



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Extração de Alcalóides Indólicos de
Tabernaemontana catharinensis (A.DC.)
com Dióxido de Carbono Supercrítico + Etanol**

Camila Gambini Pereira
Engenheira de Alimentos, 1999 (UNESP- São José do Rio Preto- SP)

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

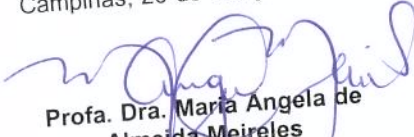
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Camila Gambini Pereira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de março de 2002.

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Campinas, 26 de março de 2002

Campinas- São Paulo


Prof. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
Presidente da Banca

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	74142
TIPO	UNICAMP
V	
TOMBO	48798
PREÇO	16.837/02
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/05/02
Nº CPD	

CM00166937-9

BIBID. 244112

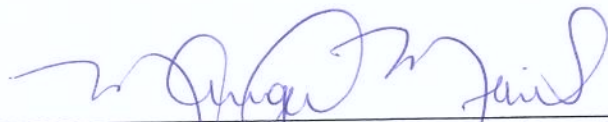
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P414e Pereira, Camila Gambini
Extração de alcalóides indólicos de *Tabernaemontana catharinensis* (A.D.C.) com dióxido de carbono supercrítico + etanol / Camila Gambini Pereira. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

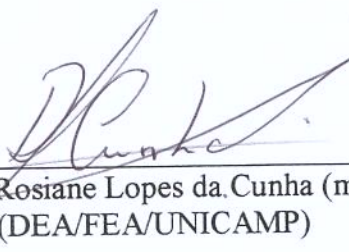
Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Alcalóides indólicos. 2. Leishmaniose. 3. *Tabernaemontana catharinensis*. 4. Extração com fluido supercrítico. I. Meireles, Maria Angela de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

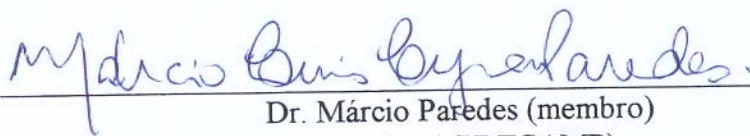
Banca Examinadora



Prof.^a Dra. Maria Angela de Almeida Meireles (Orientadora)
(DEA/FEA/UNICAMP)



Prof.^a Dra. Rosiane Lopes da Cunha (membro)
(DEA/FEA/UNICAMP)



Dr. Márcio Paredes (membro)
(DEA/FEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso (Suplente)
(DEPAN/FEA/UNICAMP)

“O homem que venceu na vida é aquele que viveu bem, riu muitas vezes e amou muito; que conquistou o respeito de homens inteligentes e o amor das crianças; que preencheu um lugar e cumpriu uma missão; que deixa o mundo melhor do que o encontrou, seja com uma flor, um poema perfeito ou o salvamento de uma alma; que procurou o melhor nos outros e deu aos outros o melhor de si”.

(Robert Louis Stevenson)

Dedico

Aos meus pais, Antonio e Irma,
pelo amor, apoio e incentivo em todos
os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Rogério e Daniel,
pela compreensão e carinho que
sempre demonstraram,
principalmente durante a realização
deste trabalho.

Agradecimentos

À Profª Dra Maria Angela de Almeida Meireles pelas informações seguras e precisas, e pelo incentivo e confiança demonstrados durante todo o trabalho.

À Dra Márcia Ortiz Mayo Marques (Instituto Agrônômico de Campinas- IAC), pela contribuição e precioso suporte dados na realização da etapa analítica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (131393/2000-6) que pela bolsa concedida possibilitou a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (99/01962-1) pelo apoio financeiro concedido durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz- FioCruz (RJ) pela doação das matérias primas e pelo interesse no desenvolvimento de pesquisa que envolvam área da ciência e tecnologia em saúde.

Ao Dr. Antônio Carlos Siani e à Dra. Alaíde Sá Barreto (FioCruz) pelas análises iniciais e informações concedidas, além da colheita e preparação das matérias primas.

Ao Antônio Carlos Leonello (FioCruz) pela assistência na etapa de colheita e preparação das matérias primas.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho (Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF) que cedeu os padrões dos alcalóides coronaridina, voacangina e isovoacangina para as análises cromatográficas.

Ao Ariovaldo Astini (Laboratório de Separações Físicas- LASEFI) pelo constante apoio durante o desenvolvimento do trabalho em laboratório.

À Dra Vera Maria Rodrigues pelas valiosas informações e auxílio dados na etapa experimental.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Aos colegas do LASEFI e do curso de mestrado pelos momentos que passamos juntos e pelo companheirismo demonstrado.

E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

<i>Índice de Figuras</i>	xv
<i>Índice de Tabelas</i>	xviii
<i>Nomenclatura</i>	xxi
<i>Resumo</i>	xxiii
<i>Abstract</i>	xxv
1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1- Leishmaniose	07
2.1.1- Tratamento	08
2.1.2- Leishmaniose/ HIV: co-infecção	09
2.1.3- Produtos Naturais e Leishmaniose	10
2.2- Gênero <i>Tabernaemontana</i>	11
2.2.1- Espécies de <i>Tabernaemontana</i>	12
2.2.2- Ação terapêutica	15
2.3- Alcalóides	16
2.3.1- Alcalóides Indólicos	18

2.4- Extração com Fluidos Supercríticos	21
2.4.1- Propriedades dos Fluidos Supercríticos	23
2.4.2- Dióxido de Carbono Supercrítico	24
2.4.3- Co- Solvente	26
2.4.4- Cinética de Extração	27
 3- MATERIAIS e MÉTODOS	29
 3.1- Matéria-Prima	31
3.3.1- Preparação e caracterização de matéria-prima	32
 3.2- Processo de Extração com Fluido Supercrítico	35
3.2.1- Equipamento	35
3.2.2- Procedimento	36
 3.3- Planejamento Experimental	38
 3.4- Análise dos Extratos	39
3.4.1- Fracionamento do Extrato	40
3.4.2- Cromatografia em Camada Delgada	40
3.4.3- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas	40
3.4.4- Cromatografia à Gas com Detector de Ionozição em Chamas	41
3.4.4- Preparo da Curva Padrão	41
 3.5- Estimativa dos Parâmetros Cinéticos	35

3.6- Imprevistos	43
4- RESULTADOS e DISCUSSÃO	45
4.1- Caracterização da Matéria Prima	47
4.2- Resultados das Extrações com Fluido Supercrítico	48
4.2.1- Efeito da Origem da Matéria Prima e Partes da Planta	48
4.2.2- Ensaio de Extração Total	54
4.2.3- Efeito das Variáveis de Processo sobre o Rendimento	55
4.2.4- Efeito da Vazão Total de Solvente e Percentagem de Co-solvente	63
4.3- Análise Estatística	68
5- CONCLUSÕES	71
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
7- ANEXO	87
7.1- Anexo A- Especificações da Coletas das Matérias Primas	89
7.2- Anexo B- Esquema da Etapa de Fracionamento do Extrato Bruto	90
7.3- Anexo C- Curvas Padrão dos Alcalóides	91
7.4- Anexo D- Resumo das Condições Experimentais	93
7.5- Anexo E- Resultados das Extrações realizadas com diferentes Matérias Primas	95

7.6- Anexo F- Resultados das Extrações realizadas em diferentes condições de Temperatura e Pressão	99
7.7- Anexo G - Resultados das Extrações realizadas em diferentes condições de Vazão total de solvente e % de Co-solvente	106
7.8- Anexo H - Cromatogramas obtidos nas análises em Cromatografia a Gás com Detector de Ionização em Chamas (CG- DIC).....	111
7.9- Anexo I - Cromatogramas e Espectros de Massa dos Padrões	119
7.10- Anexo J - Saída do Programa de Ajuste Linear - SAS 6.12	122
7.11- Anexo L - Saída do Programa de Ajuste Não Linear - SAS 6.12	136
7. 12- Anexo M - Preparo do Reagente Dragendorff	150
7. 13- Anexo N – Análise dos extratos fracionados dos ensaios realizados com diferentes matérias primas.....	151
7.14- Anexo O - Cromatografia em Camada Delgada.....	152
7.15- Anexo P - Espectrofotometria no Ultra-Violeta (UV)	153

Índice de Figuras

Figura 2.1: Mapa da distribuição de casos de co-infecção Leishmaniose/HIV.....	10
Figura 2.2: Subdivisão da família Apocynaceae	11
Figura 2.3: Sinônimos do gênero <i>Tabernaemontana</i>	12
Figura 2.4: <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	13
Figura 2.5: Alcalóides indólicos com função leishmanicida isolados da <i>T.catharinensis</i>	15
Figura 2.6: Iombina.....	19
Figura 2.7: Estrutura (esqueleto) das classes dos alcalóides indólicos.....	20
Figura 2.8: Diagrama de fases de uma substância pura.....	21
Figura 2.9: Dependência da densidade do CO ₂ com a temperatura e pressão	25
Figura 3.1: Equipamento utilizado para determinação da umidade	32
Figura 3.2: Unidade de extração supercrítica	35
Figura 3.3: Fluxograma do processo de extração supercrítica.....	36
Figura 3.4: Célula de extração e haste cilíndrica para empacotar o leito	37
Figura 3.5: Curva de extração de alcalóides indólicos de <i>T.catharinensis</i> (TA4), a 35 °C, 250 bar, 4,6% (m/m) de etanol, a vazão de $5,3 \times 10^{-3}$ kg/s de solvente total	42
Figura 4.1: Curva de extração obtida a 250 bar, 35 °C, a vazão de $5,3 \times 10^{-3}$ kg/s de solvente total e 4,6% (m/m) de etanol, para diferentes matérias primas	48
Figura 4.2: Massa de alcalóides obtida após o fracionamento na primeira hora do processo de extração para as diferentes matérias primas.....	51
Figura 4.3: Massa de alcalóides obtida após o fracionamento na quarta hora do processo de extração para as diferentes matérias primas.....	51
Figura 4.4: Massa de alcalóides obtida após o fracionamento na sexta hora do processo de extração para as diferentes matérias primas.....	52
Figura 4.5: Curva de extração obtida $4,3 \times 10^{-3}$ kg/s de solvente total e 4,6% (m/m) de etanol em diferentes condições de temperatura e pressão	56
Figura 4.6: Comportamento apresentado pelo rendimento do soluto bruto com relação à temperatura e pressão	57

Figura 4.7: Comportamento apresentado pelo teor de coronaridina com relação à temperatura e pressão	59
Figura 4.8: Comportamento apresentado pelo teor de voacangina com relação à temperatura e pressão	59
Figura 4.9: Comparação entre as quantidades de coronaridina + voacangina obtidos nas diferentes condições de processo	60
Figura 4.10: Curva de extração obtida a 45 °C, 250 bar, $4,3 \times 10^{-3}$ kg/s de solvente total e 4,6% (m/m) de etanol: processo semi-contínuo e processo intermitente.....	62
Figura 4.11: Curva de extração obtida a 55 °C, 300 bar e 9,2% (m/m) de etanol em diferentes condições de solvente total do solvente	65
Figura 4.12: Representação da quantidade de soluto bruto obtida ao longo do tempo em diferentes condições de vazão total do solvente	66
Figura 4.13: Representação da quantidade de alcalóides (coronaridina+ voacangina) obtida ao longo do tempo em diferentes condições de vazão total do solvente	67
Figura 4.14: Superfície de resposta com relação ao rendimento de coronaridina + voacangina	69
Figura 4.15: Superfície de resposta com relação ao rendimento de coronaridina	69
Figura 4.16: Superfície de resposta com relação ao rendimento de voacangina	70
Figura 7.1: Curva de calibração para o padrão do alcalóide coronaridina	92
Figura 7.2: curva de calibração para o padrão do alcalóide voacangina	92
Figura 7.3: Curva de extração do experimento 1	95
Figura 7.4: Curva de extração do experimento 2	96
Figura 7.5: Curva de extração do experimento 3	97
Figura 7.6: Curva de extração do experimento 4	98
Figura 7.7: Curva de extração do experimento 12	99
Figura 7.8: Curva de extração do experimento 13	100
Figura 7.9: Curva de extração do experimento 14.....	101
Figura 7.10: Curva de extração do experimento 15	102
Figura 7.11: Curva de extração do experimento 16	103
Figura 7.12: Curva de extração do experimento 17.....	104
Figura 7.13: Curva de extração do experimento 18	105

Figura 7.14: Curva de extração do experimento 20	106
Figura 7.15: Curva de extração do experimento 21	107
Figura 7.16: Curva de extração do experimento 22	108
Figura 7.17: Curva de extração do experimento 23	109
Figura 7.18: Curva de extração do experimento 24	110
Figura 7.19: Cromatograma da amostra 8 do experimento1.....	111
Figura 7.20: Cromatograma da amostra 3 do experimento2.....	112
Figura 7.21: Cromatograma da amostra 8 do experimento3.....	112
Figura 7.22: Cromatograma da amostra 4 do experimento4.....	113
Figura 7.23: Cromatograma da amostra 3 do experimento 12.....	113
Figura 7.24: Cromatograma da amostra 5 do experimento13.....	114
Figura 7.25: Cromatograma da amostra 3 do experimento14.....	114
Figura 7.26: Cromatograma da amostra 5 do experimento15.....	115
Figura 7.27: Cromatograma da amostra 3 do experimento16.....	115
Figura 7.28: Cromatograma da amostra 2 do experimento17.....	116
Figura 7.29: Cromatograma da amostra 3 do experimento20.....	116
Figura 7.30: Cromatograma da amostra 5 do experimento21.....	117
Figura 7.31: Cromatograma da amostra 4 do experimento22.....	117
Figura 7.32: Cromatograma da amostra 3 do experimento23.....	118
Figura 7.33: Cromatograma da amostra 1 do experimento24.....	118
Figura 7.34: Cromatograma do padrão voacangina.....	119
Figura 7.35: Espectro de massas da Voacangina.....	119
Figura 7.36: Cromatograma do padrão isovoacangina.....	120
Figura 7.37: Espectro de massas da Isovoacangina.....	120
Figura 7.38: Cromatograma do padrão coronaridina.....	121
Figura 7.39: Espectro de massas da Coronaridina.....	121
Figura 7.40: Placa cromatográfica (1: padrão voacangina; 2: amostra 3, experimento 21)	152
Figura 7.41: Espectro de Absorbância no UV, amostra 5 do experimento 21	153

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Lista de alguns alcalóides que possuem usos clínicos determinados.....	17
Tabela 2.2: Classes e exemplos de Alcalóides Indólicos Monoterpênicos.....	19
Tabela 2.3: Propriedades físicas associadas a diferentes estados físicos (RIZVI <i>et al</i> , 1986)	23
Tabela 3.1: Identificação das matérias-primas.....	31
Tabela 3.2: Planejamento Fatorial $2^2 + 2$ pontos centrais.	39
Tabela 4.1: Caracterização do leito de partículas de <i>T. catharinensis</i>	47
Tabela 4.2: Rendimento em soluto bruto obtido a 250 bar, 35 °C, $5,3 \times 10^{-5}$ kg/s, e 4,6% (m/m) de etanol.....	48
Tabela 4.3: Parâmetros operacionais para o período de taxa constante de extração	50
Tabela 4.4: Razão mássica máxima de soluto no sólido para a matéria prima TA4.....	54
Tabela 4.5: Rendimento obtido a $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s e 4,6% (m/m) de etanol.....	55
Tabela 4.6: Parâmetros operacionais para o período de taxa constante de extração.....	58
Tabela 4.7: Massa de alcalóides obtida após o fracionamento em diferentes condições de temperatura e pressão.....	58
Tabela 4.8: Rendimento obtido em soluto bruto para os diferentes processos.....	61
Tabela 4.9: Quantidade de alcalóides extraída nos diferentes processos de extração.....	63
Tabela 4.40: Rendimento em soluto bruto obtido em dois níveis de percentagem de co- solvente	64
Tabela 4.11: Quantidade de alcalóides extraída em dois níveis de percentagem de co- solvente	64

Tabela 4.12: Parâmetros operacionais para o período de taxa constante de extração (CER)	65
Tabela 4.13: Comparação entre os valores de rendimento em soluto bruto obtidos em diferentes condições de vazão total do solvente ao longo do tempo	66
Tabela 4.14: Massa de alcalóides obtida em diferentes condições de vazão total do solvente.	67
Tabela 4.15: Rendimento de coronaridina e voacangina obtido a $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s, 4,6%(m/m) de etanol, em diferentes condições de operação.	68
Tabela 7.1: Soluções empregadas para a obtenção da curva padrão do alcalóide coronaridina e área obtida no cromatograma	91
Tabela 7.2: Soluções empregadas para a obtenção da curva padrão do alcalóide voacangina e área obtida no cromatograma	91
Tabela 7.3: Primeira série de ensaios- Extrações realizadas com diferentes Matérias Primas	93
Tabela 7.4: Segunda série de ensaios- Extração exaustiva da matéria prima	93
Tabela 7.5: Terceira série de ensaios: Extrações realizadas em diferentes condições de Temperatura e Pressão	94
Tabela 7.6: Quarta série de ensaios: Extrações realizadas em diferentes condições de Vazão Total de Solvente	94
Tabela 7.7: Experimento efetuado com TA1 e $6,05 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental	95
Tabela 7.8: Experimento efetuado com TA2 e $6,13 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental	96
Tabela 7.9: Experimento efetuado com TA3 e $3,52 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental	97
Tabela 7.10: Experimento efetuado com TA4 e $6,00 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental	98
Tabela 7.11: Experimento efetuado a 200 bar, 35 °C e $4,65 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.	99

