0,3987	0,4451	0,4219
1-epi-cubenol	0,6424	0,6585	0,8182	tr	0,7064	0,5573	0,6410	0,5992
6S, 7R-bisabolona	0,9131	0,9168	1,1598	1,2722	1,0655	0,7329	0,8174	0,7752
(Z)- α -atlantona	tr	0,4883	tr	tr	0,4883	0,4927	0,4961	0,4944
(E)- α -Atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	0,2924	0,4872	0,3898
Total	84,2197	84,3544	78,1368	71,2334	79,4861	84,5329	83,8524	84,1927

A= Adsorvente

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 3. Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com de co-solvente Isopropanol (6,23% massa), com vazão de $3,94 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar.

Substâncias	Tempo de Extração					A.1	A.2	Média
	75 min	150 min	225 min	425 min	Média			
	Composição (%área)							
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	tr	tr	tr
α-pineno	tr	tr	tr	tr	tr	0,1230	2,0305	1,0768
1,8-cineol	0,1848	tr	tr	tr	0,1848	0,2562	1,6754	0,9658
Trans-cariofileno	0,4294	0,2455	tr	tr	0,3375	0,5343	1,8486	1,1915
Ar-curcumeno	1,1899	0,8095	0,6005	0,6647	0,8162	1,1779	1,9942	1,5861
α-zingibereno	2,8084	1,8744	1,4049	1,7962	1,9710	2,9029	4,8228	3,8629
β-bisaboleno	0,4489	0,3227	0,2481	tr	0,3399	0,3998	tr	0,3998
β-sesquifelandreno	2,3829	1,6620	1,2723	1,5173	1,7086	2,3415	3,5489	2,9452
Ar-turmerol	0,7238	0,8038	0,7566	0,6570	0,7353	0,7120	tr	0,7120
isômero do ar-turmerol	0,7109	0,9132	0,9013	0,7670	0,8231	0,7032	tr	0,7032
Ar-turmerona	17,3008	17,2329	14,0919	13,1448	15,4426	22,5645	15,0696	18,8171
(Z)-γ-atlantona	38,3822	36,4006	32,1584	34,6801	35,4053	31,3432	38,4030	34,8731
(E)-γ-atlantona	18,1592	17,8008	15,8856	15,8602	16,9265	17,5822	17,4280	17,5051
Dihidro-Ar-turmerona	0,3669	0,4371	0,4351	tr	0,4130	0,3719	tr	0,3719
1-epi-cubenol	n.i.	0,6709	0,6451	0,5948	0,6369	0,5436	tr	0,5436
6S, 7R-bisabolona	0,7772	0,9534	1,0493	0,8702	0,9125	0,8255	tr	0,8255
(Z)-α-atlantona	0,3769	0,4241	0,4788	0,6130	0,4732	0,4535	tr	0,4535
(E)-α-Atlantona	0,2951	0,5143	0,9836	tr	0,5977	0,3842	3,4977	1,9410
Total	84,5373	81,0652	70,9115	71,1653	76,9198	83,2194	90,3187	86,7691

A= Adsorvente

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 4 Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com de co-solvente Isopropanol (6,68% massa), com vazão de $3,66 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

Substâncias	Tempo de Extração					A.1	A.2	Média
	75 min	150 min	225 min	425 min	Média			
	Composição (%área)							
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α-pineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Trans-cariofileno	0,4600	0,3145	tr	tr	0,3873	0,4642	1,5226	0,9934
Ar-curcumeno	1,1861	0,9546	0,7217	tr	0,9541	1,1190	1,9161	1,5176
α-zingibereno	3,1333	2,4256	1,4711	2,4674	2,3744	2,8451	4,6243	3,7347
β-bisaboleno	0,4304	0,3891	tr	tr	0,4098	0,4359	tr	0,4359
β-sesquifelandreno	2,5140	2,0200	1,3735	1,9984	1,9765	2,2918	tr	2,2918
Ar-turmerol	0,7179	0,7630	0,7685	tr	0,7498	0,7017	tr	0,7017
isômero do ar-turmerol	0,6874	0,8188	0,8998	tr	0,8020	0,7078	tr	0,7078
Ar-turmerona	15,1261	15,3544	14,7611	15,0366	15,0696	22,7965	15,5283	19,1624
(Z)-γ-atlantona	41,6536	39,5749	35,0739	41,4953	39,4494	31,2647	39,5543	35,4095
(E)-γ-atlantona	18,3432	18,1004	17,1486	18,5164	18,0272	17,5953	17,7897	17,6925
Dihidro-Ar-turmerona	0,3725	0,4110	tr	tr	0,3918	0,3693	tr	0,3693
1-epi-cubenol	0,5533	0,6231	0,6697	tr	0,6154	0,5496	tr	0,5496
65, 7R-bisabolona	0,7850	0,8965	1,0223	tr	0,9013	0,8072	tr	0,8072
(Z)-α-atlantona	tr	0,4064	0,4642	tr	0,4353	0,4498	tr	0,4498
(E)-α-Atlantona	tr	0,4988	0,8328	tr	0,6658	0,3670	tr	0,3670
Total	85,9628	83,5511	75,2072	79,5141	81,0588	82,7649	80,9353	81,8501

A= Adsorvente

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 5. Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com de co-solvente Etanol/ Isopropanol (6,03% massa), com vazão de $4,09 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar.

Substâncias	Tempo de Extração					A.1	A.2	Média
	75 min	150 min	225 min	350 min	Média			
	Composição (%área)							
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α -pineno	tr	tr	Tr	tr	tr	tr	9,9905	9,9905
1,8-cineol	tr	tr	Tr	tr	tr	tr	4,2464	4,2464
Trans-cariofileno	0,4857	tr	Tr	tr	0,4857	0,6619	3,6133	2,1376
Ar-curcumeno	1,2779	0,9687	0,7707	0,6604	0,9194	1,2921	3,0325	2,1623
α -zingibereno	3,2238	2,2109	1,5944	1,3618	2,0977	2,9820	7,1314	5,0567
β -bisaboleno	0,4571	tr	tr	tr	0,4571	0,4816	tr	0,4816
β -sesquifelandreno	2,6469	1,9859	1,5980	1,4024	1,9083	2,4638	5,2428	3,8533
Ar-turmerol	0,7248	0,8125	0,7653	0,7297	0,7581	0,7458	tr	0,7458
isômero do ar-turmerol	0,7210	0,9074	0,8586	0,8211	0,8270	0,7732	tr	0,7732
Ar-turmerona	15,6508	16,1938	15,5819	15,0155	15,6105	17,2568	13,6975	15,4772
(Z)- γ -atlantona	40,1050	36,2062	32,1384	31,7717	35,0553	36,0825	32,3690	34,2258
(E)- γ -atlantona	18,1617	17,7571	16,4778	16,2324	17,1573	17,8538	15,2531	16,5535
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	0,3835	tr	0,3835
1-epi-cubenol	0,5596	0,6606	0,6273	0,6010	0,6121	0,5774	tr	0,5774
6S, 7R-bisabolona	0,7955	tr	0,9130	0,8648	0,8578	0,8385	tr	0,8385
(Z)- α -atlantona	0,3748	tr	0,6645	tr	0,5197	0,5208	tr	0,5208
(E)- α -Atlantona	tr	tr	tr	0,5566	0,5566	0,4319	tr	0,4319
Total	85,1846	77,7031	71,9899	70,0174	76,2238	83,3456	94,5765	88,9611

A= Adsorvente

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 6. Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com de co-solvente Etanol/ Isopropanol (7,41% massa), com vazão de $3,54 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

Substâncias	Tempo de Extração					A.1	A.2	Média
	75 min	150 min	225 min	350 min	Média			
	Composição (%área)							
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α-pineno	tr	tr	tr	tr	tr	1,1536	0,6383	0,8960
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	0,2595	0,8601	0,5598
Trans-cariofileno	0,4481	0,3777	0,2626	tr	0,3628	0,5119	0,9071	0,7095
Ar-curcumeno	1,2096	1,1407	0,8216	0,5205	0,9231	1,2601	1,3564	1,3083
α-zingibereno	3,0538	2,7427	1,9393	1,1947	2,2326	2,8475	3,3562	3,1019
β-bisaboleno	0,4372	0,4500	0,3306	tr	0,4059	0,4645	0,4620	0,4633
β-sesquifelandreno	2,5192	2,3572	1,7087	1,1555	1,9352	2,4114	2,6027	2,5071
Ar-turmerol	0,7363	0,7502	0,7755	0,6955	0,7394	0,7087	0,7945	0,7516
isômero do ar-turmerol	0,7243	0,7665	0,8818	0,8169	0,7974	0,6943	0,8404	0,7674
Ar-turmerona	15,6771	16,0417	15,0032	13,0855	14,9519	20,3688	14,1033	17,2361
(Z)-γ-atlantona	41,3066	39,8500	34,9972	28,6618	36,2039	32,4252	36,0004	34,2128
(E)-γ-atlantona	18,5693	18,4563	16,8805	14,4468	17,0882	17,4167	16,4694	16,9431
Dihidro-Ar-turmerona	0,3797	0,3783	0,4199	0,3748	0,3882	0,3614	0,4403	0,4009
1-epi-cubenol	0,5686	0,5888	0,6561	0,5932	0,6017	0,5378	0,6469	0,5924
6S, 7R-bisabolona	0,8038	0,8445	0,9592	0,9009	0,8771	0,7998	0,8623	0,8311
(Z)-α-atlantona	1,0457	0,3742	0,4443	4,9956	1,7150	0,4761	0,5148	0,4955
(E)-α-Atlantona	tr	0,3773	0,7175	1,5327	0,8758	0,3338	0,6164	0,4751
Total	87,4793	85,4961	76,7980	68,9744	79,6870	83,0311	81,4715	82,2513