Tabela 7.12: Experimento efetuado a 300 bar, 35 °C e $3,90 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.....	100
Tabela 7.13: Experimento efetuado a 250 bar, 45 °C e $4,12 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.....	101
Tabela 7.14: Experimento efetuado a 250 bar, 45 °C e $4,40 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.....	102
Tabela 7.15: Experimento efetuado a 200 bar, 55 °C e $4,73 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.....	103
Tabela 7.16: Experimento efetuado a 300 bar, 55 °C e $3,95 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.....	104
Tabela 7.17: Experimento efetuado a 250 bar e 45 °C, pelo processo intermitente	105
Tabela 7.18: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $3,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental	106
Tabela 7.19: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $1,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental	107
Tabela 7.20: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $2,60 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.	108
Tabela 7.21: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $5,28 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental	109
Tabela 7.22: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $6,12 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental	110
Tabela 7.23: Massa de alcalóides obtida após o fracionamento de cada matéria prima	151

Nomenclatura

Q : vazão do solvente total (kg solvente/s)

Q_{CO_2} : vazão do solvente (kg CO_2 /min)

m_{tot} : massa total de soluto extraída (kg);

Y : razão mássica de soluto na fase fluida (kg/kg)

t : tempo de extração

H : comprimento total do leito

CER: etapa de taxa constante de extração

FER: etapa de taxa de extração decrescente

t_{cer} : duração da etapa de taxa constante de extração

M_{cer} : taxa de extração para o período de velocidade constante (kg/s)

Y_{cer} : razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna (kg/kg)

R_{cer} : rendimento em soluto bruto na etapa CER (%)

R_{total} : rendimento total em soluto bruto (%)

R_{C+V} : rendimento em coronaridina e voacangina (%)

R_C : rendimento em coronaridina (%)

R_V : rendimento em voacangina (%)

X_0 : razão mássica máxima de soluto presente no sólido (kg_{soluto}/ kg_{alimentação})

ρ_{H_2O} : densidade da água na temperatura de medida do volume

dr : densidade real ou absoluta da partícula (mm)

da : densidade aparente (mm)

ε : porosidade do leito de partículas

d_{gw} : diâmetro médio geométrico (mm)

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

TESE DE MESTRADO

AUTORA: Camila Gambini Pereira

TÍTULO: Extração de Alcalóides Indólicos de *Tabernaemontana catharinensis* (A.DC.) com Dióxido de Carbono Supercrítico + Etanol

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

Depto. Engenharia de Alimentos- Faculdade de Engenharia de Alimentos- UNICAMP
2002

RESUMO

A *Tabernaemontana catharinensis* é uma árvore da família Apocynaceae rica em alcalóides indólicos. De um modo geral, os alcalóides presentes no gênero *Tabernaemontana* possuem uma grande aplicação farmacológica. A leishmaniose é uma doença infecciosa crônica considerada um problema de saúde pública mundial. Dentre os constituintes isolados da casca da *Tabernaemontana catharinensis*, especial atenção se dá aos alcalóides indólicos: coronaridina e voacangina, que possuem ação leishmanicida. A extração de alcalóides pelos métodos convencionais é uma operação difícil e prolongada, e requerendo uma grande quantidade de diversos solventes orgânicos. Além disso, o extrato obtido é altamente impuro. A extração com fluidos supercríticos é um processo alternativo que emprega solventes em condições de temperatura e pressão próximas ou acima do ponto crítico, obtendo com maior rapidez um extrato sem resíduos de solvente.

O objetivo deste estudo foi otimizar o processo de extração de alcalóides indólicos com CO₂ supercrítico + etanol presentes na *Tabernaemontana catharinensis*, identificando e quantificando os compostos obtidos, tendo como foco principal os alcalóides coronaridina e voacangina. Foram utilizadas matérias primas de localidades diferentes (Ribeirão Preto/SP e Campinas/SP) e diversas partes vegetais (tronco, galhos grossos e finos e folhas). Além da origem da matéria prima e partes da planta, foram avaliados os efeitos das variáveis de processo: temperatura (35, 45 e 55 °C), pressão (200, 250 e 300 bar), vazão do solvente (de

$1,5 \times 10^{-5}$ kg/s a $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s) e o emprego de etanol como co-solvente (4,6 e 9,2 % m/m de etanol) sobre o rendimento total, composição e cinética de extração. Os extratos foram fracionados para obter uma fração rica em alcalóides. Essas frações (ricas em alcalóides) foram analisadas em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), sendo a quantificação feita por Cromatografia a Gás com Detector de Ionização em Chamas (CG- DIC).

Coronaridina e voacangina foram identificados nos extratos, sendo este último o alcalóide majoritário. A matéria prima de origem Guará (Campinas) forneceu maior rendimento em soluto bruto (1,18%) e em coronaridina e voacangina. O processo a 250 bar e 45 °C forneceu maior extração dos alcalóides coronaridina e voacangina ($5,36 \times 10^{-5}$ e $66,06 \times 10^{-5}$ kg/kg de alimentação, respectivamente). O maior rendimento da extração, em termos dos alcalóides coronaridina e voacangina, foi obtido quando se utilizou 9,2% (m/m) de etanol a $5,28 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente.

Palavras-chave: Alcalóides indólicos, leishmaniose, *Tabernaemontana catharinensis*, extração supercrítica

MASTER DEGREE THESIS

AUTHOR: Camila Gambini Pereira

TITLE: Extraction of Indole Alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* (A.DC.)
with Supercritic Carbon Dióxide + Ethanol

MAJOR PROFESSOR: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

Depto. Food Engeneering- Food Engeneering University- UNICAMP
2002

ABSTRACT

Tabernaemontana catharinensis is a tree of the Apocynaceae family rich in indole alkaloids. In general, the alkaloids present in *Tabernaemontana* genus have a large pharmacological application. The Leishmaniasis is a chronic infectious disease considered a worldwide public health problem. Among the compounds isolated from the bark of the *Tabernaemontana catharinensis* special attention is given to the indole alkaloids coronaridine and voacangine, which have antileishmanial activity. The extraction of alkaloids by conventional methods is a difficult and long operation that requires a large quantity of several organics solvents. In addition, the extract obtained is highly impure. The supercritical fluid extraction is an alternative process that uses solvents with at temperature and pressure near to or above of the critical point, obtaining with more rapidity an extract without residual solvent.

The purpose of this study was to study the process of extraction of the indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* with supercritical CO₂ + ethanol, identify and quantify the compounds obtained, focusing the alkaloids coronaridine and voacangine. The raw materials used were from different places (Ribeirão Preto/SP and Campinas/SP) and several parts of plants (trunk, thick and thin branches and leaves). Beside of raw material origin and plants parts, the effects of process variables: temperature (35, 45 and 55 °C), pressure (200, 250 and 300 bar), solvent flow (from 1.5 x10⁻⁵ kg/s to 6.1 x10⁻⁵ kg/s),

and the use of ethanol as co-solvent (4.6 and 9.2 % m/m of ethanol) in the total yield, composition, and SFE kinetics were analyzed. The crude extracts were fractionated to obtain the alkaloid-rich fractions. These fractions (alkaloid-rich) were analyzed in Thin-layer Chromatography (TLC) and Gas-Chromatography/ Mass Spectrometry (GC-MS), and quantified using Gas-chromatography/Flame Ionization Detector (GC/ FID).

Coronaridine and voacangine were identified in the extracts and voacangine was the major compound. From the raw material TA4 (Guará - Campinas) was obtained the largest total yield (1.18%) and highest content in coronaridine and voacangine. The process at 250 bar and 45 °C permitted the largest extraction of the coronaridine and voacangine (5.36×10^{-6} kg/kg and 66.06×10^{-6} kg/kg of feed, respectively). The highest extraction yield, in terms of the alkaloids coronaridine and voacangine was that obtained using 9.2% (m/m) of ethanol at 5.28×10^{-5} kg/s of total solvent flow.

Keywords: Indole alkaloids, leishmaniasis, *Tabernaemontana catharinensis*, supercritical extraction.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Há décadas, estudos sobre o uso de fitoterápicos pela medicina humana vem implantado conhecimento científico e revelando importantes aplicações no combate a doenças infecciosas e endêmicas. Das 250.000 espécies de plantas no mundo, menos de 10% foram exaustivamente investigadas visando a descoberta de propriedades terapêuticas (FERREIRA, 1998).

O interesse por produtos naturais isentos de resíduos nocivos, vem recebendo especial atenção na indústria alimentícia e farmacêutica. Nesse ponto, o desenvolvimento de tecnologias que visam a qualidade de vida cresce no sentido de aperfeiçoar ou substituir processos já existentes.

O processo de extração com fluidos supercríticos apresenta valiosa vantagem frente à outras técnicas de separação, principalmente no que se refere à ausência de resíduos nocivos no extrato final. Além disso, quando se trata de produtos naturais, a existência de compostos termolábeis influencia nas condições de extração. Aliado ao emprego de baixas temperaturas, esta operação ocorre com maior rapidez e seletividade devido às propriedades de transporte favoráveis destes fluidos.

A Leishmaniose é um importante problema de saúde pública global que afeta por volta de 12 milhões de pessoas. Segundo a OMS, trata-se de uma das seis doenças infecciosas e parasitárias de maior importância, pela sua extensão e pouca vulnerabilidade às medidas de controle. Nenhuma droga efetiva foi realmente descoberta para a cura desta doença. Atividade leishmanicida de extratos de plantas é atribuída a compostos que seguem estruturas diversas, como isoquinonas, quinonas, alcalóides indólicos e terpenos (IWU *et al*, 1994; PASSOS, 2000).

O uso de muitas espécies do gênero *Tabernaemontana* pela medicina como agentes antivirais, bactericidas, anestésicos, cardiovasculares, dentre outros, se deve à grande

quantidade de alcalóides nelas presente. Quase todos os alcalóides possuem atividade farmacológica.

A *Tabernaemontana catharinensis* (A.DC.) é uma árvore da família Apocynaceae rica em alcalóides indólicos. Dentre os constituintes isolados da casca da *Tabernaemontana catharinensis*, a atenção se volta para os alcalóides indólicos: coronaridina e voacangina, que possuem ação leishmanicida.

O interesse pela *T.catharinensis* como possível planta medicinal utilizada para o tratamento contra Leishmaniose, advém da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Esta, vinculada ao Ministério da Saúde do Brasil, desenvolve ações na área da ciência e tecnologia em saúde, incluindo atividades de pesquisa básica e aplicada, produção de vacinas, medicamentos, controle de qualidade e desenvolvimento de tecnologias para a saúde.

Este trabalho teve como enfoque otimizar o processo de extração com CO₂ supercrítico, identificando e quantificando alcalóides indólicos presentes na *Tabernaemontana catharinensis*.

Na otimização do processo de extração foram avaliados a influência da origem da matéria prima e partes da planta, bem como os efeitos das variáveis de processo: temperatura, pressão, vazão e o emprego de etanol como co-solvente sobre o rendimento total, composição e cinética de extração.

Para a obtenção de um extrato rico em alcalóides foi feito um fracionamento do extrato bruto (soluto bruto) obtido no processo de extração supercrítica. Os extratos alcaloídicos foram então analisados em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), sendo quantificado por Cromatografia a Gás com Detector de Ionização em Chamas (CG- DIC).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Leishmaniose

As leishmanioses são doenças infecciosas crônicas, transmitidas ao homem e a diversas espécies de mamíferos silvestres e domésticos por protozoários do gênero *Leishmania*, através da picada de várias espécies de insetos vetores, concentrando-se nas regiões tropicais e sub-tropicais (PASSOS, 2000). Segundo a OMS, trata-se de uma das seis doenças infecciosas e parasitárias de maior importância (IWU *et al*, 1994).

As leishmanioses podem ser divididas em três tipos: cutânea, mucocutânea e visceral.

- Leishmaniose Cutânea (LC): a forma desta doença normalmente produz úlceras na pele e partes expostas do corpo como face, braços e pernas, podendo desenvolver uma série de lesões, algumas vezes mais de 200 (Leishmaniose Cutânea Difusa).

- Leishmaniose Mucocutânea (LM): esta forma da doença causa lesões que desfiguram a face, destruindo parcialmente ou totalmente as membranas da mucosa do nariz, boca, outras cavidades e os tecidos ao redor.

- Leishmaniose Visceral (LV): também conhecida como Calazar, é caracterizada por febres irregulares, substancial perda de peso, inchaço no baço e fígado, e anemia. É a mais severa das formas da leishmaniose, que se não tratada, é fatal. O período de incubação pode ser de semanas ou anos, e diferente das outras formas de leishmaniose, envolve órgãos internos. Depois de tratados, os pacientes podem desenvolver Leishmaniose Cutânea Crônica, que requer um tratamento longo e caro (WHO, 2001).

A leishmaniose é endêmica em 88 países do mundo (21 no Novo Mundo e 67 no Velho Mundo), afetando mais de 12 milhões de pessoas com mais de 400.000 novos casos por ano, e este número está aumentando (GIAMARELLOU, 2000). Apresenta a seguinte distribuição geográfica: 90% dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Índia, Brasil e Sudão; 90% dos casos de LM ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru e 90% dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2001).

2.1.1- Tratamento

Os antimoniais pentavalentes, como Pentostan® e Glucantime®, são atualmente as principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses. Entretanto, os antimoniais pentavalentes apresentam vários inconvenientes como dor no local da injeção, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, e casos de pancreatite (DELORENZI, 1998). Além da alta cardiotoxicidade, os tratamentos são muito prolongados e nem sempre são efetivos (BERMAN, 1988, retirado de PASSOS, 2000).

As drogas atualmente empregadas como segunda escolha neste tratamento são a pentamidina, anfotericina B e paronomicina. A pentamidina, usada no tratamento da leishmaniose cutânea, apresentou-se menos tóxica do que os antimoniais pentavalentes, embora tenham sido observados alguns efeitos adversos expressivos como mialgias, dor no local da administração, náuseas, dores de cabeça e hipotensão. Entretanto, para o tratamento da leishmaniose visceral, sendo necessária a administração de altas doses de pentamidina, os efeitos tóxicos observados são maiores do que os apresentados pelos antimoniais pentavalentes, havendo exacerbação dos efeitos já citados e a incidência de taquicardia e hiperglicemia. Com relação à anfotericina B, seu uso é recomendado para os casos severos da leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional, com ameaça de vida ao paciente. Seu uso é bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta. A paronomicina mostrou-se menos eficaz que antimoniais pentavalentes e

anfotericina B, além da dose recomendada ser extremamente elevada (BERMAN 1997, retirado de DELORENZI, 1998).

As leishmanioses são doenças tratáveis. Existem diversas drogas aprovadas para o uso clínico que apresentam curas parasitológicas e de lesões na maioria dos casos. Entretanto, a intensa utilização de antimoniais pentavalentes e outras drogas tem proporcionado o aparecimento de cepas resistentes deste parasita. Além disso, o grande número de efeitos tóxicos de drogas convencionais e o longo período de tratamento têm estimulado pesquisadores a desenvolverem tratamentos alternativos para as leishmanioses, podendo estes ser tanto naturais quanto sintéticos (DELORENZI, 1998). De um modo geral, ainda não existe nenhuma droga que apresente um bom índice terapêutico e uma baixa toxicidade (PASSOS, 2000).

A OMS tem estimulado as pesquisas com drogas alternativas, sendo propostos multicentros de investigações no Mediterrâneo e África para a Leishmaniose Visceral e na América do Sul para a Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea, uma vez que vêm aumentando os casos de associação entre a Leishmaniose e AIDS (PASSOS, 2000).

2.1.2- Leishmaniose/ HIV: co-infecção

A leishmaniose é uma doença infecciosa que ataca indivíduos infectados com HIV, a maioria envolvendo co-infecção com leishmaniose visceral. A Figura 2.1 mostra a distribuição de casos de co-infecção Leishmaniose/ HIV reportados e a distribuição dos casos de Leishmaniose. Até 1999, 31 países reportaram casos de co-infecção Leishmaniose/ HIV (WHO, 2001).

A OMS estima que 17 milhões de pessoas estão infectadas com o vírus HIV, sendo que um terço dos indivíduos HIV-positivos vive em zonas endêmicas de leishmaniose (GIAMARELLOU, 2000).

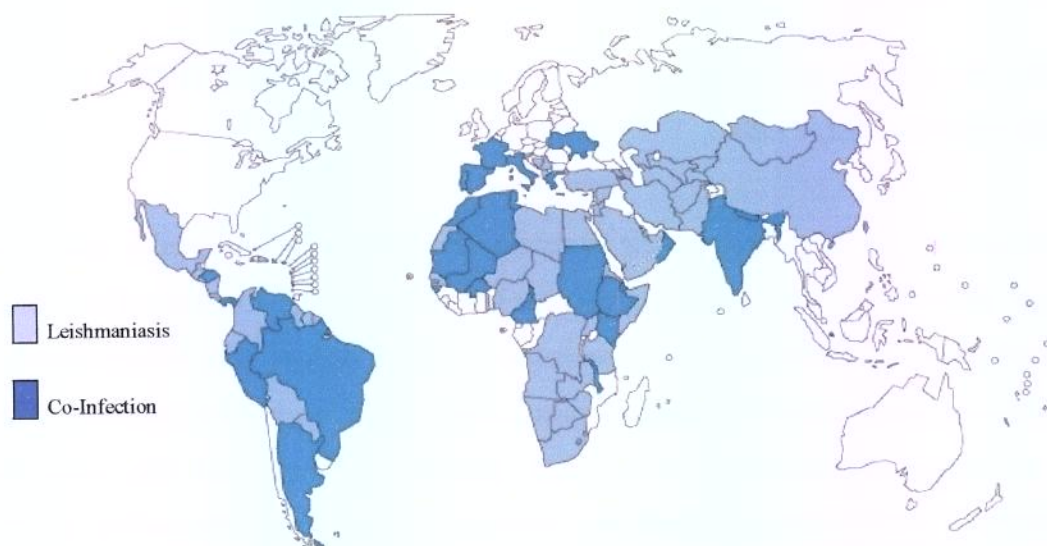


Figura 2.1: Mapa da distribuição de casos de co-infecção Leishmaniose/ HIV (WHO, 2001)

2.1.3- Produtos Naturais e Leishmaniose

A atividade leishmanicida de extratos de plantas é atribuída a compostos que seguem estruturas diversas, como isoquinonas, quinonas, alcalóides indólicos e terpenos. Talvez a mais importante substância natural com atividade leishmanicida seja o alcalóide isoquinolínico quaternário, a berberina. Este composto, que ocorre em muitas famílias do Reino Vegetal, é largamente utilizado na medicina popular no tratamento de leishmaniose e outras parasitoses. Estudos laboratoriais confirmam que este composto possui significativa atividade leishmanicida em várias espécies de *Leishmania*, *in vivo* e *in vitro* (IWU *et al*, 1994).

Além deste, outros alcalóides apresentam ação leishmanicida, como os alcalóides indólicos harmalina extraído de *Peganum hamala* (IWU *et al*, 1994); astonina, akuamina, akuamicina, picralina extraídos de *Picralina nítida* (IWU *et al*, 1994); harmana, pleiocarpina e buchtienina extraídos de *Kopsia griffithii* (KAM *et al*, 1999); corinanteidina, corinanteina, dehidrocorynanteina, α -ioimbina e corinantina extraídos de *Corynanthe pachyceras* (STAERK *et al*, 2000); conodurina, conoduramina e gabumina extraídos de *Peschiera van heurikii* (MUÑOZ *et al*, 1994); coronaridina e voacangina extraídos de *Peschiera australis* (DELORENZI, 1998; YODA e BARRETO, 2000).

2.2- Gênero *Tabernaemontana*

Mais de 99,8% dos alcalóides indólicos estão distribuídos em três famílias: Loganiaceae, Apocynaceae, e Rubiaceae (PHILLIPSON e ZENK, 1980).

A família Apocynaceae está subdividida em duas subfamílias, a Apocynoideae que contém glicosídeos esteroidais, e a Plumerioideae que contém alcalóides indólicos, e se subdivide ainda em oito tribos, veja a Figura 2.2.

Família	Subfamília	Tribo	Gênero
Apocynaceae→	Apocynoideae		<i>Voacanga</i> (12 espécies).
			<i>Tabernaemontana</i> (± 120 espécies)
			<i>Thabernanthe</i> (1 espécie)
			<i>Schizogygia</i> (1 espécie)
	Plumerioideae→	Carisseae	<i>Carvalhoa</i> (1 espécie)
		Chilocarpeae	<i>Callichilia</i> (7 espécies)
		Ambelanieae	<i>Stemmadenia</i> (17 espécies)
		Tabernaemontanae→	<i>Crioceras</i> (1 espécie)
		Plumerieae	<i>Calocrater</i> (1 espécie)
		Rauvolfiae	<i>Daturicarpa</i> (1 espécie)
		Allamandaeae	<i>Pteroberna</i> (1 espécie)
		Cerbereae	<i>Woytkowskia</i> (2 espécies)

Figura 2.2: Subdivisão da família Apocynaceae (PELLETIER, 1988).

A tribo Tabernaemontanae consiste em 12 gêneros, incluindo o gênero *Tabernaemontana*, que possui vários sinônimos devido à sua distribuição em várias partes do mundo (Figura 2.3).

<i>Anacampita</i>	<i>Hazunta</i>	<i>Peschiera</i>
<i>Anartia</i>	<i>Leptopharyngia</i>	<i>Phrissocarpus</i>
<i>Bonafousia</i>	<i>Merizadenia</i>	<i>Protagabunia</i>
<i>Camerunia</i>	<i>Muntafara</i>	<i>Rejua</i>
<i>Capuronetta</i>	<i>Ochronerium</i>	<i>Sarcopharyngia</i>
<i>Codonemma</i>	<i>Oisthanthera</i>	<i>Stenosolen</i>
<i>Conopharyngia</i>	<i>Pagiantha</i>	<i>Taberna</i>
<i>Ervatamia</i>	<i>Pandaca</i>	<i>Testupides</i>
<i>Gabunia</i>	<i>Pandacastrum</i>	

Figura 2.3: Sinônimos do gênero *Tabernaemontana* (VAN BEEK *et al.*, 1984b, retirado de PELLETIER, 1988)

2.2.1- Espécies de *Tabernaemontana*

Até o momento, várias revisões a respeito do gênero *Tabernaemontana* têm sido publicadas, mas uma teve especial importância. Em 1984, VAN BEEK *et al.* (1984b) apresentaram uma revisão que inclui dados botânicos, fitoquímicos, etnobotânicos e farmacológicos de todas as espécies *Tabernaemontana* e alcalóides presentes. Esta revisão serviu como base para pesquisas posteriores e até hoje oferece valiosa ajuda.

Plantas pertencentes à tribo *Tabernaemontanae* têm sido reportadas como ricas em vários alcalóides indólicos e bis-indólicos. A casca (da raiz ou do caule) da árvore é a parte da planta mais pesquisada nas espécies da *Tabernaemontana*, por sua análise relativamente fácil e pela alta produção de alcalóides nesta região. Existem ainda alguns alcalóides que são produzidos quase que exclusivamente nas cascas da árvore, como é o caso do alcalóide dimérico do tipo B2, voacamina (PELLETIER, 1988).

2.2.1.1- *Tabernaemontana catharinensis*

T. catharinensis (*P.catharinensis*), conhecida como jasmim, leiteira de dois irmãos e casca de cobra, mostrada na Figura 2.4, é usada como antídoto contra picada de cobra, anestésico para dor de dente, para curar verrugas, e como vermífugo (ALLORGE, 1985; retirado de SPITZER *et al*, 1995). Segundo revisão monográfica descrita por LEEUWEMBERG (1994), *T.catharinensis* possui as seguintes sinonímias: *T.affins*, *T.australis*, *T.hilariana*, *T.hybrida*, *T.acuminata*, *T.salicifolia*, *P.albidiflora*.



Figura 2.4: *Tabernaemontana catharinensis*

Sete alcalóides indólicos: coronaridina, tabersonina, olivacina, coronaridina-hidroindolenina, catarinensina, decarbometoxivoacamina e tabernamina; e 4 ácidos fenólicos: ac. vanílico, ac. siríngico, ac. gentísico, e ac. salicílico foram isolados de extratos de folhas, sementes e cascas da árvore da *T.australis*. O extrato bruto das folhas e sementes mostrou-se com atividade antineoplásica; os extratos aquosos e alcoólicos, administrados em ratos, tiveram efeito antiinflamatório; alguns extratos tiveram, além disso, atividade analgésica contra o ácido acético induzido pela irritação abdominal (RATES *et al*, 1993).

O óleo da semente da *T.australis*, quando extraído com clorofórmio, contém uma mistura de três alcalóides indólicos: tabersonina, coronaridina hidroindolenina e coronaridina, sendo esta última apontada como responsável parcial pela ação antineoplásica (SPITZER *et al*, 1995).

DELORENZI (1998) estudou o efeito leishmanicida de extratos de caule de *T.australis* e verificou que o extrato bruto do caule adicionado à cultura de promastigotas apresentou uma inibição de 100% no crescimento dos parasitas no sexto dia de cultivo, com 1mg/ml do extrato. Ao fracionar o extrato bruto, a atividade leishmanicida permaneceu somente na fração clorofórmica, sendo identificada nesta a presença de dois alcalóides majoritários: coronaridina e voacangina.

YODA e BARRETO (2000) extraíram alcalóides indólicos de folhas e galhos (casca e medula) da *T. australis*, utilizando a técnica de extração com fluidos supercríticos. Para tanto, utilizaram CO₂ como solvente e etanol como co-solvente, nas seguintes condições de operação: 35 °C de temperatura, 180 bar de pressão, vazão de solvente de $6,3 \times 10^{-5}$ kg/s de CO₂ utilizando 5% de etanol (v/v). Testes *in vitro* realizados com o extrato bruto etanólico das cascas de *T.australis*, suas frações brutas (obtidas após o fracionamento do extrato bruto etanólico) e com algumas substâncias isoladas (voacangina e coronaridina, Figura 2.5), constataram a ação leishmanicida da espécie.

Dentre os constituintes isolados da casca da *Tabernaemontana catharinensis*, a atenção se volta para os alcalóides indólicos: coronaridina e voacangina, que foram alvo na extração com fluido supercrítico, identificação e quantificação realizada.

Esses dois alcalóides aparecem em grande quantidade em várias espécies de *Tabernaemontana*: *T.cymosa* (ACHENBACH *et al*, 1997), *T.divaricata* (CARDOSO e VILEGAS, 1999; DAGNINO *et al*, 1991; VAN DER HEIJDENEN *et al*, 1987), *T.glandulosa* (ACHENBACH *et al*, 1994), *T.pandaqui* (SIERRE *et al*, 1991), dentre outras.

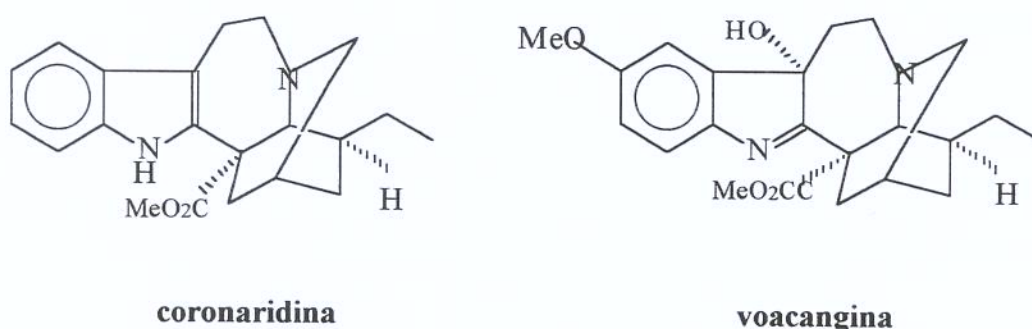


Figura 2.5: Alcalóides indólicos com função leishmanicida isolados da *T. catharinensis*

2.2.2- Ação terapêutica

Muitas espécies do gênero *Tabernaemontana* têm sido utilizadas pela medicina como estimulantes ou analgésicos. Os alcalóides presentes neste gênero possuem uma vasta aplicação farmacológica. Isso pelo fato desses compostos possuírem uma forte atividade bactericida, como por exemplo, a voacamina. Muitos alcalóides do tipo I1 (classe Ibogano, sub-classe 1) estimulam o sistema nervoso central, como a ibogaina. Outros possuem atividade cardiovascular, como a voacamina e a voacorina. Alguns revelam atividade hipoglicêmica (cataranthina e coronaridina). Atividades antivirais, antitumorais,

anestésicas, dentre outras também são encontradas em alcalóides extraídos das várias espécies de *Tabernaemontana* (PELLETIER, 1988).

TAESOTIKUL *et al* (1998), analisaram a fração bruta de alcalóides extraída de várias partes de *T. pandaqui* que apresentou atividade hipotensiva em ratos anestesiados, sendo a casca a parte da árvore que possui esta atividade mais evidente.

MUÑOZ *et al* (1994) isolaram vinte alcalóides, indólicos e bis-indólicos, extraídos de folhas e cascas da árvore de *Peschiera van heurikii*. Forte atividade leishmanicida e bactericida foi observada em cinco destes: conodurina, conoduranina, apodina e acedinisina.

VAN DER HEIJDEN *et al* (1986) extraíram alcalóides indólicos da planta (raiz, caule e folhas) da *T. elegans* e observaram que estes alcalóides apresentaram forte atividade antimicrobiana em bactérias gran positivas e gran negativas.

VAN BEEK *et al* (1985) encontraram atividade antimicrobiana em trinta e quatro alcalóides isolados da casca da raiz da *T. chippi*.

2.3- Alcalóides

Alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, que são encontrados predominantemente nas angiospermas. Pertencem a um vasto grupo de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, comparável àquela dos terpenóides, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (SIMÕES *et al*, 1999).

Aproximadamente 13.000 espécies de plantas conhecidas têm sido usadas como medicamento pelo mundo. Seus constituintes têm servido como modelo para medicamentos sintéticos, como atrofina para tropicamina, quinina para cloroquina, e cocaína para procaína

e tetracaína (KUTCHAN, 1995). O uso medicinal das plantas contendo alcalóides como fonte de compostos antivirais, analgésicos, dentre outros, pode ser observado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Lista de alguns alcalóides que possuem usos clínicos determinados*

Espécie (Família)	Fármaco	Uso Clínico
<i>Atropa belladonna</i> (Solanaceae)	Atropina	Espasmolítico
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don (Apocynaceae)	Vimblastina Vincristina Ajmalicina	Antitumoral Antitumoral Desordens circulatórias
<i>Cephaelis ipecacuanha</i> (Brot.) A. Richard (Rubiaceae)	Emetina	Amebicida Emético
<i>Chondodendron tomentosum</i> Ruiz & Pavon (Menispermaceae)	Tubocarina	Relaxante de músculo esquelético
<i>Cinchona ledgeriana</i> Moens ex Trimen (Rubiaceae)	Quinidina Quinina	Antarrítmico Antimalárico
<i>Colchicum autumnale</i> L. (Liliaceae)	Colchicina	Antirreumático
<i>Datura metel</i> L. (Solanaceae)	Escopolamina	Espasmódico
<i>Erythroxylum coca</i> Lam (Erthroxylaceae)	Cocaína	Anestésico local
<i>Papaver somniferum</i> L. (Papaveraceae)	Morfina Codeína	Analgésico Antitussígeno
<i>Physostigma venenosum</i> Balf. (Leguminosae)	Fisiostigmina	Miótico
<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes (Rutaceae)	Pilocarpina	Miótico
<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth. Ex Kurz (Apocynaceae)	Ajmalina Rescinamina Reserpina	Desordens circulatórias Anti-hipertensivo Anti-hipertensivo

* (TAESOTIKUL, 1997, retirado de DELORENZI, 1998)

Os alcalóides possuem caráter alcalino, com certas exceções como a *colchicina*, *piperina*, *oximas*, e alguns sais quartenários. São altamente tóxicos e na maioria das vezes possuem sabor amargo (SIMÕES *et al*, 1999).

Podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo em um ou mais órgãos haverá um acúmulo preferencial dessas substâncias. Com relação à sua localização

intracelular, os alcalóides são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se em seguida nos vacúolos e dessa maneira, não aparecem em células jovens antes de ocorrer a formação dessas estruturas (SIMÕES *et al*, 1999 e PHILLIPSON e ZENK, 1980).

São, geralmente, pouco estáveis, podendo ser sensíveis à luz, aquecimento, e até mesmo a determinados solventes orgânicos, como o clorofórmio e o diclorometano (SIMÕES *et al*, 1999). Outros solventes como acetona, metiletilcetona, dentre outros, também podem causar formação de artefatos indesejáveis, sendo mais estáveis em tolueno, acetato de etila e soluções alcoólicas (LINSKENS e JACKSON, 1994).

De um modo geral, os alcalóides são classificados quanto à sua estrutura base, sendo divididos em 10 classes. A classe dos indólicos é o grupo de alcalóides mais complexo, baseado em sistemas heterocíclicos (KELLOP, 1970).

2.3.1- Alcalóides Indólicos

Atualmente são conhecidos em torno de 2000 alcalóides indólicos. Com respeito à estrutura característica, os alcalóides indólicos podem ser divididos em duas classes: indólicos monoterpênicos e os demais alcalóides indólicos. Os primeiros são derivados na maioria das vezes da triptamina e da secologanina (monoterpênico). O outro grupo não possui uniformidade estrutural possuindo somente o núcleo indol com uma derivação como característica comum, como gramina, bufotenina e harmina (SIMÕES *et al*, 1999 e PHILLIPSON e ZENK, 1980).

Alcalóides indólicos monoterpênicos podem ser classificados em 8 tipos, de acordo com a estrutura característica de seus esqueletos (Tabela 2.2). Esta subdivisão foi proposta por Kisakurek e Hesse, em 1980 (PHILLIPSON e ZENK, 1980). VAN BEEK *et al*, em 1984, incluiu mais três classes. A numeração baseia-se no esqueleto da ioimbina (Figura 2.6),

proposto por Le Men e Taylor, em 1965, levando em conta a sua biogênese (PHILLIPSON e ZENK, 1980). A estrutura característica de cada classe pode ser visualizada na Figura 2.7.