A= Adsorvente

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Segundo grupo de ensaios

Tabela 7. Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com mistura de co-solvente Etanol e Isopropanol (13,78% massa), com vazão de $3,81 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

Substâncias	Tempo de Extração			Média	Adsorvente
	75 min	175 min	300 min		
	Composição (%área)				
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α -pineno	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	0,9073	tr
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	0,9441	tr	tr	1,0366	tr
α -zingibereno	2,2159	1,9788	tr	2,1058	tr
β -bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr
β -sesquifelandreno	2,0607	1,9492	tr	2,0149	tr
Ar-turmerol	1,0369	tr	tr	1,2099	tr
isômero do ar-turmerol	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-turmerona	17,9658	19,4529	22,3365	20,1729	23,2502
(Z)- γ -atlantona	43,2923	42,3539	47,5323	44,5018	50,6492
(E)- γ -atlantona	21,1909	21,7308	24,7455	22,1325	26,1006
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr
6S, 7R-bisabolona	1,0399	tr	tr	1,0399	tr
(Z)- α -atlantona	tr	tr	tr	0,9207	tr
(E)- α -Atlantona	tr	1,4705	tr	1,4705	tr
Total	89,7465	88,9361	94,6143	91,0990	100,0000

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 8. Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com mistura de co-solvente Etanol e Isopropanol (6,95% massa), com vazão de $4,04 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

Substâncias	Tempo de Extração				Adsorvente
	75 min	175 min	300 min	Média	
	Composição (%área)				
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
a-pineno	tr	tr	tr	tr	tr
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	1,0929	tr	tr	1,0929	2,1695
a-zingibereno	2,5421	1,5663	1,5469	1,8851	4,5495
b-bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr
b-sesquifelandreno	2,3549	1,5318	1,5748	1,8205	4,1758
Ar-turmerol	0,9452	1,0553	tr	1,0003	tr
isômero do ar-turmerol	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-turmerona	17,6035	17,6864	19,4678	18,2526	20,4007
(Z)-g-atlantona	43,9349	39,1740	41,4780	41,5290	46,9533
(E)-g-atlantona	21,2196	20,0438	21,6465	20,9700	21,7512
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr
65, 7R-bisabolona	0,9381	1,2130	tr	1,0756	tr
(Z)-a-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-a-Atlantona	tr	tr	tr	tr	tr
Total	90,6312	82,2706	85,7140	87,6258	100,0000

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 9. Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com mistura de co-solvente Etanol e Isopropanol (13,59% massa), com vazão de $1,93 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

Substâncias	Tempo de Extração				Adsorvente
	75 min	150 min	300 min	Média	
	Composição (%área)				
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α -pineno	tr	tr	tr	tr	4,5141
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	2,9337
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	1,0053	tr	tr	1,0053	tr
α -zingibereno	2,3679	2,0819	tr	2,2249	2,9521
β -bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr
β -sesquifelandreno	tr	1,9748	tr	1,9748	2,7502
Ar-turmerol	tr	tr	tr	tr	tr
isômero do ar-turmerol	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-turmerona	17,7828	18,1557	22,0122	19,3169	19,1852
(Z)- γ -atlantona	43,6611	41,5382	47,2808	44,1600	43,1326
(E)- γ -atlantona	21,2517	20,8395	24,2890	22,1267	21,4073
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr
65, 7R-bisabolona	0,9913	1,1567	tr	1,0740	tr
(Z)- α -atlantona	tr	tr	tr	tr	tr
(E)- α -Atlantona	tr	tr	tr	tr	tr
Total	87.0601	85.7468	93.5820	91.8827	96.8752

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 10. Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com mistura de co-solvente Etanol e Isopropanol (6,66% massa), com vazão de $1,97 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

Substâncias	Tempo de Extração				Adsorvente
	75 min	150 min	300 min	Média	
	Composição (%área)				
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
a-pineno	tr	tr	tr	tr	3,0249
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	1,6098
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr
Ar-curcumeno	1,1023	0,7287	tr	0,9155	1,2559
a-zingibereno	2,5845	1,6942	1,8420	2,0402	2,7035
b-bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr
b-sesquifelandreno	2,3946	1,6043	1,7837	1,9275	2,4863
Ar-turmerol	0,9636	1,0915	tr	1,0276	1,0638
isômero do ar-turmerol	tr	0,6760	tr	0,6760	tr
Ar-turmerona	17,6127	17,1445	18,3542	17,7038	16,8910
(Z)-g-atlantona	44,4018	39,8461	40,3208	41,5229	38,1572
(E)-g-atlantona	21,3539	20,0197	20,6880	20,6872	18,6534
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr
6S, 7R-bisabolona	0,9162	1,1778	1,1929	1,0956	0,9828
(Z)-a-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-a-Atlantona	tr	0,6372	tr	0,6372	tr
total	91,3296	84,6200	84,1816	88,2336	86,8286

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 11. Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com mistura de co-solvente Etanol e Isopropanol (16,11% massa), com vazão de $0,82 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

Substâncias	Tempo de Extração				Média	Adsorvente
	75 min	150 min	225 min	300 min		
	Composição (%área)					
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
a-pineno	tr	tr	tr	tr	tr	1,1568
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	0,9340
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	0,2617
Ar-curcumeno	1,0943	1,0756	0,9353	0,8714	0,9942	1,0229
a-zingibereno	2,5128	2,4623	2,1301	1,9124	2,2544	2,3388
b-bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr	0,3593
b-sesquifelandreno	2,3482	2,2995	2,0071	1,8448	2,1249	2,1051
Ar-turmerol	0,9425	0,9944	1,0490	1,0371	1,0058	0,9706
isômero do ar-turmerol	tr	tr	tr	tr	tr	0,5128
Ar-turmerona	17,6412	17,8310	18,0899	18,0824	17,911 1	16,4294
(Z)-g-atlantona	43,5089	43,6634	42,4209	40,7834	42,594 2	37,6956
(E)-g-atlantona	21,1370	21,2726	21,0615	20,6165	21,021 9	18,6600
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	0,2458
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr	0,4340
6S, 7R-bisabolona	0,9359	0,9596	1,0883	1,1202	1,0260	0,9491
(Z)-a-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-a-Atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	0,4038
total	90,1208	90,5584	88,7821	86,2682	88,932 4	84,4797

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Tabela 12. Perfil Fitoquímico da Extração de *C. longa* por ESC com mistura de co-solvente Etanol e Isopropanol (8,32% massa), com vazão de $0,79 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

	Tempo de Extração					
	75 min	150 min	225 min	300 min	Média	Adsorvente
Substâncias	Composição (%área)					
Felandreno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
a-pineno	tr	tr	tr	tr	tr	0,8527
1,8-cineol	tr	tr	tr	tr	tr	0,9250
Trans-cariofileno	tr	tr	tr	tr	tr	0,2773
Ar-curcumeno	1,0887	1,0778	1,0088	0,8978	1,0183	1,1414
a-zingibereno	2,5356	2,4847	2,3442	1,9996	2,3410	2,6071
b-bisaboleno	tr	tr	tr	tr	tr	0,4152
b-sesquifelandreno	2,3753	2,3146	2,1945	1,8944	2,1947	2,3912
Ar-turmerol	0,9555	0,9670	1,0009	1,0687	0,9980	0,9307
isômero do ar-turmerol	tr	tr	tr	tr	tr	0,4736
					17,684	
Ar-turmerona	18,0266	17,5723	17,6451	17,4926	2	16,7420
					42,952	
(Z)-g-atlantona	44,8356	43,2648	43,0382	40,6723	7	40,8449
					21,020	
(E)-g-atlantona	21,7242	21,0228	21,0314	20,3035	5	19,9552
Dihidro-Ar-turmerona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1-epi-cubenol	tr	tr	tr	tr	tr	0,4023
6S, 7R-bisabolona	0,9461	0,9276	0,9687	1,0952	0,9844	0,8671
(Z)-a-atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-a-Atlantona	tr	tr	tr	tr	tr	tr
					89,193	
Total	92,4876	89,6316	89,2318	85,4241	8	88,8257

Tr=traço, % $\geq 0,27$; n.i.= não identificado

Anexo VII-Perfil dos Curcuminóides durante a ESC

Perfil do CC em função do tempo de extração para os ensaios experimentais.

Primeiro grupo de ensaios

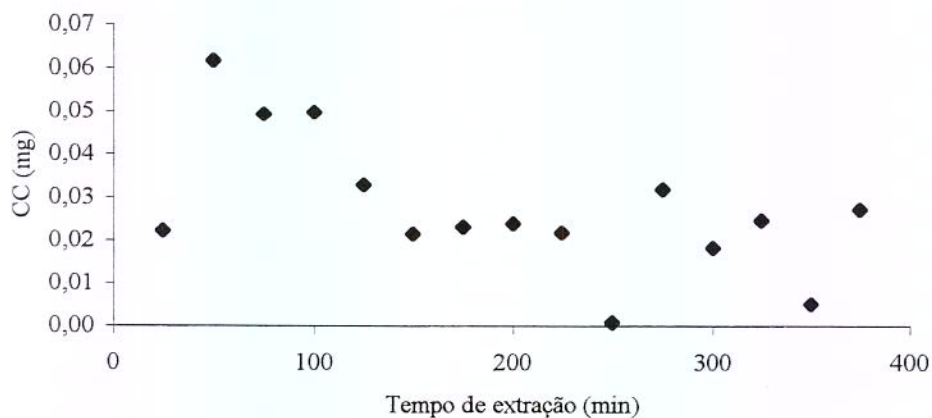


Figura 1. Perfil de concentração dos CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol (5,58%massa), vazão de $4,45 \times 10^5$ kg/s temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar.

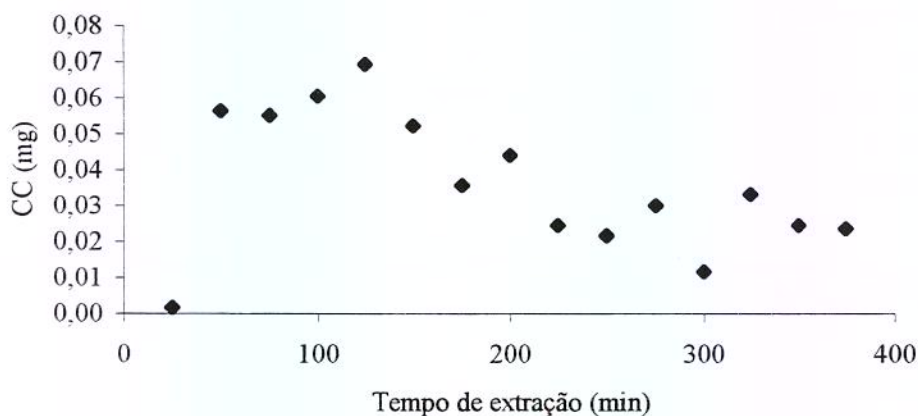


Figura 2. Perfil de concentração dos CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol (6,43%massa), vazão de $3,38 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

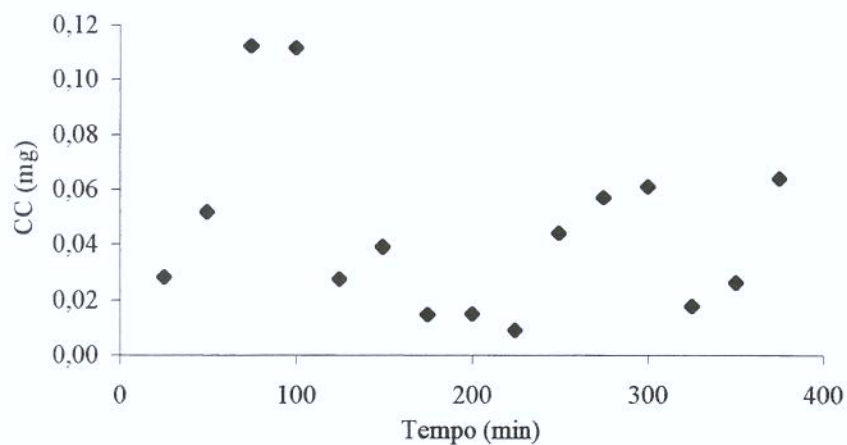


Figura 3. Perfil de concentração dos CC (mg) do ensaio com co-solvente isopropanol (6,23%massa), vazão de $3,94 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar.

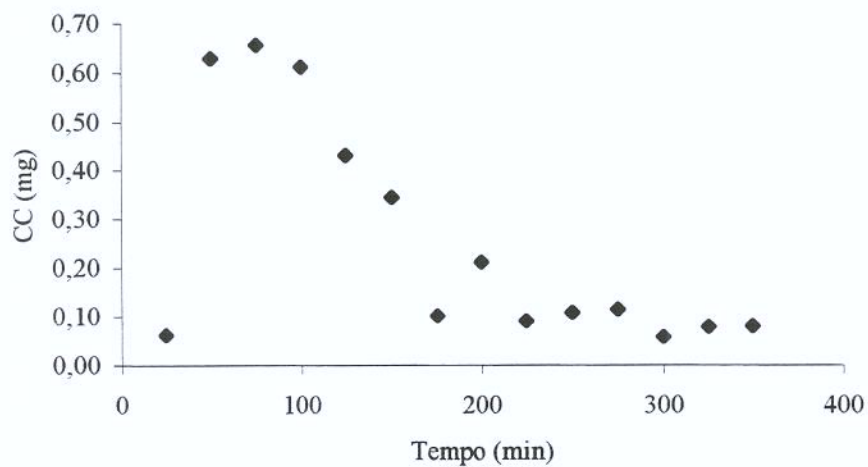


Figura 4. Perfil de concentração dos CC (mg) do ensaio com co-solvente isopropanol (6,68%massa), vazão de $3,66 \times 10^5$ kg/s temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

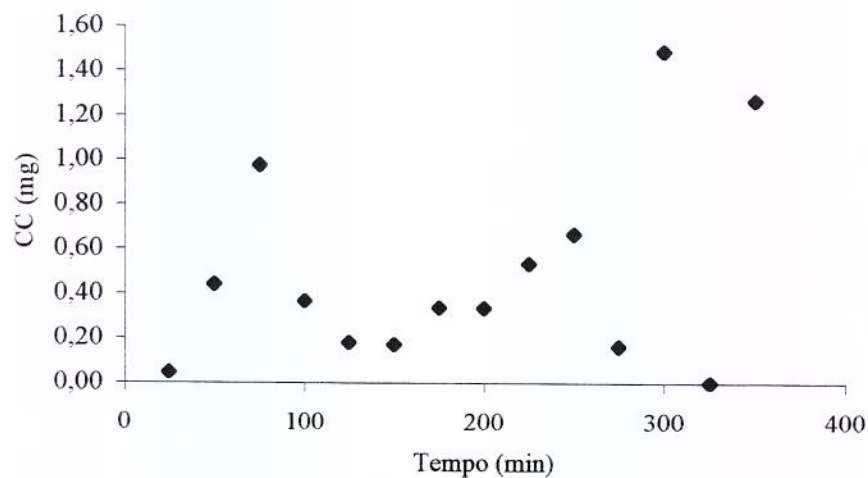


Figura 5. Perfil de concentração dos CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,03%massa), vazão de $4,09 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar.

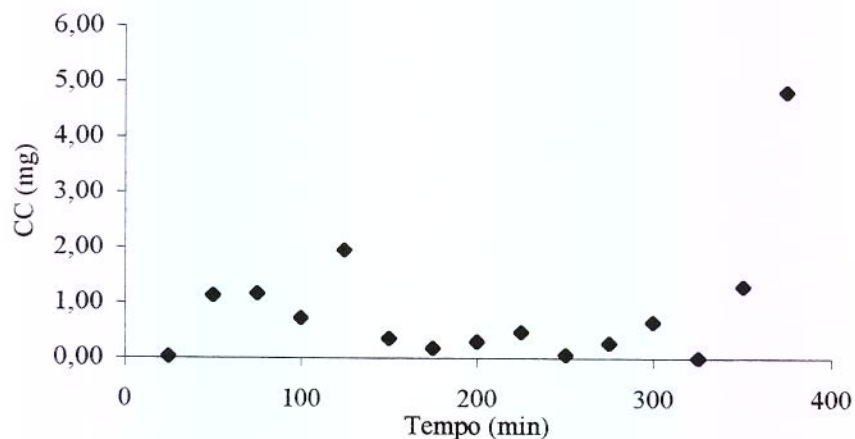


Figura 6. Perfil de concentração dos CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (7,41%massa), vazão de $3,54 \times 10^{-5}$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