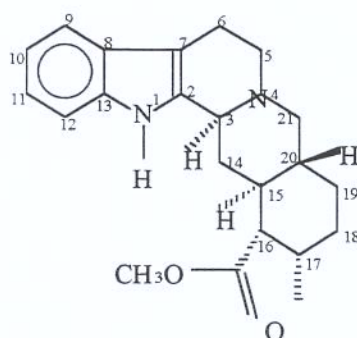


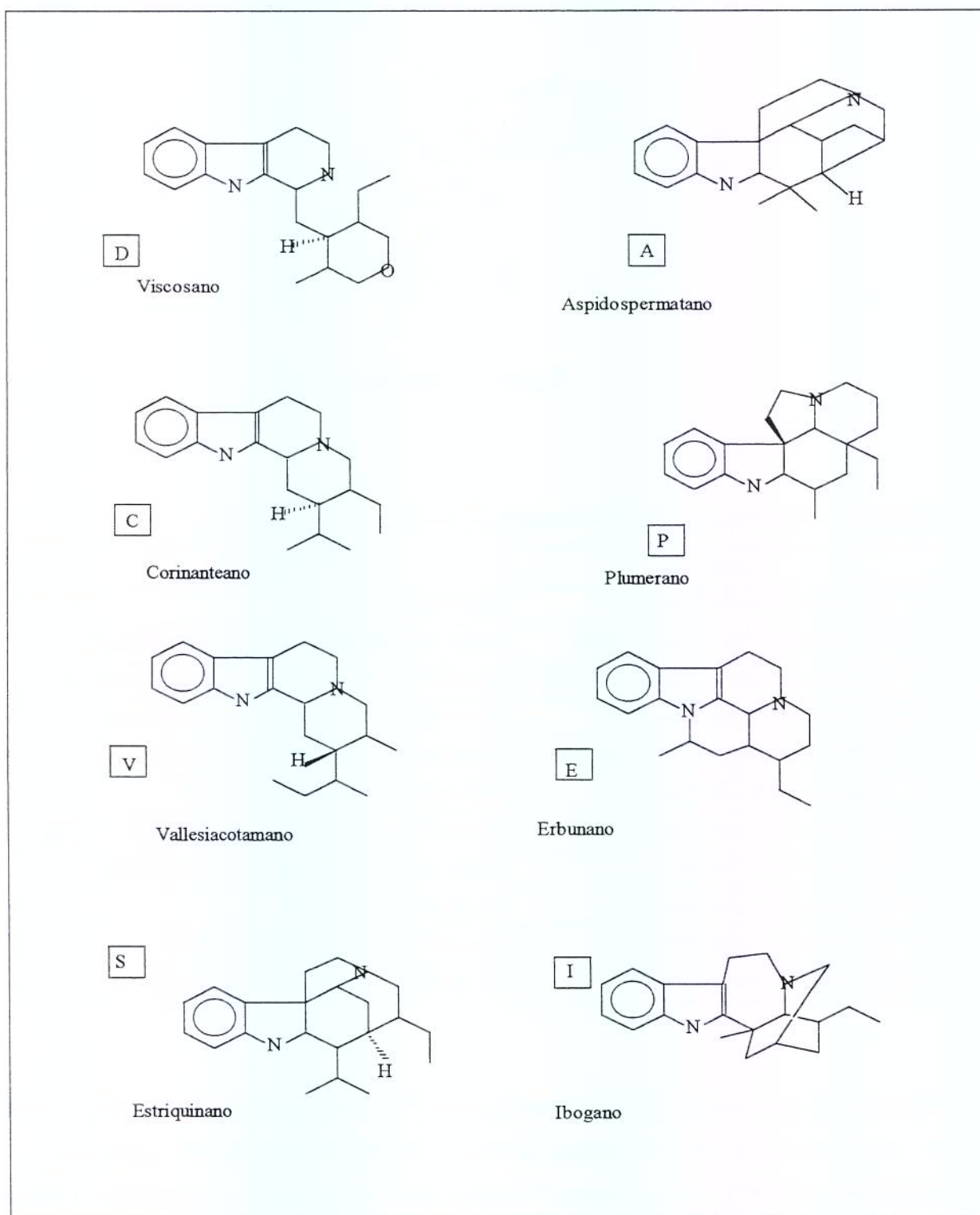
Figura 2.6: Iobina

Tabela 2.2: Classes e exemplos de Alcalóides Indólicos Monoterpênicos

Classe	Exemplos
D- Viscosano (1 sub-divisão)	Estructosidina
C- Corinanteano (12 sub-divisões)	accedina, alstonina, dregamina, silicina
V- Vallesiacotamano (3 sub-divisões)	angustina, camptothecina, vallesiachotamina
S- Estriquinano (1 sub-divisão)	lochnerina, vincanidina, fluorocuranina
A- Aspidospermatano (5 sub-divisões)	vallesamina, olivacina, apparicina
P- Plumerano (2 sub-divisões)	tabersonina, tabersonina 3-oxo
E- Erburnano (1 sub-divisão)	vincamina, vincamina 14, 15 dehidro -16 epi
I- Ibogano (9 sub-divisões)	coronaridina, voacangina, catharantina
T- Tacamano (1 sub-divisão)	tacamina, tacamonina
M- Miscelânea (2 sub-divisões)	secodina/ decarbomethoxi-15,20
B- Bisindole (9 sub-divisões)	accedinina, condurina, voacamina

De um modo geral, alcalóides isolados do gênero *Tabernaemontana* pertencentes às classes C (corinanteano), V (vallesiacotamano), S (estriquinano), E (eburnano), A (aspidospermatano), e T (tacamano) são mais polares que alcalóides pertencentes às classes P (plumerano) e I (ibogano), enquanto que alcalóides diméricos são de polaridade intermediária (VAN BEEK *et al*, 1984b).

Figura 2.7: Estrutura (esqueleto) das classes dos alcalóides indólicos



2.4- Extração com Fluidos Supercríticos

Nas últimas décadas, em especial a partir dos anos 70, os estudos sobre extração com solventes pressurizados tiveram rápido avanço. Hoje, depois de uma fase de rápida expansão (fim dos anos 80 e início dos anos 90), o processo de extração com fluido supercrítico é uma técnica bem estabelecida que conquistou posições expressivas em diversos setores das indústrias alimentícias, farmacêuticas, químicas, petroquímicas e de polímeros (LUQUE e JIMÉNEZ-CARMONA, 2000).

Um componente puro é considerado no seu estado supercrítico, se sua temperatura e pressão estiverem acima do seu ponto crítico. Antes de se alcançar as condições críticas de pressão (P_c) e temperatura (T_c), como visto na Figura 2.8, não ocorrem mudanças repentinas nas propriedades do componente. Entretanto, ao atravessar a região hachurada, com exceção do próprio ponto crítico, a magnitude de variação pode ser grande, causando diferentes efeitos sobre o soluto e solvente quando comparados às condições de estado da vizinhança. Efeitos similares ao estado supercrítico podem ocorrer, em alguns casos, próximos às temperaturas críticas no estado líquido das substâncias, ou seja, em $P > P_c$ e $T < T_c$ (BRUNNER, 1994).

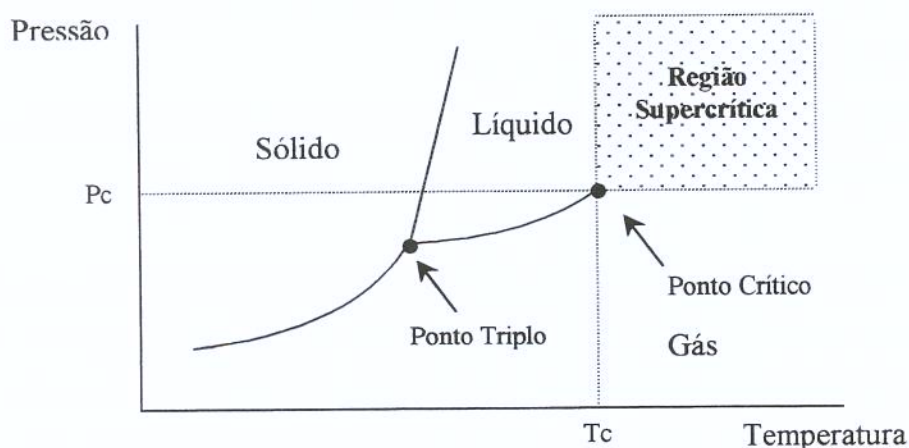


Figura 2.8: Diagrama de fases de uma substância pura.

Nos processos de extração sub e supercrítica, o fluido encontra-se a temperatura e pressão próximas ou acima do seu ponto crítico. Essa técnica é uma importante alternativa em processos de separação, oferecendo diversas vantagens frente a outras técnicas como: o emprego de baixas temperaturas permitindo que compostos termicamente instáveis sejam separados; remoção fácil do solvente por redução da pressão ou ajuste da temperatura; a energia térmica requerida é menor que para destilação; rápida extração pode ser adquirida devido a baixas viscosidades; alta difusividade e bom poder de solvatação para solventes supercríticos; elevada seletividade (CHARPENTIER & SERVENANTS, 1988).

A extração de um componente de uma matriz sólida é realizada pelo contato entre o substrato sólido e o solvente supercrítico. Geralmente, o substrato sólido forma um leito fixo, através do qual o gás supercrítico escoar e extrair os componentes do substrato (CARDOZO - FILHO *et al*, 1997).

Segundo BRUNNER (1994), a extração de compostos solúveis do material vegetal ocorre na seguinte sequência:

- A matriz sólida absorve o solvente supercrítico, dilatando a estrutura da célula, o que promove uma diminuição na resistência à transferência de massa;
- Em paralelo, os compostos extraíveis são dissolvidos pelo solvente;
- Os compostos dissolvidos são transferidos por difusão para a superfície do sólido;
- Esses compostos passam então para a superfície externa, podendo ocorrer neste local mudança de fase;
- Os compostos são transportados pelo solvente supercrítico, e em seguida removidos do extrator.

A literatura faz referência a várias aplicações de extração com fluidos supercríticos em diversas áreas, como extração de óleos essenciais, compostos aromáticos, corantes, adoçantes, fracionamento e purificação de materiais. A extração de alcalóides aparece principalmente na descafeinização de café e chás, extração da nicotina do tabaco e ópio (KING e BOOT, 1993; BRUNNER, 1994).

2.4.1- Propriedades dos Fluidos Supercríticos

Os fluidos supercríticos são únicos porque possuem algumas propriedades que são similares a gases e outras a líquidos. O poder de solvatação e a densidade se aproximam aos do líquido, enquanto que a viscosidade e difusividade são mais próximas às do gás (CHARPENTIER & SERVENANTS, 1988). A Tabela 2.3 lista as propriedades físicas para os fluidos em diferentes estados.

Tabela 2.3: Propriedades físicas associadas a diferentes estados físicos (RIZVI *et al*, 1986)

Estado	Densidade $10^3(\text{kg/m}^3)$	Difusividade $10^4(\text{m}^2/\text{s})$	Viscosidade (kg/m.s)
Gás			
P= 1 bar, T= 15-30 °C	$(0,6-0,2) \times 10^{-3}$	0,1-0,4	$(1-3) \times 10^{-5}$
Supercrítico			
Pc, Tc	0,2-0,5	$0,7 \times 10^{-3}$	$(1-3) \times 10^{-5}$
4Pc, Tc	0,4-0,9	$0,2 \times 10^{-3}$	$(3-9) \times 10^{-5}$
Líquido			
P= 1 bar, T= 15-30 °C	0,6-1,6	$(0,2-2) \times 10^{-5}$	$(0,2-3) \times 10^{-3}$

Em geral, com o aumento da temperatura e pressão, os fluidos supercríticos apresentam um decréscimo na viscosidade e aumento na densidade (MARENTIS, 1988).

O poder de dissolução de um fluido supercrítico está diretamente relacionado com sua densidade. Nas vizinhanças do ponto crítico, grandes mudanças de densidade podem ser produzidas por pequenas mudanças na pressão e temperatura. Esta propriedade aumenta com um aumento da pressão a temperatura constante e, diminui com um aumento na temperatura a pressão constante, sendo mais sensível a temperaturas próximas à do ponto crítico do que em pressões elevadas (CHARPENTIER & SERVENANTS, 1988).

Para substâncias de baixa volatilidade, a sua solubilidade em gases supercríticos não polares diminui com o aumento da massa molecular e com aumento da polaridade e número

de grupos funcionais polares. A solubilidade desses componentes de baixa volatilidade exibe as seguintes características:

- a altas pressões, a solubilidade aumenta com a temperatura;
- a baixas pressões, a solubilidade diminui com a temperatura (BRUNNER, 1994).

BRUNNER (1994) afirma que a temperaturas maiores que a temperatura crítica, o aumento da solubilidade a pressões moderadas se deve a dois fatores: ao aumento do poder de dissolução devido ao aumento da densidade, e ao aumento exponencial da pressão de vapor do soluto devido ao aumento da temperatura.

Num processo de extração, a viscosidade é uma propriedade de transporte importante que influencia a eficiência da operação, perda de carga e a transferência de massa do sistema. Para fluidos supercríticos, essa propriedade diminui com o aumento da temperatura, pois o fluido encontra-se em pressões elevadas (BRUNNER, 1994).

2.4.2- Dióxido de Carbono Supercrítico

Na escolha de solvente, além de fatores relacionados à eficiência do processo de extração, devem ser considerados a toxicidade e/ou os riscos que seu manuseio representa, a estabilidade das substâncias extraídas e a disponibilidade e o custo do solvente (SIMÕES *et al*, 1999).

Dentre os solventes supercríticos, o CO₂ é o mais utilizado devido às condições críticas amenas (31,1 °C e 73,8 bar), aliado ao fato de ser atóxico, não inflamável e custo relativamente baixo. Apresenta alta volatilidade (fácil separação do extrato), alta difusividade (maior penetração na matriz sólida), baixa viscosidade e pequena entalpia de vaporização. Além disso, é um solvente apolar, sendo mais seletivo na fase supercrítica, pelo controle da pressão do sistema (FILLIPPI, 1982; MARENTIS, 1988)

Próximo às condições críticas, a sua densidade aumenta rapidamente com o abaixamento da temperatura, mostrando forte dependência com a temperatura. Acima da T_c , a densidade aumenta com o aumento da pressão a temperatura constante, e diminui com o aumento da temperatura a pressão constante, conforme mostra a Figura 2.9 (MARENTIS, 1988).

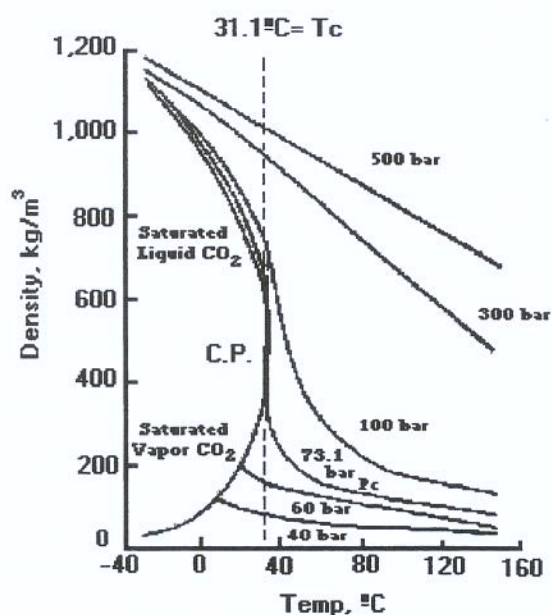


Figura 2.9: Dependência da densidade do CO₂ com a Temperatura e Pressão.

O CO₂ é miscível com hidrocarbonetos de baixa massa molecular e compostos orgânicos oxigenados (FILLIPPI, 1982). No estado líquido, o CO₂ é miscível com a maioria dos solventes líquidos comuns (do metanol ao pentano); com hidrocarbonetos monoterpênicos puros, monoterpênicos aldeídicos e cetônicos; e todos os ácidos carbônicos líquidos. A água possui baixa solubilidade (0,1%) com CO₂ líquido (BROGLE, 1982).

2.4.3- Co- Solvente

Mesmo a altas densidades, o CO₂ possui habilidade limitada em dissolver moléculas polares. Entretanto, as características dos fluidos supercríticos podem ser favorecidas pela adição de compostos miscíveis e polares, mencionado na literatura como modificador ou co-solvente (TAYLOR, 1996).

A solubilidade de muitos compostos pode ser então aumentada utilizando um co-solvente. Este normalmente possui volatilidade intermediária entre o solvente e o componente a ser extraído, fazendo com que este último se torne miscível no solvente (KING e BOOT, 1993). A ocorrência de interações físicas e químicas entre o co-solvente e o soluto, também influencia na solubilidade deste no fluido supercrítico (EKART *et al*, 1993).

Segundo BRUNNER (1994), a adição do co-solvente promove além do aumento no poder de dissolução do solvente supercrítico, um aumento na seletividade devido à maior dependência do poder de dissolução com a temperatura e pressão.

Em geral, um co-solvente que possui temperatura crítica menor que a do fluido supercrítico causa diminuição na solubilidade de componentes pouco voláteis, e quando possui temperatura crítica maior que a do gás supercrítico causa aumento na solubilidade (BRUNNER, 1994).

SOVOVÁ *et al* (1999) mediram a solubilidade de dois compostos de baixa volatilidade (escalano e dinoil fitalato) em CO₂ supercrítico com diferentes co-solventes: n-hexano, tolueno e etanol, em duas condições de temperatura (30 e 40 °C) e pressão (90 e 100 bar). Observaram um aumento da solubilidade de ambos solutos em CO₂ com a adição dos co-solventes, verificando uma dependência da solubilidade sobre a concentração do co-solvente descrita como uma função parabólica.

PASQUEL *et al* (2000) extraíram glicosídeos de stévia utilizando CO₂ supercrítico com água e/ou etanol como co-solventes e o melhor rendimento foi obtido na condição de 120 bar e 16 °C utilizando a água como co-solvente. Isso ocorreu devido à maior polaridade da água comparada ao etanol, o que aumentou apreciavelmente a polaridade do CO₂ e com isso a solubilidade dos glicosídeos.