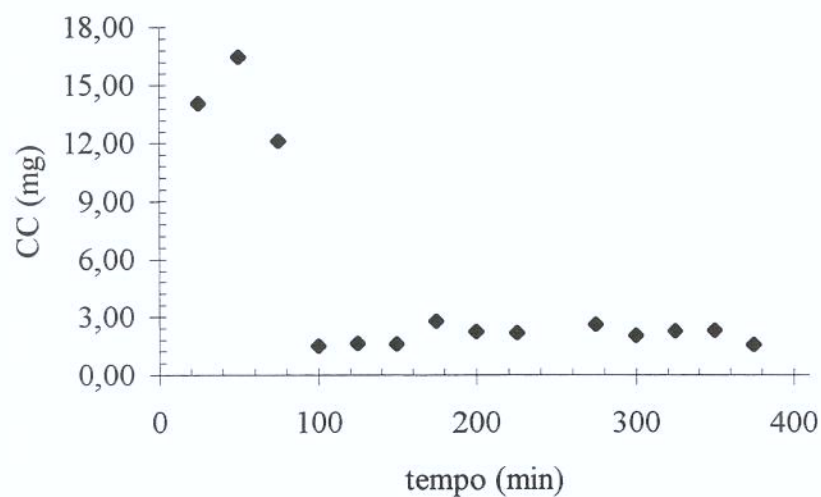
Segundo grupo de ensaios

Figura 7. Perfil de concentração de CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (13,78% em massa), vazão de $3,81 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

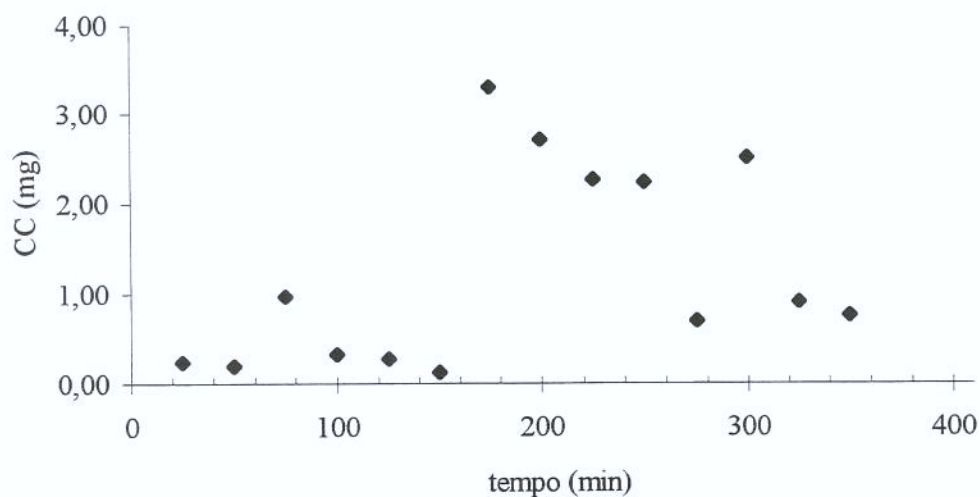


Figura 8. Perfil de concentração de CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,95% em massa), vazão de $4,04 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

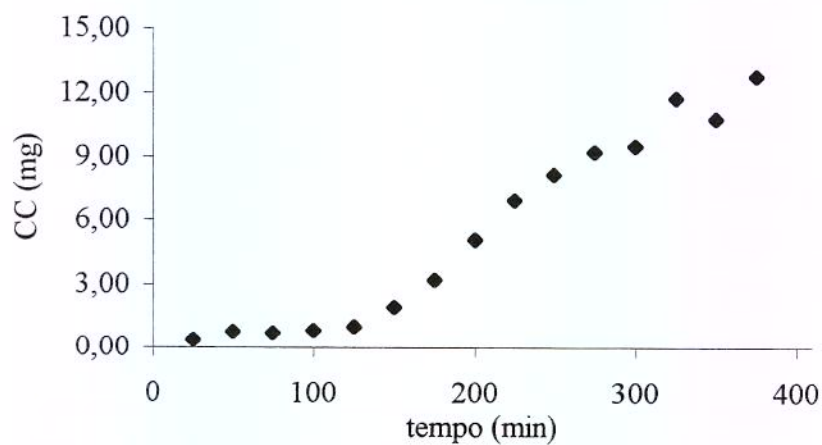


Figura 9. Perfil de concentração de CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (13,59% em massa), vazão de $1,93 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

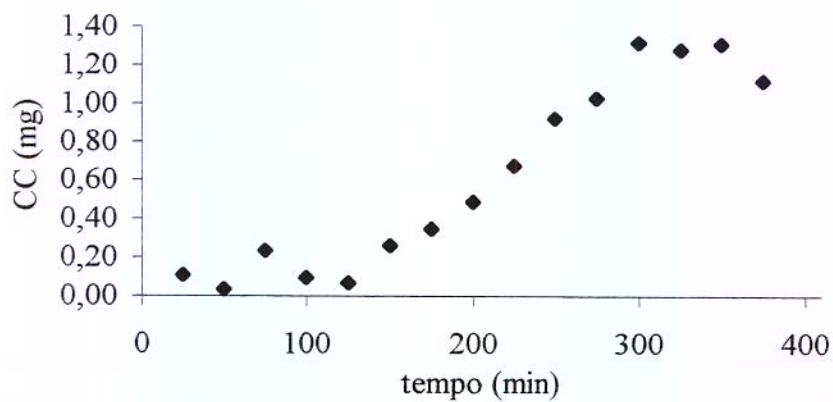


Figura 10. Perfil de concentração de CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,66% em massa), vazão de $1,97 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

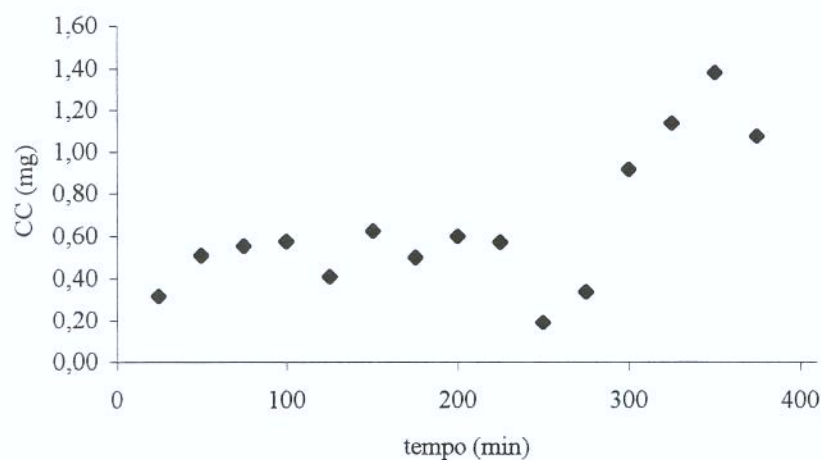


Figura 11. Perfil de concentração de CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (16,11% em massa), vazão de $0,82 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

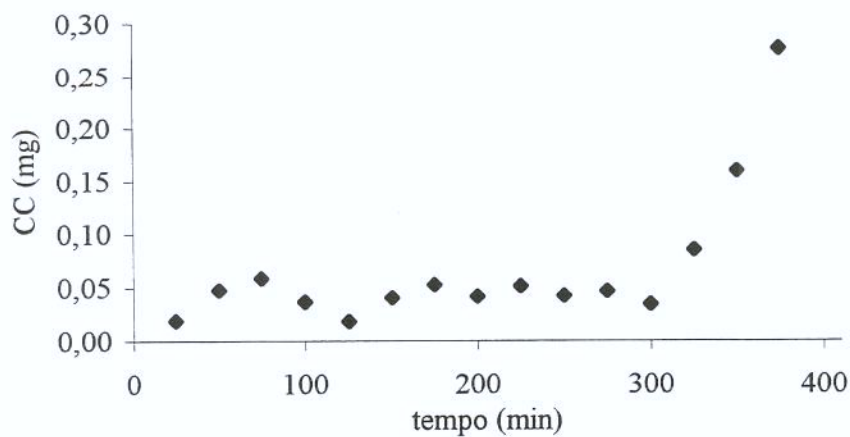


Figura 12 . Perfil de concentração de CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (8,32% em massa), vazão de $0,79 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar .

Anexo VIII- Avaliação da Porcentagem de Co-solvente

Foi necessária a utilização de resfriamento dos frascos coletores com gelo para as porcentagens acima de 5% em volume, visto que nas altas porcentagens o co-solvente foi arrastado para o adsorvente instalado após a saída do extrator. Observa-se na tabela 6 a estabilização da massa de etanol junto ao extrato no final do ensaio. Optou-se então por estabelecer como variável a porcentagem volumétrica de co-solvente de 5 e 10%.