2.4.4- Cinética de Extração

As curvas de extração são determinadas pela massa total de soluto extraída como função do tempo de extração, pela seguinte equação:

$$m_{\text{tot}} = Q_{\text{CO}_2} \int Y(H,t) dt \quad \text{Eq.(1)}$$

onde:

Q_{CO_2} é a vazão do solvente (kg CO₂/min);

m_{tot} é a massa total de soluto extraída (g);

$Y(H, t)$ é a concentração do soluto na fase fluida em função do tempo de extração (t) e do comprimento total do leito (H)

RODRIGUES (1996) relata a existência de três etapas distintas nas curvas de extração:

- 1- etapa de taxa constante de extração (CER): nesta, a superfície externa da partícula está recoberta por uma camada de óleo e o solvente promove a retirada desta camada superficial num processo de extração do óleo por convecção.
- 2- etapa de taxa de extração decrescente (FER): nesta fase, começam a aparecer falhas na camada superficial do óleo que recobre a partícula.
- 3- etapa difusiva: nesta última, ocorre a remoção do óleo que está na parte interna da partícula.

FRANÇA *et al* (1999) extraíram carotenóides e lipídios de buriti utilizando CO₂ supercrítico e os resultados apresentaram uma curva de extração composta por três etapas, sendo 85% do óleo obtido na etapa CER.

FERREIRA *et al* (1999) realizaram extração supercrítica para obtenção de óleo essencial de pimenta do reino e observaram duas etapas neste processo: período de taxa constante e período de taxa decrescente de extração, sendo que 70% do óleo foi extraído na etapa CER.

POVH (2000) extraiu óleo essencial de camomila por diferentes métodos. No processo com fluido supercrítico, obteve uma curva de extração com três regiões distintas, sendo 50% do óleo extraído na região CER.

Pelos exemplos acima citados, nota-se que apesar de pertencerem a diferentes classes de compostos, o comportamento das curvas de extração destes é basicamente o mesmo, apresentando duas ou três regiões que caracterizam o processo de extração supercrítico.

MATERIAIS E MÉTODOS

3- MATERIAIS e MÉTODOS

3.1- Matéria-Prima

Casca da árvore, galhos e folhas de *Tabernaemontana catharinensis* foram doados pela FIOCRUZ (RJ), sendo a origem de diferentes partes de São Paulo, como mostra a Tabela 3.1. As partes das plantas foram secas em condições ambiente, na sombra. Para galhos finos e folhas, foram necessários cerca de 15 dias de secagem, enquanto que para a casca da árvore, 90 dias. O material seco foi triturado utilizando moinho de facas de aço inox (Marconi Equipamentos, Modelo MA-680/ 700 RPM, Piracicaba, SP, Brasil) com uso de malha 30 mesh. A matéria prima seca foi então triturada em um moinho de martelo (Triturador Nogueira, modelo DPM-2, Itapira, SP, Brasil) utilizando a malha de 20 mesh. Em seguida, o material foi transferido para o LASEFI – DEA/ FEA – UNICAMP, sendo posteriormente acondicionado em sacos plásticos com cerca de 0,5 kg, submetido a vácuo, e armazenado em freezer doméstico (Metalfrio, double action, Brasil) a temperatura inferior a -10°C . Os detalhes das especificações das matérias primas se encontram no Anexo A.

Tabela 3.1: Identificação das matérias-primas

Matéria Prima	Época de Colheita	Origem	Partes da árvore	Distribuição granulométrica (Mesh)
TA1	06/04/2000	Ribeirão Preto/ SP	galhos finos e folhas	de 24 à 48
TA2	11/08/2000	Guará- Ribeirão Anhumas/SP	galhos finos e folhas	de 24 à 48
TA3	13/11/2000	Guará- Campinas/SP	tronco, galhos grossos e folhas	de 32 à 80
TA4	13/11/2000	Guará- Campinas/SP	galhos finos e folhas	de 24 à 48

3.1.1- Preparação e caracterização de matéria-prima

A matéria prima foi caracterizada quanto à umidade, distribuição do tamanho de partículas, densidade real e aparente do sólido. Além disso, foi determinada a porosidade do leito de partículas.

- Umidade:

Foi utilizado o Método de JACOBS (1973) para a determinação de umidade. O equipamento é formado por um condensador, um tubo coletor graduado, para receber a água evaporada da amostra, manta de aquecimento e um balão de 250 ml (Figura 3.1). Cerca de $1,5 \times 10^{-2}$ kg do material “in natura” foram colocados no balão cobertos com 75 ml de xilol, deixando o material refluxar por 3 horas. A umidade das amostras foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Umidade} = (\text{Volume H}_2\text{O} \times \rho_{\text{H}_2\text{O}} / \text{massa de amostra}) \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

onde : $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ é a densidade da água na temperatura de medida do volume



O Método de Jacobs é indicado para matérias primas contendo material volátil. No caso da *T.catharinensis*, poderíamos empregar o método convencional que utiliza estufa. No entanto, optou-se pelo emprego desse método descrito acima pela facilidade e por ter sido utilizado com outras matérias primas no LASEFI.

Figura 3.1: Equipamento utilizado para determinação da umidade pelo Método de Jacobs

- Diâmetro Médio das Partículas:

A distribuição do tamanho das partículas da matéria-prima foi determinada utilizando uma série de peneiras (mesh: 16, 24, 32, 48 e 80), do tipo *Tyler*, marca *Granutest*, com agitação mecânica, por 10 minutos.

Para as matérias primas TA1 e TA2, o tamanho das partículas utilizadas foi de 24, 32, e 48 mesh em proporções de 30%, 35%, e 35%, respectivamente. Para a matéria prima TA4, as partículas utilizadas foram de mesmo tamanho, entretanto com a seguinte proporção 24%, 31%, e 45%, respectivamente. Para a matéria prima TA3 o tamanho das partículas utilizadas foi de 32, 48, e 80 na proporção de 28%, 45%, e 27%, respectivamente.

O diâmetro médio geométrico (d_{gw}) das partículas foi determinado através da equação que utiliza o diâmetro da partícula de superfície externa média, utilizando-se peneiras granulométricas da série Tyler e de acordo com o método (ASAE S319.2) recomendado pela ASAE Standard (ASAE, 1993):

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

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

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.

- Densidade real ou absoluta (d_r):

Na determinação da densidade real das partículas (d_r) empregou-se o método proposto por BUCZEK e GELDART (1986). Neste método foi utilizado um picnômetro de 10 cm³ previamente calibrado com água destilada a 25 °C, tendo como fluido picnométrico microesferas de vidro de 200 mesh. Para cada matéria prima fez-se 5 repetições para o cálculo da densidade real.

- Densidade aparente (d_a):

Para seu cálculo, foi utilizado o volume da coluna de extração e a massa de *T. catharinensis* contida na mesma.

- Porosidade do leito de partículas (ε):

Com os dados da densidade real e aparente, foi calculada a porosidade total do leito de partículas, através da seguinte equação:

$$\varepsilon = 1 - (d_a/d_r) \quad \text{Eq.(4)}$$

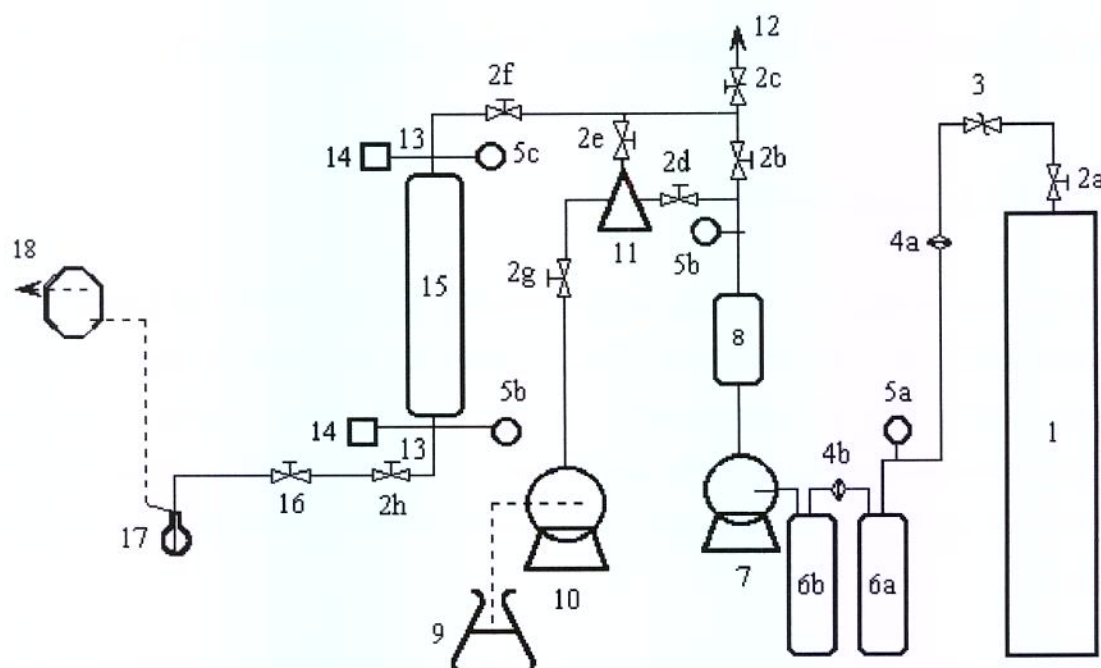
3.2- Processo de Extração com Fluido Supercrítico

3.2.1- Equipamento

A extração supercrítica foi realizada no equipamento que se encontra no Laboratório de Separações Físicas- LASEFI- DEA/ FEA- UNICAMP, mostrado na Figura 3.2. Este consiste basicamente de duas bombas de alta pressão, dois banhos termostáticos programáveis e um medidor de vazão. Detalhes do equipamento podem ser encontrados em ZANCAN *et al* (2001). O fluxograma do processo de extração pode ser observado na Figura 3.3.



Figura 3.2: Unidade de Extração Supercrítica



- | | |
|--|---|
| 1- Cilindro de CO ₂ com sifão | 10- Bomba de Co-solvente |
| 2- Válvulas | 11- Misturador de CO ₂ e Co-solvente |
| 3- Válvula de Retenção | 12- Purga |
| 4- Filtro de Linha | 13- Termopar Ferro-Constantan |
| 5- Manômetro | 14- Indicador de Temperatura |
| 6- Tanque Pulmão encamisado | 15- Extrator encamisado |
| 7- Bomba de CO ₂ | 16- Válvula micrométrica |
| 8- Serpentina | 17- Frasco coletor de extrato |
| 9- Reservatório de Co-solvente | 18- Totalizador de vazão |

Figura 3.3: Fluxograma do processo de extração supercrítica

3.2.2- Procedimento

3.2.2.1- Determinação experimental das curvas de extração

A matéria-prima seca e moída foi empacotada na célula de extração de aço inoxidável 316 de dimensões $37,5 \times 10^{-2}$ m de comprimento e $2,74 \times 10^{-2}$ m de diâmetro (Figura 3.4), e então inserida no extrator encamisado. Buscando obter um empacotamento homogêneo, a matéria prima era acondicionada na célula em porções de 3×10^{-3} kg, com ajuda de uma haste cilíndrica. Desta forma, a quantidade de partículas sólidas colocadas na célula de extração

foi sempre de $(72 \pm 1) \times 10^{-3}$ kg para TA1 e TA2, $(82 \pm 1) \times 10^{-3}$ kg para TA3, e $(78 \pm 1) \times 10^{-3}$ kg para TA4. A célula empacotada era em seguida acomodada no extrator.



Figura 3.4: Célula de extração e haste cilíndrica para empacotar o leite

As temperaturas dos banhos, um que aquece a camisa do extrator e outro que resfria o cabeçote da bomba, foram ajustadas de acordo com a temperatura de processo (35, 45 ou 55 °C) e temperatura de operação da bomba (-10 °C), sendo o sistema pressurizado em seguida. Na pressurização, o CO₂ líquido era bombeado continuamente do cilindro de CO₂ até o tanque pulmão e deste até o extrator encamisado, mantendo a válvula micrométrica sempre fechada. Ao atingir a pressão de operação (200, 250 ou 300 bar), iniciava-se o processo de extração que durava cerca de 9 horas. Os extratos eram recolhidos em frascos coletores ($100 \times 10^{-6} \text{ m}^3$) a cada hora. Terminado o processo de extração, promovia-se a despressurização do sistema que durava 45 minutos. Os frascos, depois de pesados, eram levados para a estufa á vácuo (Napco- modelo 5831, EUA), no qual permaneciam por 24 horas, sem uso de aquecimento, para a retirada do etanol. Depois eram novamente pesados, lacrados e armazenados em freezer doméstico (Metalfrio, double action, Brasil) para posterior análise.

3.2.2.2- Determinação do Rendimento Total

Para a determinação da razão mássica máxima de soluto presente no sólido (X_0), fez-se uma série de ensaios de extração exaustiva da matéria prima. Nesses experimentos utilizou-se apenas $1,60 \pm 0,02 \times 10^{-3}$ kg de matéria prima, sendo o volume restante da célula completada com esferas de vidro ($355,0 \pm 2,0 \times 10^{-3}$ kg, Mesh 10). O processo de extração ocorreu a 250 bar, 35 °C, vazão média do solvente de $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s, e 4,6% (m/m) de etanol (Merck, 99%, lote k28659183-104, Alemanha), por um período de duas horas mais 45 minutos de despressurização.

3.3- Planejamento Experimental

Primeiro, foram analisados os efeitos da origem da matéria prima e partes da planta sobre o rendimento total, composição e cinética de extração. Esta etapa teve por finalidade apontar qual a matéria prima mais indicada para ser utilizada nas próximas etapas de estudo. Para estes ensaios, o processo de extração ocorreu a 250 bar, 35 °C, vazão média total do solvente de $5,3 \times 10^{-5}$ kg/s, e 4,6% (m/m) de etanol (Merck, 99%, lote k28659183-104, Alemanha).

Em segundo lugar, determinou-se a razão mássica máxima de soluto (X_0) para a matéria prima selecionada na primeira série de ensaios.

Na terceira série de experimentos, o planejamento experimental foi utilizado para se obter as melhores condições de temperatura e pressão que maximizassem o rendimento em coronaridina e voacangina. Para isso, empregou-se um planejamento fatorial $2^2 + 2$ pontos centrais, para temperatura e pressão, conforme descrito na Tabela 3.2, mantendo-se fixas a vazão média do solvente em $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s e percentagem de co-solvente em 4,6% em massa de etanol.

Tabela 3.2: Planejamento Fatorial $2^2 + 2$ pontos centrais.

Nº Experimentos	Variáveis originais		Variáveis Codificadas	
	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	x_1	x_2
1	35	200	-1	-1
2	35	300	-1	+1
3	45	250	0	0
4	45	250	0	0
5	55	200	+1	-1
6	55	300	+1	+1

As variáveis codificadas são definidas como:

$$x_1 = \frac{T - 45}{10}$$

$$x_2 = \frac{P - 250}{50}$$

Na última série de experimentos, os efeitos da vazão total de solvente e percentagem de co-solvente foram investigados à temperatura e pressão previamente selecionadas na segunda etapa experimental. A vazão total do solvente variou de $1,5 \times 10^{-5}$ kg/s a $6,1 \times 10^{-5}$ kg/s e a percentagem de co-solvente foi duplicada (9,2 % m/m de etanol).

3.4- Análise dos Extratos

A identificação e quantificação dos alcalóides indólicos foi realizada em três etapas: primeiro fez-se um fracionamento do extrato bruto para obtenção da fração alcaloidica, sendo inicialmente evidenciada por Cromatografia em Camada Delgada (DELORENZI, 1998), seguindo a identificação por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, conforme realizado por CARDOSO *et al* (1997), e então quantificação por Cromatografia a Gás com Detector por Ionização em Chamas. Para a quantificação dos alcalóides, fez-se as curvas de calibração utilizando o padrão dos alcalóides coronaridina e voacangina.

3.4.1- Fracionamento do Extrato

O extrato bruto foi ressuspenso em ácido clorídrico 5% (Merck, fumegante 37%, s/ nº lote, P.A., Reagen, Brasil) e lavado três vezes com hexano (Merck, lote K26803774934, P.A., Reagen, Brasil), para a retirada das substâncias graxas. O extrato aquoso ácido foi alcalinizado com hidróxido de amônio (Merck, solução de amônia 25%, s/ nº lote, P.A., Reagen, Brasil) até pH 8, medido com papel indicador (Merck, lote 90385974, Alemanha) e então lavado três vezes com clorofórmio (Ecibra, lote 90466, P.A., Brasil). A fração orgânica foi evaporada até a secura em evaporador rotativo a vácuo (Laborota, modelo 4001, Alemanha), com controlador de vácuo (Heidolph Instruments GMBH, Alemanha), a 65 °C de temperatura no banho. Esta etapa está esquematizada no Anexo B.

3.4.2- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato orgânico obtido no fracionamento foi analisado por Cromatografia de Camada Delgada, utilizando a sílica gel (60-PF254, cromatofolhas Al HPTLC 20x20 cm, 0,25 mm de espessura, Merck, lote 940378601, Alemanha) como adsorvente. O extrato foi eluído com uma mistura (9:1) de clorofórmio (Ecibra, lote 90466, P.A., Brasil) e metanol (Merck, lote K26224109909, Alemanha) e revelado com Dragendorff (reagente específico para visualização de alcalóides, modo de preparo descrito no Anexo M).