Tabela 1. Tabela do ensaio para avaliação da porcentagem de co-solvente utilizado no segundo delineamento experimental.

t (min)	co-solvente %volumétrica	massa acumulada (g)	Rcg (%)	massa de co-solvente (g)	Condensação
25	10,00	0,8761	0,7782	0,1895	s/ gelo
50	7,50	2,9391	2,6107	0,5769	s/ gelo
75	6,20	2,6847	2,3847	0,5622	s/ gelo
100	6,20	1,8436	1,6376	2,3766	s/ gelo
125	6,00	1,9346	1,7184	0,5656	c/ gelo
150	6,20	0,4796	0,4260	1,4550	c/ gelo
175	7,50	1,0089	0,8962	0,2363	c/ gelo
200	7,50	2,2616	2,0089	0,0533	c/ gelo
225	10,00	2,0004	1,7769	0,6471	c/ gelo
250	10,00	1,3817	1,2273	3,0932	c/ gelo
275	10,00	0,2465	0,2190	1,1531	c/ gelo
300	10,00	0,4350	0,3864	2,7913	c/ gelo
325	10,00	1,2606	1,1197	-0,8163	c/ gelo
350	10,00	1,5938	1,4157	0,0166	c/ gelo
375	10,00	2,3974	2,1295	0,0329	c/ gelo
427	10,00	1,9012	1,6888	0,0215	c/ gelo
400	10,00	2,3387	2,0774	0,0343	c/ gelo
despress.	10,00	1,6979	1,5082	0,0326	c/ gelo

Anexo IX - Atividade Antioxidante

Primeiro grupo de ensaios

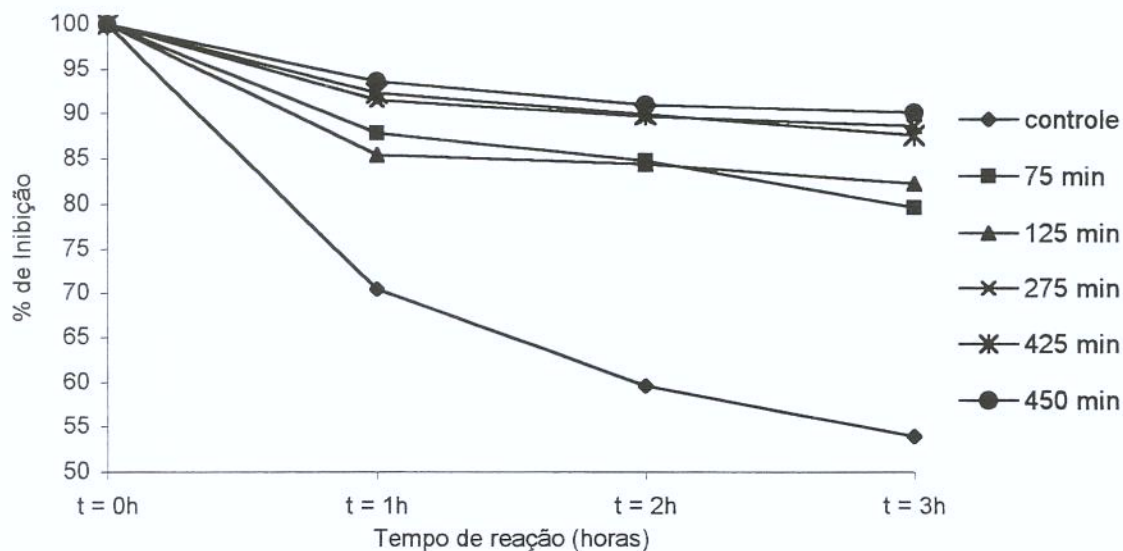


Figura 1. Perfil da Ação Antioxidante do ensaio com co-solvente etanol (5,58% massa), vazão de $4,45 \times 10^5$ kg/s temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar.

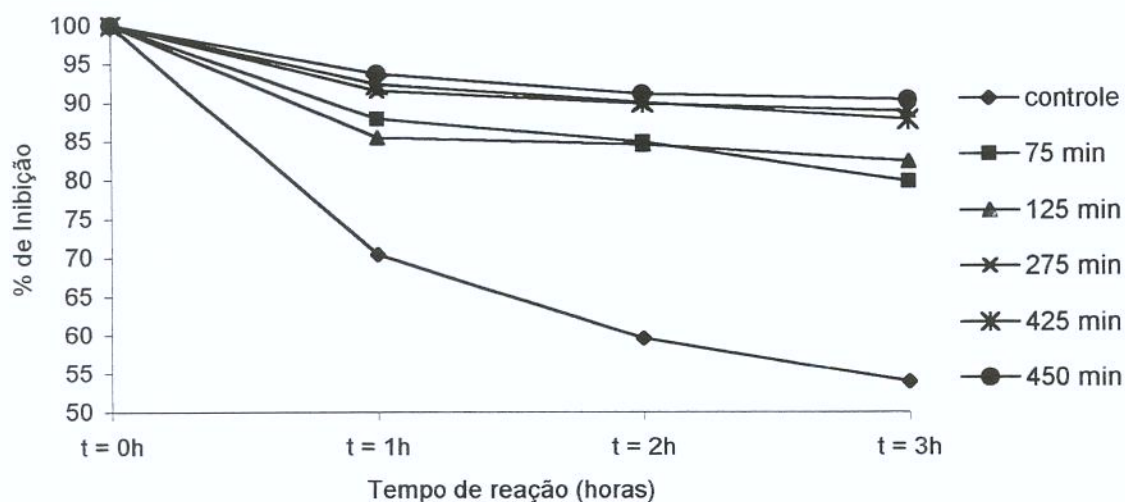


Figura 2. Perfil da Ação Antioxidante do ensaio com co-solvente etanol (6,43% massa), vazão de $3,38 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

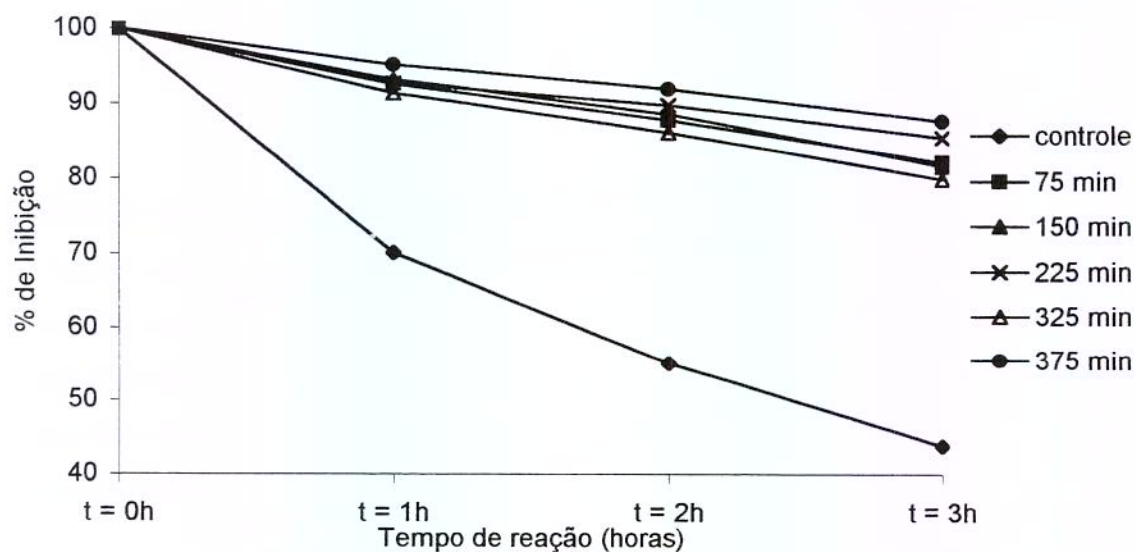


Figura 3. Perfil da Atividade Antioxidante do ensaio com co-solvente isopropanol (6,23%massa), vazão de $3,94 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar.

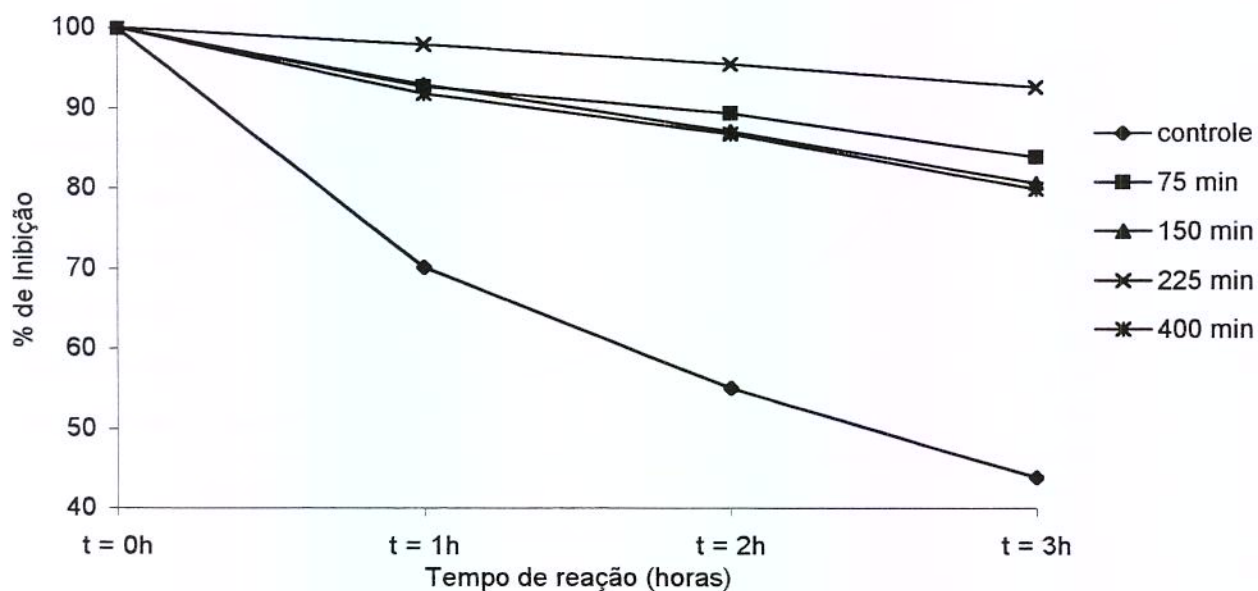


Figura 4. Perfil da Atividade Antioxidante do ensaio com co-solvente isopropanol (6,68%massa), vazão de $3,66 \times 10^5$ kg/s temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

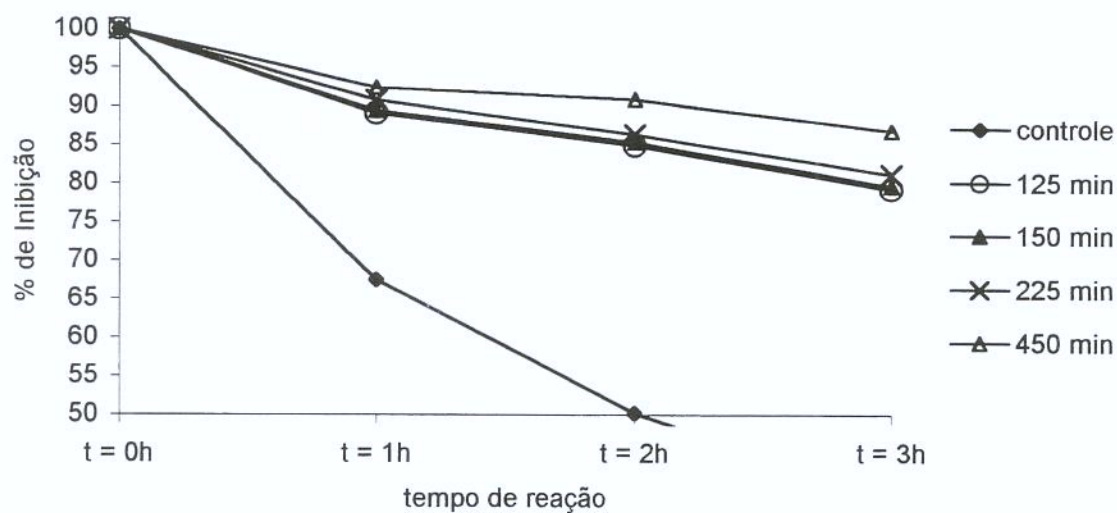


Figura 5. Perfil de concentração dos CC (mg) do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (6,03%massa), vazão de $4,09 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 200 bar.

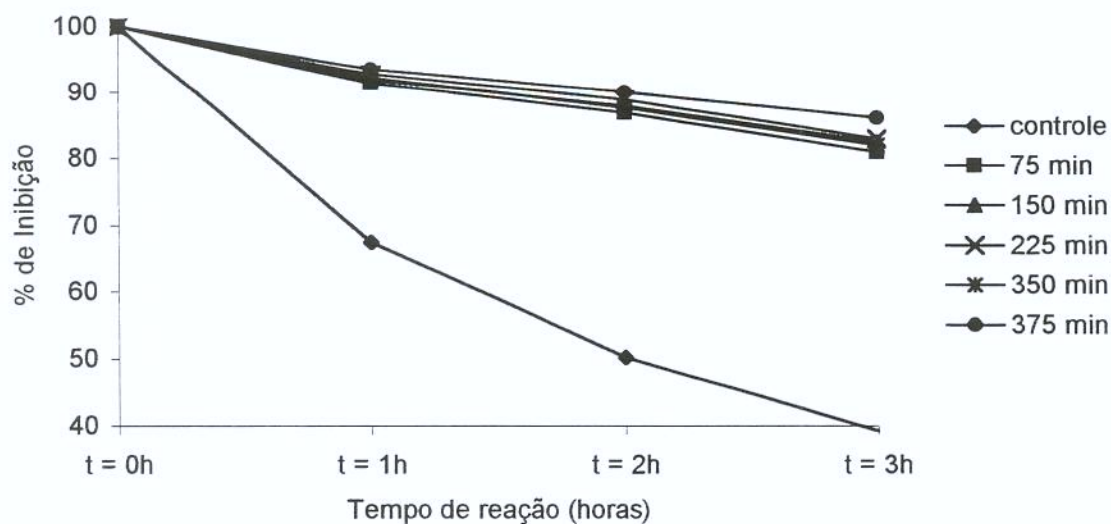


Figura 6. Perfil da Atividade Antioxidante do ensaio com co-solvente etanol/isopropanol (7,41%massa), vazão de $3,54 \times 10^5$ kg/s, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

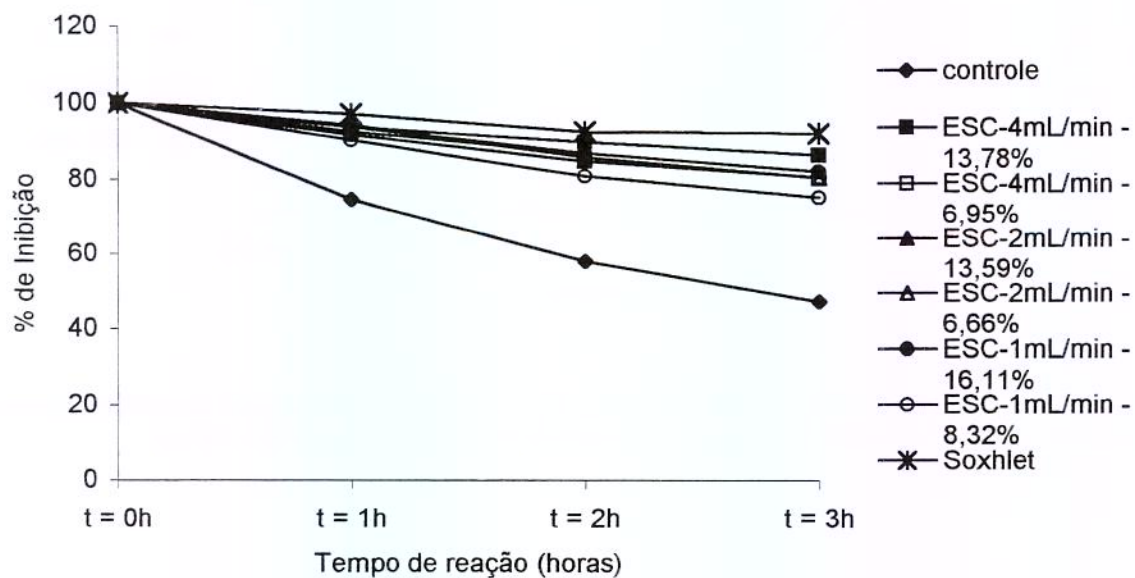
Segundo grupo de ensaios

Figura 7. Perfil da Atividade Antioxidante dos ensaios com co-solvente etanol/isopropanol, variação da porcentagem de co-solvente, variação de vazão, temperatura de 303,15 K e pressão de 300 bar.

Apêndice I - Memorial de Cálculo

Cálculo da vazão do solvente e co-solvente na Entrada do sistema.

Exemplo: Ensaio 5- CO₂ com 95% em massa e EtOH/Iso-C₃ (1:1 em massa) e 5% em massa, vazão de entrada da bomba de 4,0 mL/min, pressão de 200 bar, tempo de extração de 375 min.