3.4.3- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A fração alcaloídica foi analisada em Cromatógrafo a Gás acoplado à Espectrômetro de Massas (CG-EM, marca: *Shimadzu*, modelo: QP-5000), dotado de injetor tipo split/splitless, operando por impacto de elétrons (70 eV) e faixa de massas de 40 a 600 Daltons. A separação das substâncias foi conduzida em coluna capilar de sílica fundida DB-5 (*J&W Scientific*; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, fase estacionária: 5% difenil e 95%

dimetilpolisiloxano), utilizando como gás de arraste hélio na vazão de 1,7 mL/min. As temperaturas de injetor e detector foram de 250 °C e 230 °C respectivamente, com razão de split 1:30 e injeção de 1µl de amostra (5×10^{-6} kg de extrato diluído em 1ml de acetato de etila, P.A., EM Science, lote 3903991, USA). A coluna foi aquecida a 100 °C por 5 min e então aumentada para 280 °C a 10 °C/min, permanecendo nesta por 10 minutos. A identificação de substâncias foi baseada na análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do CG/EM (Nist 69 Library), literatura (CARDOSO *et al*, 1997; CARDOSO *et al*, 1998; VAN BEEK *et al*, 1984a) e com padrões de coronaridina (79,55%), voacangina (80,99%) e isovoacangina (100%) cedidos pelo Prof. Dr. Raimundo Braz Filho da Universidade Estadual do Norte Fluminense (Rio de Janeiro- Brasil). As análises foram feitas no Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas- IAC- Campinas.

3.4.4- Cromatografia a Gás com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC)

Após a identificação por CG-EM, fez-se a quantificação dos alcalóides por Cromatografia a Gás com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC) (*Shimadzu*, CG 17A, Kyoto Japão), com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (*J&W Scientific*; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas de injetor e detector foram de 250 °C e 280 °C respectivamente, sendo mantidas as condições de vazão dos gases, volume de injeção e programação iguais ao do CG-EM. Todos os extratos foram quantificados por CG-DIC, sendo esta análise realizada no Laboratório de Separações Físicas- LASEFI- DEA/ FEA- UNICAMP.

3.4.5- Preparo da Curva Padrão

As curvas padrão foram realizadas utilizando Cromatografia a Gás com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC) (*Shimadzu*, CG 17A, Kyoto Japão), utilizando as mesmas condições de temperatura do injetor e detector e programação de temperatura da coluna. Foi adotado o método cromatográfico de padronização externa com os padrões coronaridina e

voacangina, sendo utilizado o método de diluições sucessivas. As curvas padrão encontram-se no Anexo C, e os cromatogramas e espectros de massa dos padrões no Anexo I.

3.5- Estimativa dos Parâmetros Cinéticos

Com os dados experimentais, foram construídas curvas de extração similares à Figura 3.5

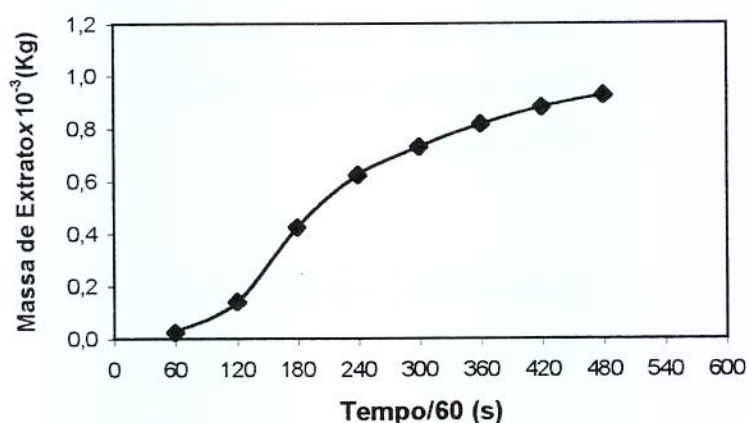


Figura 3.5: Curva de extração de alcalóides indólicos de *T.catharinensis* (TA4), a 35 °C, 250 bar, 4,6% (m/m) de etanol, a vazão de $5,3 \times 10^{-3}$ kg/s de solvente total.

A partir da curva de extração, obteve-se uma estimativa inicial dos parâmetros taxa de extração para o período de velocidade constante (M_{cer}) e duração da etapa de taxa constante de extração (t_{cer}). Esses dados iniciais foram utilizados em um programa escrito em linguagem SAS 6.12 de ajuste linear, que forneceu novos parâmetros para M_{cer} e t_{cer} . Estes foram empregados em um outro programa de ajuste não linear, para se obter uma estimativa final para os parâmetros. O procedimento acima descreve as curvas de extração por um spline linear, e a interação das retas foi determinada pelo algoritmo de FREUND e LITTELL (1995). Com estes valores finais, pôde-se então calcular o valor de razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna (Y_{cer}), conforme descrito por POVH *et al*

(2001) e RODRIGUES *et al* (2001). Nos Anexos J e L, encontram-se os dados de saída dos programas de ajuste linear e não linear, respectivamente.

3.6- Imprevistos

Alguns contratemplos afetaram o andamento do trabalho. Na etapa de extração exaustiva, foram feitos ao todo 7 ensaios, entretanto, foram considerados para análise apenas 4 ensaios. Os outros ensaios foram descartados, pois verificou-se um acúmulo de soluto bruto no filtro da célula, uma vez que se realizavam duas extrações consecutivas, com simples troca de matéria prima. Isso implicou na obtenção de valores errados da razão mássica máxima de soluto no sólido (X_0) (Anexo D). Em outras etapas, ou melhor, na etapa analítica, surgiram dificuldades principalmente com relação à manipulação dos alcalóides padrão e criação de uma metodologia para a construção das curvas padrão sem perda ou degradação dos alcalóides. Mesmo sabendo da instabilidade dos alcalóides em certos reagentes, pouco se sabe da ação específica nos alcalóides em questão (coronaridina e voacangina). Esse ponto foi motivo de atenção. Em análises de CCD, quando se utilizou clorofórmio como solvente na amostra padrão de coronaridina, verificou-se a degradação da mesma através do escurecimento (incolor-amarelado para preto). O mesmo não aconteceu quando se utilizou acetato de etila como solvente. Outra dificuldade, foi a construção da curva padrão. Na utilização de acetato de etila como solvente a temperatura ambiente, ocorria a rápida evaporação do mesmo, modificando rapidamente o valor da concentração da solução. Esse inconveniente atrasou o trabalho, sendo necessário refazer a curva várias vezes. Para sanar este problema, utilizou-se uma cuba, na qual colocavam-se béqueres com acetato de etila meia hora antes de se iniciar as diluições, para que o ambiente ficasse saturado. Após este tempo, faziam-se as diluições, mantendo-se as amostras nesta cuba até a injeção desta no cromatógrafo. O mesmo critério de saturar o ambiente foi feito também para a pesagem das amostras diluídas dentro da balança analítica.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

4- RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1- Caracterização da Matéria Prima

A caracterização das matérias primas seguiu os procedimentos descritos na Seção 3.1. A Tabela 4.1 apresenta os valores do teor de umidade (%), diâmetro da partícula (D_p), densidade real (d_r), densidade aparente (d_a), e porosidade do leito de partículas (ϵ).

Tabela 4.1: Caracterização do leito de partículas de *T. catharinensis*

Matéria Prima	Origem	Umidade (% b.u.)	Distribuição granulométrica (mesh)	D_p (mm)	d_r (kg/m ³)	d_a (kg/m ³)	ϵ
TA1	Ribeirão Preto/ SP	8,2	de 24 à 48	0,648	1126	326	0,710
TA2	Guará- Ribeirão Anhumas/SP	7,9	de 24 à 48	0,648	1022	326	0,679
TA3	Guará- Campinas/SP	8,2	de 32 à 80	0,529	927	371	0,600
TA4	Guará- Campinas/SP	8,3	de 24 à 48	0,627	1097	354	0,677

A princípio a densidade real das partículas seria determinada pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP, utilizando a técnica de picnometria em gás Hélio. Porém, foi enviado um parecer relatando a impossibilidade dessa análise devido a não estabilização do equipamento durante a análise. Segundo o químico responsável pela análise, essa impossibilidade provavelmente se deve ao fato das amostras apresentarem poros muito pequenos ou simplesmente possuírem poros fechados. Dessa forma, foi utilizado o método proposto por BUCZEK e GELDART (1986) para se calcular a densidade real das partículas, sendo necessárias várias repetições para se obter valores com precisão de $\pm 0,02$ gramas.

4.2- Resultados das Extrações com Fluido Supercrítico

4.2.1- Efeito da Origem da Matéria Prima e Partes da Planta

A Tabela 4.2 mostra os valores de rendimento obtidos na extração com as diferentes matérias primas, e as curvas globais de extração encontram-se na Figura 4.1. Os resultados de cada extração obtidos nesta primeira etapa experimental encontram-se no Anexo E.

Tabela 4.2: Rendimento em soluto bruto obtido a 250 bar, 35 °C, $5,3 \times 10^{-5}$ kg/s, e 4,6% (m/m) de etanol

Matéria Prima	R_{total} (%)
TA1	1,04
TA2	0,64
TA3	0,57
TA4	1,18

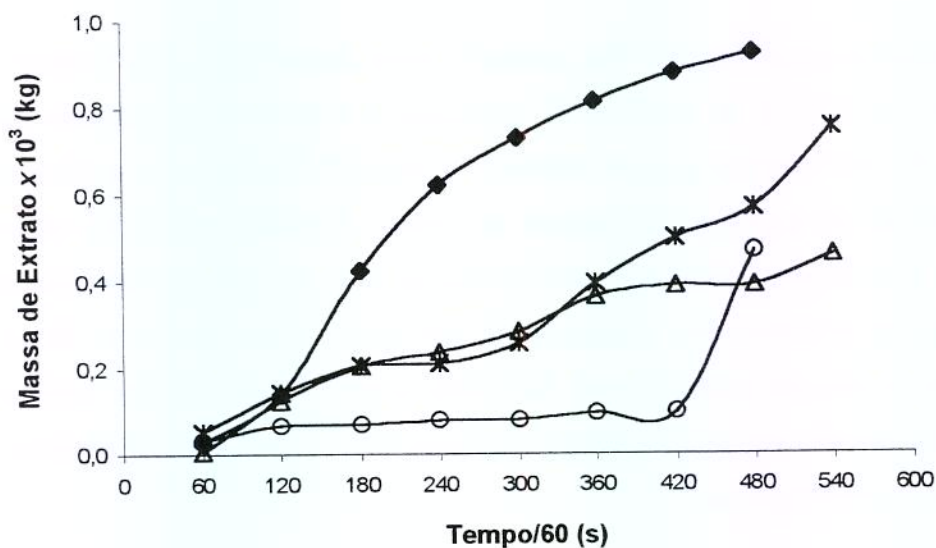


Figura 4.1: Curva de extração obtida a 250 bar, 35 °C, $5,3 \times 10^{-5}$ kg/s, e 4,6% (m/m) de etanol: Δ(TA1); ☆ (TA2); ○ (TA3); ◆ (TA4).

Analisando a Figura 4.1, verifica-se que o processo de extração que utilizou a matéria-prima TA3 apresentou um comportamento atípico. Para a confirmação de tal comportamento, foram feitos mais dois ensaios nas mesmas condições de processo, e o resultado se repetiu. Considerando que as matérias primas TA3 e TA4 são da mesma árvore, a diferença observada nos rendimentos (0,57 e 1,18%, respectivamente) e nas curvas de extração pode ser devido à parte da planta usada: tronco, galhos grossos e folhas para TA3 e galhos finos e folhas para TA4. Ao considerar que a TA3 possui maior quantidade de material celulósico, então, espera-se que a quantidade de soluto bruto seja menor que a quantidade de soluto bruto em TA4, como comprovam os resultados.

Comparando as matérias primas TA1, TA2 e TA4, que são de mesma granulometria média e mesma parte da planta, verificou-se que TA2 e TA4 tiveram rendimentos muito diferentes (0,64 e 1,18%), apesar de estas serem de mesma localidade (Guará-Campinas). Isso pode ser explicado talvez pela época de colheita da matéria prima, agosto e novembro respectivamente. Quando se comparam TA2 e TA4 com TA1, verifica-se que esta última apresentou um rendimento intermediário. Tal diferença se deve à origem da matéria prima e época de colheita (abril). A mesma influência da época de corte no teor de extrato foi encontrado por BISWAS (1973, retirado de PELLETIER, 1988). Em estudos de obtenção de alcalóides totais em várias partes de *T.sphaerocarpa*, BISWAS verificou que a quantidade de alcalóides extraídos de casca da árvore variou de 0,6% em março para 1,6% em novembro, sendo reprodutível anualmente para esta espécie de árvore. Outros fatores como condições de solo, luz, temperatura, altitude, infecções microbiológicas e herbívoros foram mencionadas por SEIGLER (1981, retirado de PELLETIER, 1988) como sendo responsáveis por diferenças na composição química. Desta forma, para *T.catharinensis*, observou-se que a época de colheita também interferiu no rendimento do extrato, apresentando um valor ótimo quando se fez a coleta em meses mais quentes, e decaindo conforme se mudou de estação.

4.2.1.1- Cinética de Extração

A Tabela 4.3 apresenta os parâmetros cinéticos calculados para o período de taxa constante de extração (CER). Nota-se que o processo realizado com a matéria prima TA4 apresentou uma taxa de extração na etapa CER muito maior que as outras matérias primas, além do maior rendimento total, o que confirma a indicação apresentada pela Figura 4.1 de melhor matéria prima a ser utilizada nesse processo de extração.

Tabela 4.3: Parâmetros operacionais para o período de taxa constante de extração.

MP	$Q \times 10^5$ (kg/s)	t _{cer} /60 (s)	M _{cer} $\times 10^8$ (kg/s)	Y _{cer} $\times 10^3$ (kg/kg)	R _{cer} (%)	R _{total} (%)
TA1	6,05	100,0	1,47	0,176	0,11	1,04
TA2	6,13	276,6	2,15	0,351	0,43	0,64
TA3	3,52	120,0	0,93	0,264	0,08	0,57
TA4	6,00	99,6	5,77	0,962	0,87	1,18

Na extração que utilizou a TA3 a vazão total do solvente foi menor devido à dificuldade em se manter o sistema estável em regime semi-contínuo para esta matéria prima, pois o aumento da vazão acarretava em um aumento da pressão do sistema. Verificou-se que para essa matéria prima o efeito da despressurização (representado pelo último ponto da curva de extração) sobre o rendimento final é bem expressivo.

4.2.1.2- Análise dos Extratos

As Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 comparam as massas dos extratos fracionados obtidos a partir das matérias primas TA1, TA2, TA3 e TA4. Algumas amostras desses extratos foram utilizadas em análises no CG-EM (identificação), e outras no CG-DIC (quantificação). Dessa forma, fez-se uma análise quantitativa das amostras 1, 4 e 6 relativas à primeira, quarta e sexta hora dos processos de extração. No Anexo N, encontram-se as massas dos alcalóides obtidas ao longo do processo de extração para cada matéria prima.

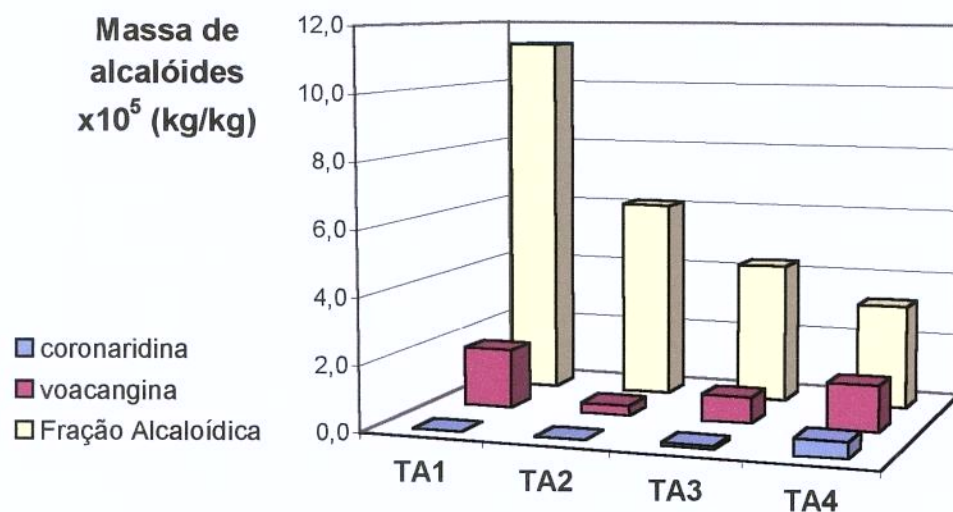


Figura 4.2: Massa de alcalóides obtida após o fracionamento na primeira hora do processo de extração para as diferentes matérias primas.