Solvente (95% em massa):

Foi calculada a partir da vazão volumétrica total (4,0mL/min) a vazão do solvente, sendo então convertida em vazão mássica através da densidade do solvente calculada a seguir:

$$\bullet \quad n_{Total} = \frac{P.V}{R.T.t} (mol / min)$$

$$n_{Total} = \frac{0,944.30}{83,14.298,5.0,0195} \times 375$$

$$n_{Total} = 21,94 \text{ mol}$$

$$\bullet \quad n_{EtOH / Iso-C_3} = \frac{m}{PM} \quad \text{sendo: } PM_{EtOH/Iso-C_3} = 52,06 \quad m_{EtOH/Iso-C_3} = M_3 \text{ (medido)}$$

$$n_{EtOH / Iso-C_3} = \frac{52,18}{52,06}$$

$$n_{EtOH / Iso-C_3} = 1,002 \text{ mol}$$

$$\bullet \quad n_{CO_2} = n_{Total} - n_{EtOH / Iso-C_3} \quad m_{CO_2} = n_{CO_2} \times PM_{CO_2}$$

$$n_{CO_2} = 20,94 \text{ mol} \quad m_{CO_2} = 921,27 \text{ g}$$

$$\bullet \quad \frac{Q_{CO_2}}{Q_{bomba}} = 95\% \quad Q_{CO_2} = 3,80 \text{ mL/min}$$

$$\therefore \text{ para 375 min tem-se, } V_{CO_2} \text{ (mL)} = 1425 \text{ mL}$$

$$\bullet \quad \rho_{CO_2} = \frac{m_{CO_2}}{V_{CO_2}} (g / mL) \quad \rho_{CO_2} = 0,6465 \text{ g / mL}$$

Assim,

- $Q_{CO_2} \text{ (g/min)} = Q_{CO_2} \text{ (mL/min)} \times \rho_{CO_2} \text{ (g/mL)}$

$$Q_{CO_2} \text{ (g/min)} = 2,4567$$

Co-solvente (5% em massa):

Da mesma forma foi realizada o cálculo da vazão mássica para o co-solvente. Este co-solvente era uma mistura de etanol ($\rho = 0,79 \text{ g/cm}^3$) e isopropanol ($\rho = 0,786 \text{ g/cm}^3$) com densidades à $\approx 23^\circ\text{C}$, 1bar (Perry & Chilton, 1986)

- $\frac{Q_{EtOH}}{Q_{bomba}} = 2,5\%$

$$Q_{EtOH} \text{ (mL/min)} = 0,1$$

$$Q_{EtOH} \text{ (g/min)} = Q_{EtOH} \text{ (mL/min)} \times \rho_{EtOH} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$Q_{EtOH} \text{ (g/min)} = 0,079$$

$$\frac{Q_{Iso-C3}}{Q_{bomba}} = 2,5\%$$

- $Q_{Iso-C3} \text{ (mL/min)} = 0,1$

$$Q_{Iso-C3} \text{ (g/min)} = Q_{Iso-C3} \text{ (mL/min)} \times \rho_{Iso-C3} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$Q_{Iso-C3} \text{ (g/min)} = 0,0786$$

Assim, a vazão mássica total de entrada no sistema é o somatório das vazões do solvente e co-solvente:

- $Q_{total} \text{ (g/min)} = Q_{EtOH} \text{ (g/min)} + Q_{Iso-C3} \text{ (g/min)}$

$$Q_{total} \text{ (g/min)} = 2,6143$$

Então calculou-se a massa relativa à vazão utilizada tanto do solvente quanto do co-solvente:

Para CO_2 a $Q_{\text{CO}_2}(\text{g/min}) = 2,6143$ $\therefore$ para 375 min tem-se,

- $m_{\text{CO}_2}(\text{g}) = 2,6143 \times 375$

$$m_{\text{CO}_2}(\text{g}) = 921,2625 \quad \text{respectivamente,}$$

$$m_{\text{EtOH}}(\text{g}) = 29,62$$

$$m_{\text{Iso-C3}}(\text{g}) = 29,47$$

$$m_{\text{total}}(\text{g}) = 980,36$$

Assim a fração mássica real do co-solvente é:

- $Y_{\text{co-solvente}} = \frac{m_{\text{co-solvente}}}{m_{\text{total}}} \times 100$

$$Y_{\text{co-solvente}} = 6,03 \%$$

Cálculo da vazão do solvente + co-solvente na Saída do sistema.

Visto que $Q = \frac{\Delta V}{\Delta t}$ e $\rho = \frac{m}{V}$, considera-se para os gases na saída do sistema a equação para um

Gás Ideal:

- $P \times V = n \times R \times T$ onde $P \times V = \frac{m}{PM} \times R \times T$

$$\frac{m}{V} = \frac{P \times PM}{R \times T} \quad \text{então} \quad \rho = \frac{P \times PM}{R \times T}$$

Assim:

- $m = \rho \times Q$

- $m = \frac{P \times PM \times V}{R \times T \times t} \quad (\text{g/min})$

$$Q_{\text{total}} = 2,5924 \text{ g/min}$$

Valores calculados e medidos:

$$PM_{\text{mistura}} = 44,2838$$

$$P_{\text{atmosférica}} = 0,9400 \text{ bar}$$

$$T_{\text{ambiente}} = 298,5 \text{ K}$$

$$V_{\text{deslocado do bolhómetro}} = 30 \text{ mL}$$

$$R = 83,14 \text{ J/K.mol}$$

$$t = 0,0195 \text{ min}$$

Cálculo da vazão do co-solvente no processo:

Para o cálculo da vazão de saída de co-solvente foram medidas as massas retidas nos frascos coletores e na célula de extração através de evaporação por gravimetria. Nos frascos as massas foram pesadas e após evaporação obteve-se por diferença os valores da massa do co-solvente, da mesma forma na célula extratora obteve-se por diferença de massa, antes e após a extração, de acordo com o esquema da figura 1.

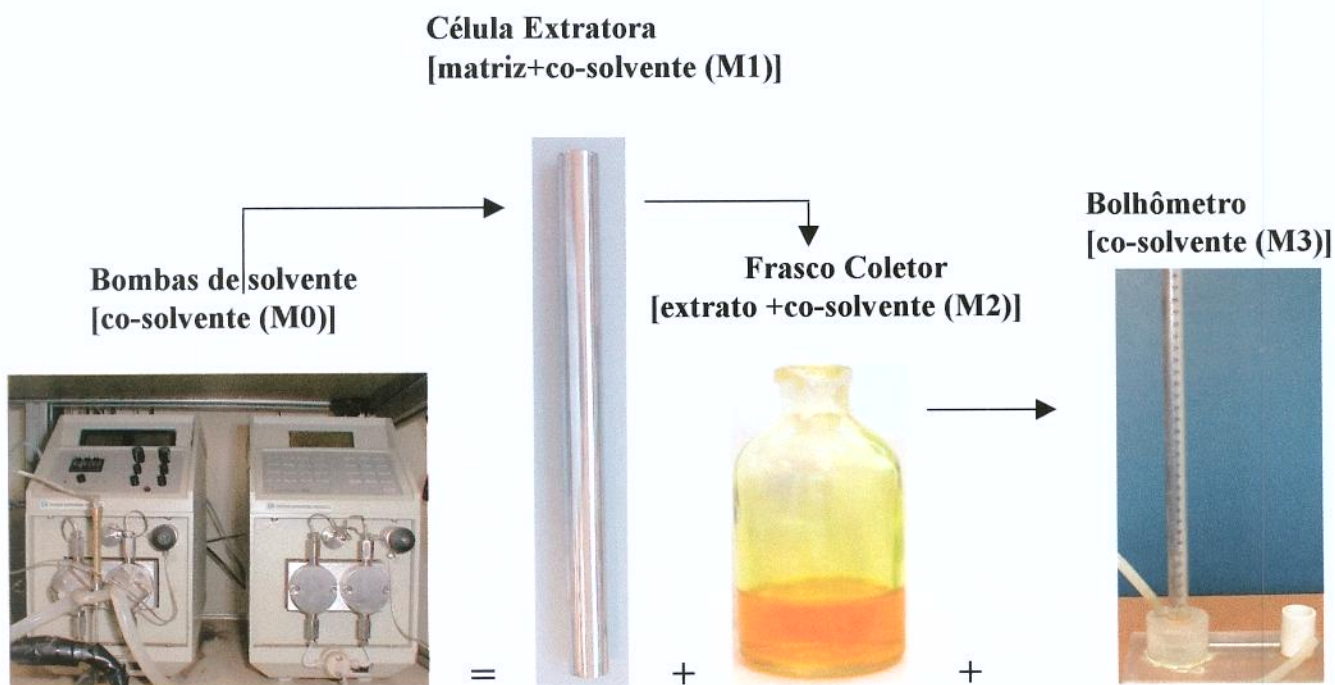


Figura 1. Esquema do sistema para o cálculo da vazão de co-solvente.

$$Q_{co-solvente} (g/min) = \frac{M2 + M3}{min}$$

$$Q_{co-solvente} (g/min) = 0,1576$$

$$se \quad Q_{total} (g/min) = Q_{CO_2} + Q_{co-solvente}$$

$$Q_{CO_2} (g/min) = 2,4317$$

Para co-solvente a $Q_{co-solvente} (g/min) = 0,1576$ ou seja, 0,1576 g para cada minuto portanto no tempo total de extração de 375 min tem-se:

$$m_{CO_2} (g) = 911,8780$$

$$m_{co-solvente} (g) = 59,1000$$

$$m_{total} (g) = 970,9780$$

Tabela 1 Cálculo de Vazão e Massa de Entrada e Saída de solvente no sistema para o primeiro lote de ensaios.

Co-solvente	EtOH/IsoC3	EtOH/IsoC3	EtOH	EtOH	IsoC3	IsoC3
Pressão	(200 bar)	(300 bar)	(200 bar)	(300 bar)	(200 bar)	(300 bar)
Qbomba (mL/min)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<i>Entrada</i>						
mco-s (g)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
mCO ₂ (g)	0,92	0,74	1,00	0,86	0,89	0,82
Qco-s x10 ⁻⁵ (kg/s)	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
QCO ₂ x10 ⁻⁵ (kg/s)	4,09	3,28	4,45	3,83	3,94	3,94
Qtotal x10 ⁻⁵ (kg/s)	4,36	3,54	4,72	4,10	4,20	4,20
<i>Saída</i>						
mco-s (kg)	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05
mCO ₂ (kg)	0,92	0,74	0,99	0,89	0,90	0,82
Qco-s x10 ⁻⁵ (kg/s)	0,24	0,23	0,24	0,23	0,25	0,23
QCO ₂ x10 ⁻⁵ (kg/s)	4,08	3,27	4,42	3,94	4,00	3,65
Qtotal x10 ⁻⁵ (kg/s)	4,32	3,49	4,65	4,17	4,25	3,87

Tabela 2. Cálculo de Vazão e Massa de Entrada e Saída de solvente no sistema para o segundo lote de ensaios.

Vazão	(3,81x10 ⁻⁵ kg/s)	(4,04x10 ⁻⁵ kg/s)	(1,84x10 ⁻⁵ kg/s)	(1,94x10 ⁻⁵ kg/s)	(0,78x10 ⁻⁵ kg/s)	(0,77x10 ⁻⁵ kg/s)
Co-solvente	13,78%	6,95%	13,59%	6,66%	16,11%	8,32%
Qbomba(mL/min)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<i>Entrada</i>						
mco-s (kg)	0,12	0,06	0,06	0,03	0,03	0,01
mCO ₂ (kg)	0,74	0,85	0,38	0,41	0,15	0,16
Qco-sx10 ⁻⁵ (kg/s)	0,53	0,26	0,26	0,13	0,13	0,07
QCO ₂ x10 ⁻⁵ (kg/s)	3,29	3,78	1,67	1,84	0,68	0,72
Qtotalx10 ⁻⁵ (kg/s)	3,81	4,04	1,93	1,97	0,82	0,79
<i>Saída</i>						
mCO ₂ (kg)	0,11	0,05	0,05	0,02	0,02	0,01
mco-s (kg)	0,68	0,83	0,36	0,41	0,14	0,16
Qco-s x10 ⁻⁵ (kg/s)	0,51	0,24	0,21	0,09	0,08	0,06
QCO ₂ x10 ⁻⁵ (kg/s)	3,03	3,68	1,58	1,81	0,64	0,70
Qtotalx10 ⁻⁵ (kg/s)	3,53	3,92	1,79	1,90	0,72	0,76

ApêndiceII- Curva padrão de Curcuminóides

Curva Padrão de CC (90%) e Scan de CC para identificação do Teor de CC nos extratos. A curva padrão foi obtida com 0,0053 g de padrão diluídos em balão de 100 mL. Retirou-se alíquotas de 0 à 2,5 mL com diferença de 0,25 mL e completado o volume com etanol em balões de 25 mL. As leituras destas soluções permitiram a construção de uma curva com escala de absorbância de 0-1 com a finalidade de minimizar o erro analítico, através da Lei de Lambert Beer. A curva foi ajustada para o grau de pureza do padrão utilizado.

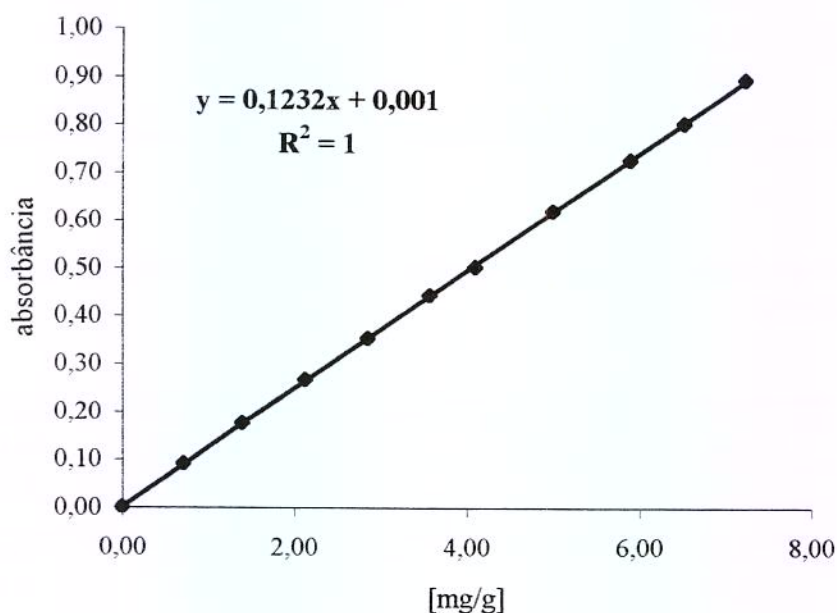


Figura 1. Curva Padrão de CC (mg).

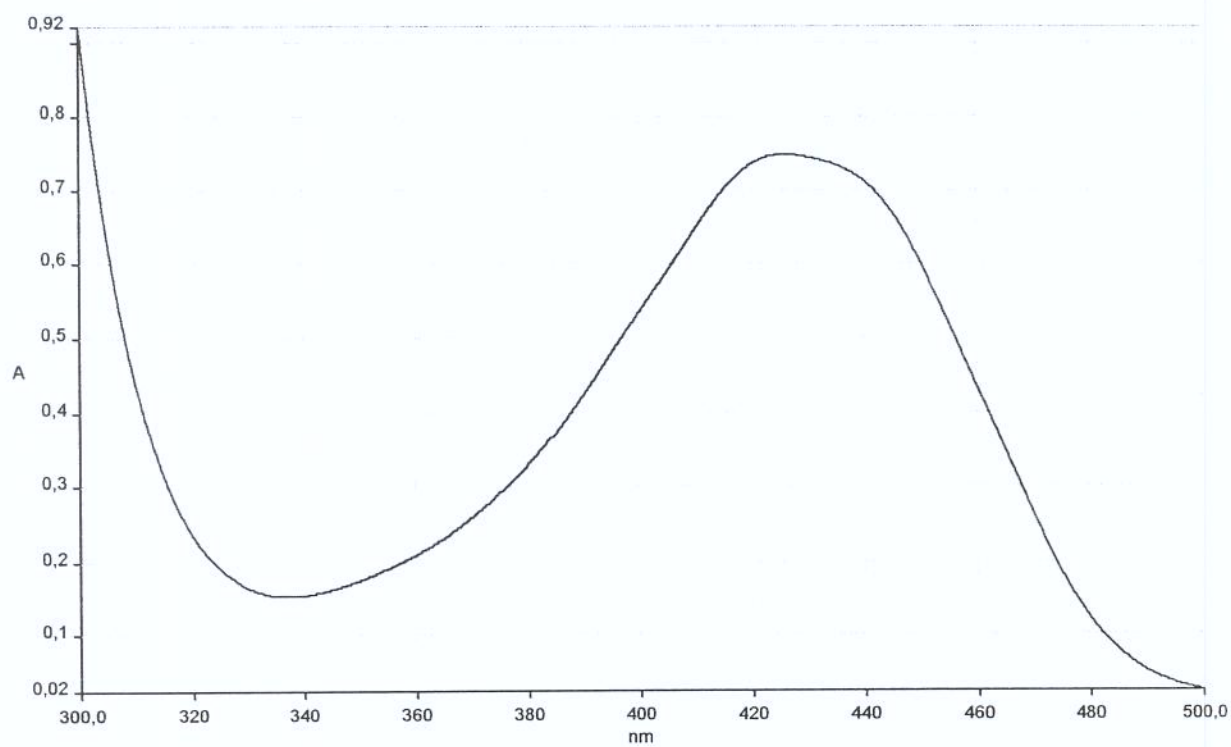


Figura 2. Scan do CC padrão a 90% de pureza para identificação do maior pico de absorção (427 nm).