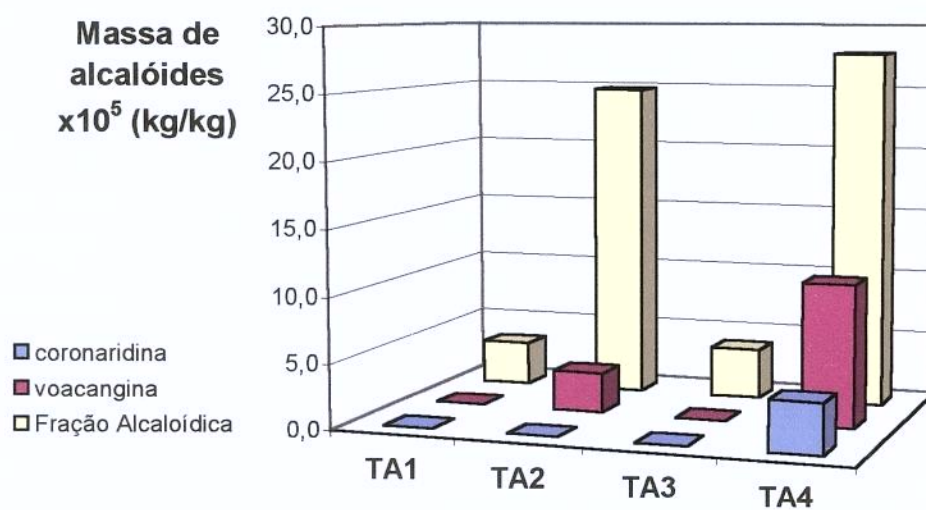


Figura 4.3: Massa de alcalóides obtida após o fracionamento na quarta hora do processo de extração para as diferentes matérias primas.

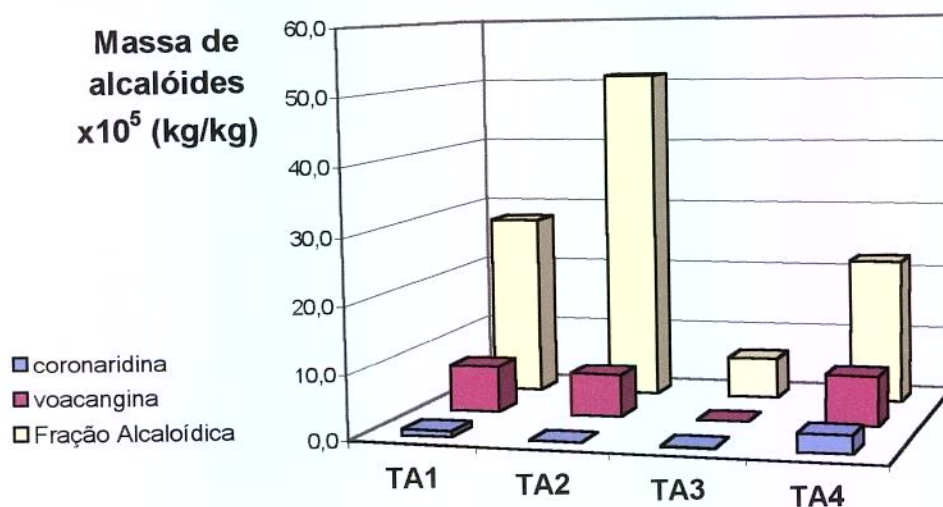


Figura 4.4: Massa de alcalóides obtida após o fracionamento na sexta hora do processo de extração para as diferentes matérias primas.

Analisando as figuras acima, verifica-se na primeira hora de processo, que apesar da TA1 apresentar maior massa de fração alcaloídica que as outras matérias primas, esta apresentou apenas traços de coronaridina, e quantidade de voacangina similar à apresentada pela TA4. Por outro lado, apesar da matéria prima TA4 ter apresentado menor massa de fração alcaloídica, esta se mostrou rica nos alcalóides coronaridina e voacangina. Para as amostras coletadas na quarta hora do processo de extração, a matéria prima que apresentou maior massa de fração alcaloídica foi a TA4, fornecendo também maior quantidade de voacangina e coronaridina. Observa-se na Figura 4.3, que a TA1 e TA3 apresentaram apenas traços de coronaridina e voacangina, e menores massas da fração alcaloídica. Na sexta hora do processo de extração, apesar das matérias primas TA1, TA2 e TA4 terem apresentado quantidades parecidas de voacangina, a TA4 apresentou maior teor em coronaridina. De um modo geral, verificou-se que o teor de coronaridina é bem menor que o teor de voacangina, aparecendo em maior quantidade na matéria prima TA4.

Da discussão anterior, tem-se que a TA4 apresentou maior rendimento em soluto bruto que as demais matérias primas, e através da análise dos extratos fracionados verificou-se que esta matéria prima mostrou-se mais rica nos alcalóides coronaridina e de voacangina.

Conforme acima descrito, em todos os casos analisados, a voacangina apresentou-se em maior quantidade. PEREIRA (1999) ao comparar o acúmulo dos alcalóides presentes em várias partes da *T.catharinensis*, verificou que a quantidade de voacangina presente na casca do caule, folhas, cerne, pericarpo e sementes foi maior que de coronaridina para o material coletado em Jaú/ SP, sendo o inverso para o coletado em Assis/SP. Dessa forma, constata-se novamente que o local de coleta e a parte do material vegetal interferem na composição dos extratos obtidos.

Outro fato importante verificado nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4, foi que o extrato fracionado é composto não só pelos alcalóides coronaridina e voacangina, mas também por outros compostos, uma vez que esses dois alcalóides representam parte da fração alcaloídica. O Anexo H mostra os cromatogramas obtidos nas análises dos extratos fracionados por CG-DIC, sendo verificada a presença de poucos compostos além da coronaridina e voacangina. CARDOSO *et al* (1998) identificou, além de alcalóides indólicos, a presença de triterpenos e esteróis em frutos verdes e maduros, sementes e casca da árvore de *T.hilariana*. Levando-se em consideração o fato do extrato bruto ter sido submetido a um fracionamento ácido-base, e de terem sido realizadas análises por CCD das frações alcaloídicas, utilizando várias misturas de eluentes e reveladores (Anexo O), verificou sempre a presença de uma única mancha, característica dos alcalóides de interesse, e o fato de ter sido verificado nas análises por espectrofotometria UV-Visível (Anexo P) a presença de uma banda intensa em 291nm, típica dos alcalóides coronaridina e voacangina (GUNASEKERA *et al*, 1980, VAN BEEK *et al* 1985), pressupõe-se que estes compostos sejam alcalóides. Muitos alcalóides são termolábeis. CARDOSO *et al* (1997) observou ao longo de seu trabalho que amostras finais de alguns alcalóides oxidavam-se quando mantidas a temperatura ambiente. Estas não foram detectadas em CG por já terem sido degradadas, principalmente os compostos polares. Portanto, supõe-se que os demais alcalóides não detectados por cromatografia a gás podem ter sofrido degradação.

Segundo RATES (1989), alcalóides do tipo iboga, como voacangina, coronaridina e coronaridina hidroxindolenina isolados de *Peschiera australis*, são já esperados para a tribo Tabernaemontanae, entretanto, a origem da presença de hidroxindoleninas em plantas é discutível. O anel indólico pode sofrer facilmente reações de auto-oxidação que conduzem à formação de hidroxiperóxidos e a seguir, hidroxindoleninas. Finalmente, estas últimas se transformam em pseudo-indoxil, que, geralmente, acompanham outros produtos de oxidação.

Tendo em vista a possível existência de outros alcalóides, vê-se a necessidade de se utilizar outras técnicas auxiliares, como Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE), Infravermelho (IR) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13 (RMN de ^1H e ^{13}C) para tentar elucidar tais estruturas.

4.2.2- Ensaios de Extração Total

Nesta etapa, foram feitos 4 ensaios de extração exaustiva, utilizando a matéria prima TA4, a 250 bar, 35 °C, vazão média do solvente de $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s, e 4,6% (m/m) de etanol. Os resultados são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Razão mássica máxima de soluto no sólido para a matéria prima TA4

Nº do Experimento	$X_o \times 10^2$ (kg _{soluto} / kg _{alimentação})
1	1,12
2	1,06
3	1,46
4	1,41
média	1,26
desvio padrão	0,20

Ao compararmos esses valores com o rendimento obtido nos experimentos iniciais com TA4, cujo rendimento foi de 1,18%, verifica-se que o processo é bem eficaz, uma vez nos ensaios de extração exaustiva obteve-se 1,26%.

4.2.3- Efeito das Variáveis de Processo sobre o Rendimento

Para a terceira série de experimentos, foi utilizada a matéria prima TA2, pois era a que estava disponível em maior quantidade. A matéria prima TA3 apresentou um comportamento atípico, sendo a TA2 e a TA4 matérias primas não disponíveis em quantidade o suficiente para a realização das outras etapas do trabalho. Da discussão anterior, observou-se que para a *T.catharinensis* a época de colheita interferiu no rendimento do extrato. Dessa forma, mesmo que se fizesse uma nova colheita, preparação e caracterização da matéria prima de origem igual à TA4, os resultados finais poderiam apresentar certas diferenças. Sendo assim, vê-se a necessidade de um estudo mais aprofundado da sazonalidade *T.catharinensis*, para então conhecer ao certo a melhor época de colheita de se conseguir a maior quantidade possível nos compostos de interesse. Entretanto, se for considerado que todas as matérias primas são da mesma espécie e apresentam os mesmos compostos, apesar de em quantidades diferentes, a escolha da TA2 para ser utilizada nas próximas etapas de estudo não deve acarretar nenhum problema para a identificação das condições ótimas de temperatura e pressão, uma vez que todas contêm os mesmos solúveis.

Na determinação das melhores condições experimentais, fez-se uma comparação entre os rendimentos obtidos em todos os ensaios dessa segunda série de experimentos. Os resultados de cada extração obtidos nesta etapa experimental encontram-se no Anexo F. Observa-se que o melhor rendimento e melhor condição experimental ocorreu a 55 °C e 300 bar (0,64%), como mostram a Tabela 4.5 e Figura 4.5.

Tabela 4.5: Rendimento obtido a $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s e 4,6% (m/m) de etanol

T (°C)	P (bar)	densidade do CO ₂ (kg/m ³)	R _{total} (%)
35	200	866,8	0,50
35	300	930,2	0,39
45	250	858,4	0,61
45	250	858,4	0,61
55	200	755,9	0,49
55	300	851,5	0,64

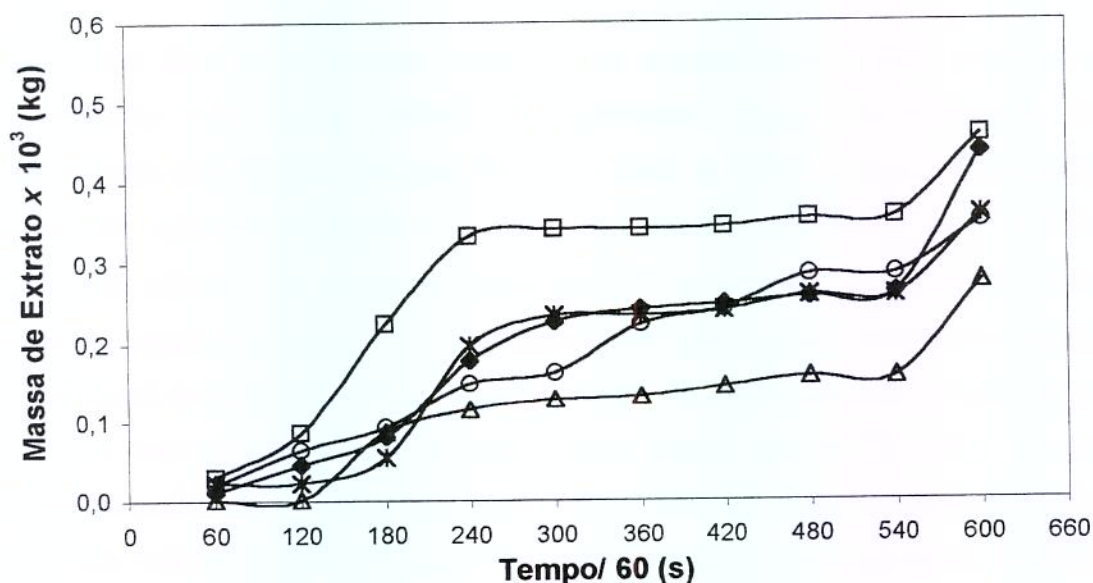


Figura 4.5: Curva de extração obtida a $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s e 4,6% (m/m) de etanol: ☆ (T=35 °C / P=200 bar); △ (T=35 °C / P=300 bar); ◆ (T=45 °C / P=250 bar); ○ (T=55 °C / P=200 bar); □ (T=55 °C / P=300 bar).

Analisando a Tabela 4.5, observa-se que a 55 °C, quando se elevou a pressão de 200 para 300 bar, a densidade do CO₂ aumentou (variação de 95,6 kg/m³) e o rendimento aumentou (0,15%). Por outro lado, a 35 °C, a mesma variação de pressão, também promoveu um aumento na densidade (variação de 63,4 kg/m³), entretanto o rendimento diminuiu (0,11%). Este comportamento não era esperado, no entanto sabe-se que a solubilidade de certos compostos em solventes pressurizados apresenta um comportamento retrógrado (HOYER, 1985, SCHAEFFER *et al*, 1899, SALDAÑA *et al* 1999, POVH, 2000). Este comportamento (diminuição da solubilidade com aumento da temperatura) é atribuído aos efeitos da pressão de vapor, que aumenta com a temperatura, e da densidade do solvente que diminui com a temperatura, o que resulta na redução da solubilidade. A Figura 4.6 mostra o efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do soluto bruto.

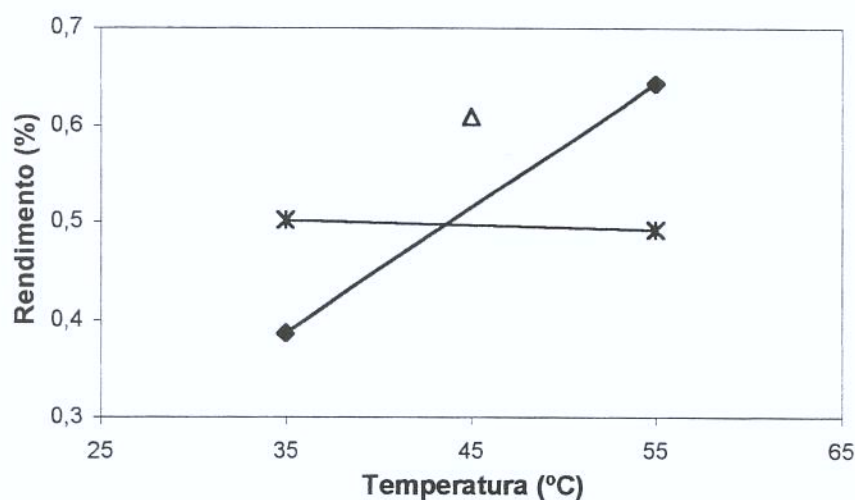


Figura 4.6: Comportamento apresentado pelo rendimento do soluto bruto com relação à temperatura e pressão: ☆ (P= 200 bar); △(P= 250 bar); ◆ (P= 300 bar).

Um fato importante observado foi a ocorrência de um aumento considerável no rendimento quando se fez a despressurização do sistema (último ponto, referente à décima hora de processo). Isso indica que o fator fluidodinâmico interfere de modo positivo na retirada do soluto bruto da matriz sólida (Figura 4.5).

Da discussão anterior, temos que além da temperatura e pressão, ou densidade do solvente, o efeito fluidodinâmico na coluna influencia e modifica o rendimento em soluto bruto.

4.2.3.1- Cinética de Extração

A Figura 4.5 apresentou as curvas de extração nas diferentes condições de operação. Como pode ser observado, com exceção do ponto da despressurização, duas retas descrevem basicamente as curvas de extração. A Tabela 4.6 apresenta os parâmetros cinéticos calculados para o período de taxa constante de extração (CER).

Tabela 4.6: Parâmetros operacionais para o período de taxa constante de extração

P (bar)	T (°C)	Vazão	t _{cer} /60 (s)	M _{cer}	Y _{cer}	R _{cer} (%)	R _{total} (%)
		10 ⁵ (kg/s)		10 ⁸ (kg/s)	10 ³ (kg/kg)		
200	35	4,65	300,0	1,67	0,358	0,32	0,50
300	35	3,90	244,9	1,20	0,309	0,17	0,39
250*	45*	4,26	315,5	1,58	0,370	0,33	0,61
200	55	4,73	260,1	1,16	0,246	0,22	0,49
300	55	3,95	245,4	2,91	0,737	0,47	0,64

* valor médio

Verifica-se que o processo a 300 bar e 55 °C, apresentou uma taxa de extração superior às outras condições de operação, além de maiores valores de Y_{cer} e R_{total}. Portanto, qualquer que seja o critério adotado (R_{total}, M_{cer}, etc.), a melhor condição de operação é 55 °C e 300 bar. A vazão de operação é sempre uma co-variável, pois ainda que possa ser monitorada e controlada durante todo o ensaio, é uma quantidade de difícil reprodução. Porém, embora o ensaio a 300 bar e 55 °C tenha apresentado menor vazão, foi nesta condição que ocorreu maior rendimento no processo de extração. Vale ressaltar que para quase todas as condições experimentais a inclinação da reta tangente à curva na segunda etapa de processo (entre 4 e 9 horas, com exceção do ponto da despressurização) é praticamente nula, ou seja, a etapa decrescente de extração está completamente definida.

4.2.3.2- Análise dos Extratos

A Tabela 4.7 mostra as massas dos alcalóides obtidos após o fracionamento, nas diferentes condições de temperatura e pressão, podendo seus efeitos ser melhor visualizados na Figura 4.7 e na Figura 4.8.

Tabela 4.7: Massa de alcalóides* obtida após o fracionamento em diferentes condições de temperatura e pressão

P (bar)	T (°C)	Fração Alcaloídica	Coronaridina	Voacangina
		10 ⁵ (kg/kg)	10 ⁵ (kg/kg)	10 ⁵ (kg/kg)
200	35	118,4	2,84	21,02
300	35	158,0	0,49	32,48
250**	45**	286,4	5,36	66,06
200	55	230,9	3,21	49,69
300	55	284,6	2,74	65,61
** desvio padrão		45,9	0,06	10,32

* com relação à massa de alimentação

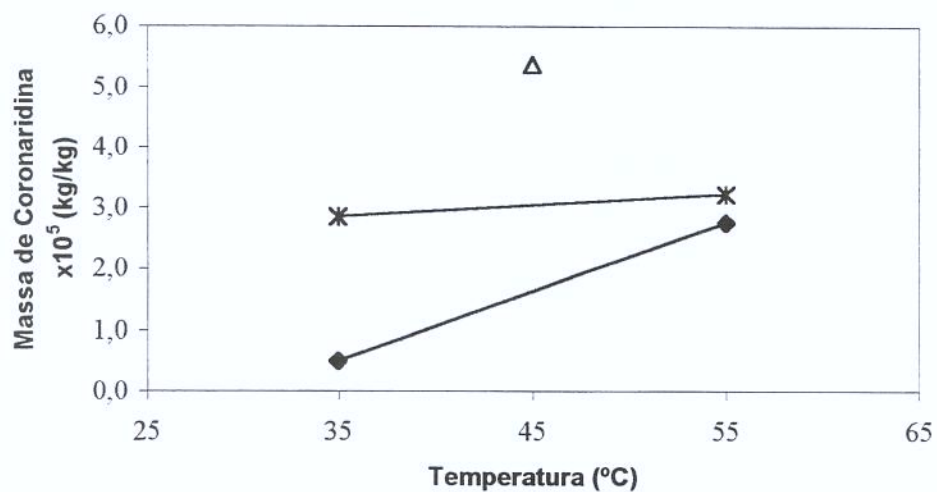


Figura 4.7: Comportamento apresentado pelo teor de coronaridina com relação à temperatura e pressão: * (P=200 bar); Δ (P=250 bar); $\blacklozenge$ (P= 300 bar).

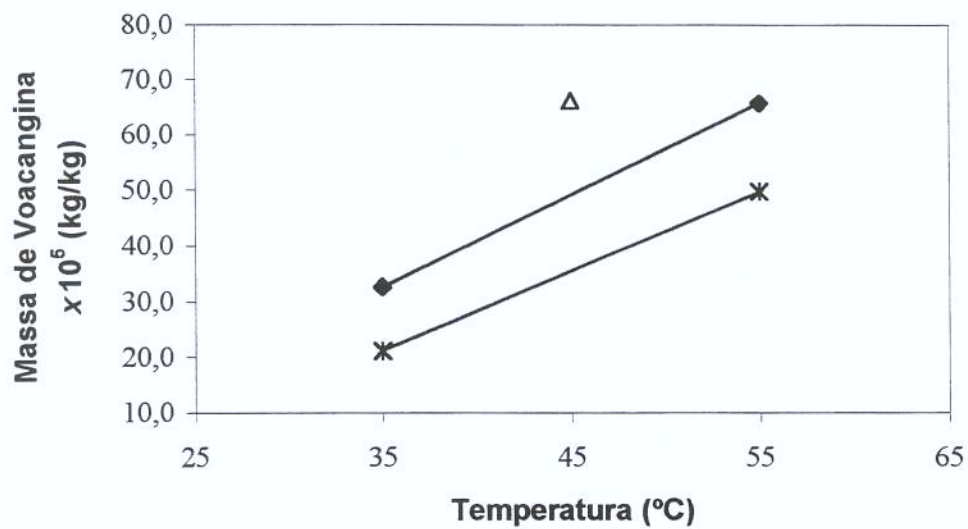


Figura 4.8: Comportamento apresentado pelo teor de voacangina com relação à temperatura e pressão: * (P=200 bar); Δ (P=250 bar); $\blacklozenge$ (P= 300 bar).

Para a coronaridina, a elevação da temperatura de 35 para 55 °C a 200 bar, forneceu um aumento na quantidade extraída em $0,37 \times 10^{-5}$ kg/kg, e a 300 bar em $2,25 \times 10^{-5}$ kg/kg. Sendo assim, o efeito do aumento da temperatura é mais expressivo a 300 bar. Por outro lado, a 35 °C aumento da pressão de 200 para 300 bar, causou uma diminuição na quantidade extraída em $2,35 \times 10^{-5}$ kg/kg e a 55 °C em $0,47 \times 10^{-5}$ kg/kg, neste caso o efeito da pressão é maior a 35 °C do que a 55 °C. A quantidade máxima desse alcalóide foi obtida a 45 °C / 250 bar ($5,36 \times 10^{-5}$ kg/kg).

Com relação à voacangina, o aumento tanto da temperatura quanto da pressão causou um aumento na sua quantidade extraída. Observa-se que a 200 bar, a elevação de temperatura de 35 para 55 °C promoveu um aumento na quantidade extraída em $28,67 \times 10^{-5}$ kg/kg, e a 300 bar em $33,13 \times 10^{-5}$ kg/kg, indicando que também a 300 bar o efeito do aumento da temperatura é mais efetivo. E por outro lado, a 35 °C o aumento da pressão de 200 para 300 bar aumentou a quantidade extraída em $11,46 \times 10^{-5}$ kg/kg, e a 55 °C em $15,92 \times 10^{-5}$ kg/kg, neste caso o efeito da pressão é maior a 55 °C do que a 35 °C. Sendo assim, para a voacangina, o efeito da temperatura é mais pronunciado que o efeito da pressão, tornando-se mais evidente a 300 bar que a 200 bar. Verifica-se que a 45 °C/ 250 bar também houve maior extração desse alcalóide ($66,06 \times 10^{-5}$ kg/kg).

Em ambos, houve maior produção dos alcalóides a 45 °C/ 250 bar. Quando se analisa os dois alcalóides (C+V), verifica-se que o efeito de temperatura e pressão sobre estes se torna similar ao efeito dado somente à voacangina, uma vez que este último está presente em maior quantidade, como se observa na Figura 4.9. Entretanto, a coronaridina não pode ser desprezada, pois segundo DELORENZI (1998), a sua presença no extrato tem importante ação na atividade leishmanicida.

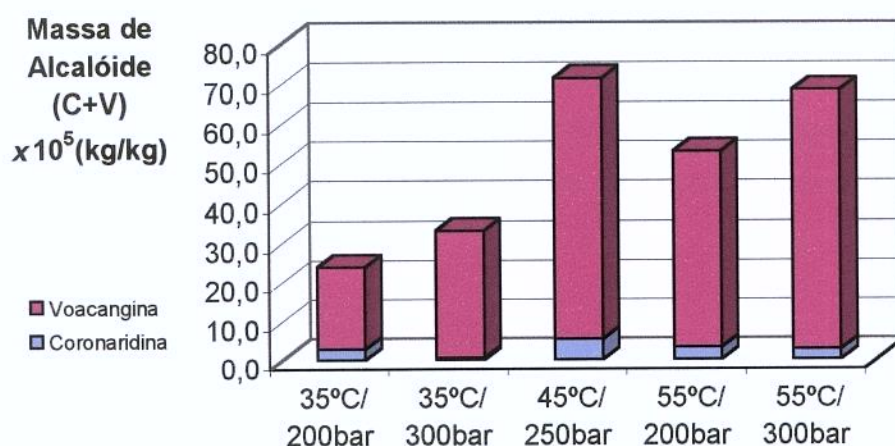


Figura 4.9: Comparação entre as quantidades de coronaridina + voacangina obtidos nas diferentes condições de processo.

4.2.3.3- Efeito do Perfil de Pressão sobre o Rendimento

Para verificar o efeito do perfil de pressão sobre o rendimento, foi realizado um outro ensaio a 45 °C e 250 bar. Neste ensaio, fez-se a pressurização do sistema até 250 bar, a uma vazão total de solvente de $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s, sendo em seguida feita a despressurização do mesmo até 70 bar, abrindo-se a válvula micrométrica, sem controle da vazão. Esse processo ocorreu por seis vezes seguidas (pressurização- despressurização), desta forma o processo ocorreu de modo intermitente. Os valores de rendimento obtidos nos dois tipos de processo encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Rendimento obtido em soluto bruto para os diferentes processos

Processo	Rendimento (%)
Semi-Contínuo (sem despressurização)	0,35
Semi-Contínuo (com despressurização)	0,61
Intermitente	0,58

A Figura 4.10 mostra as curvas de extração obtidas nos dois processos de extração, incluindo um desenho esquemático desta ao longo do tempo. Observou-se que o rendimento total quase não se alterou. Entretanto, vale lembrar que o alto rendimento obtido no processo semi-contínuo foi atingido após 9 horas de operação e os 45 minutos de despressurização.

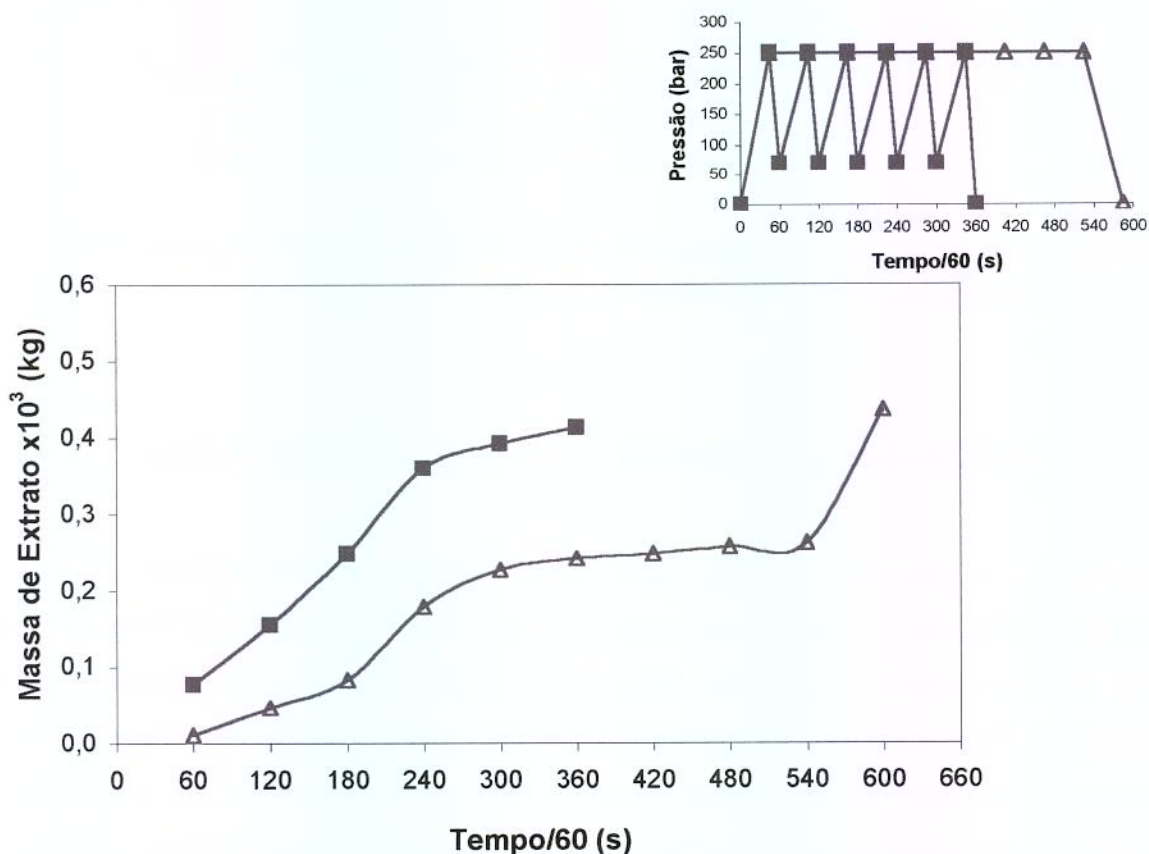


Figura 4.10: Curva de extração obtida a 45 °C, 250 bar, $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s e 4,6% (m/m) de etanol: $\triangle$ (processo semi-contínuo) e $\blacksquare$ (processo intermitente).

A Tabela 4.9 mostra as massas dos alcalóides obtidos após o fracionamento, para os processos de extração semi-contínuo e intermitente. Nota-se que houve um aumento de 28,0% na quantidade de coronaridina e um aumento de 27,7% na quantidade de voacangina (em 360min) quando extraídos pelo processo intermitente. Para considerar a quantidade total dos alcalóides extraídos pelo processo semi-contínuo (em 600min), foi necessário estimar a quantidade de alcalóides produzida pelo outro processo. Obteve-se essa

estimativa através da inclinação da reta tangente à curva de extração na segunda fase de processo (a partir de 4 horas). Verifica-se que o processo intermitente forneceu um maior rendimento em ambos alcalóides (aumento de 60,9% e 7,3% de coronaridina e voacangina, em 600 min). Dessa forma, pode-se concluir que o processo intermitente é mais indicado tanto por promover uma maior extração em soluto bruto e em alcalóides (coronaridina e voacangina) quanto por permitir menor tempo de processo.

Tabela 4.9: Massa de alcalóides* extraída nos diferentes processos de extração

Processo	t= 360min		t= 600min*	
	Coronaridina 10 ⁵ (kg/kg)	Voacangina 10 ⁵ (kg/kg)	Coronaridina 10 ⁵ (kg/kg)	Voacangina 10 ⁵ (kg/kg)
Semi-Contínuo	5,40	39,27	5,40	58,76
Intermitente	6,91	50,13	8,69	63,06

* com relação à alimentação

** estimativa para o processo intermitente

No processo intermitente, esse aumento no teor de alcalóides, pode ser devido à ocorrência do rompimento de células pelo efeito da despressurização, permitindo que essas substâncias estejam mais facilmente disponíveis para sua retirada do material sólido. O processo de moagem permitiu que a matéria prima tivesse uma quebra na sua estrutura celulósica, porém, após a moagem ainda existem células intactas. O processo intermitente se torna ainda mais importante quando se trata do alcalóide coronaridina, uma vez que este se encontra em menor quantidade.

4.2.4- Efeito da Vazão total de Solvente e Percentagem de Co-solvente

Na quarta série de experimentos, os efeitos da vazão total de solvente e percentagem de co-solvente foram investigados a 300 bar e 55 °C, uma vez que a essa temperatura e pressão conseguiu-se um melhor rendimento em soluto bruto. No Anexo G, encontram-se os resultados de cada extração obtidos nesta série de experimentos. Primeiro, a percentagem de co-solvente foi duplicada (9,2 % m/m de etanol). Verificou-se um aumento no rendimento de soluto bruto, como pode ser observado na Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Rendimento em soluto bruto obtido em dois níveis de percentagem de co-solvente

Teor de co-solvente (%)	R _{total} (%)
4,6	0,64
9,2	0,84

Com relação à composição do extrato fracionado, o aumento na percentagem de co-solvente (etanol), provocou um aumento, em cerca de 15%, na quantidade de alcalóides extraídos, tanto em coronaridina quanto em voacangina (Tabela 4.11).

Tabela 4.11: Quantidade de alcalóides extraída em dois níveis de percentagem de co-solvente

Teor de co-solvente (%)	Coronaridina $\times 10^5$ (kg/kg)	Voacangina $\times 10^5$ (kg/kg)
4,6	2,74	65,61
9,2	3,12	75,39

Dessa forma, os ensaios feitos para se verificar o efeito da vazão de solvente foram realizados a 9,2% de co-solvente, tendo a vazão total do solvente variado de $1,53 \times 10^{-5}$ kg/s a $6,12 \times 10^{-5}$ kg/s.

Essa etapa tinha como propósito determinar experimentalmente a solubilidade do soluto bruto em CO₂ supercrítico + etanol pelo método dinâmico. Entretanto, isso não foi possível devido à forte interação da estrutura celulósica com etanol. Sendo assim, para essa etapa fez-se apenas uma análise do efeito do aumento da vazão no rendimento do soluto bruto, calculou-se os parâmetros cinéticos, além da análise dos extratos fracionados.

4.2.4.1- Cinética de Extração

A Figura 4.11 apresenta as curvas de extração nas condições de operação, e da mesma forma, com exceção do ponto da despressurização, duas retas podem descrever basicamente as curvas de extração. A Tabela 4.12 apresenta os parâmetros cinéticos calculados para o período de taxa constante de extração.

Tabela 4.12: Parâmetros operacionais para o período de taxa constante de extração (CER).

P (bar)	T (°C)	Vazão 10^5 (kg/s)	t _{cer} /60 (s)	M _{cer} 10^8 (kg/s)	Y _{cer} 10^3 (kg/kg)	R _{cer} (%)	R _{total} (%)
300	55	1,53	489,0	1,30	0,85	0,47	1,22
300	55	2,60	236,3	3,32	1,28	0,50	1,05
300	55	3,53	214,3	3,28	0,93	0,45	0,84
300	55	5,28	118,0	9,98	1,89	0,58	1,01
300	55	6,12	131,0	4,97	0,81	0,76	0,96

Nota-se que os maiores valores de M_{cer} ($9,98 \times 10^{-8}$ kg/s) e Y_{cer} ($1,89 \times 10^{-3}$ kg/kg), ocorreram a $5,28 \times 10^{-5}$ kg/s, apesar do R_{total} (1,01%) ter sido um pouco menor que o obtido a vazões de $1,53$ e $2,60 \times 10^{-5}$ kg/s. Entretanto, o alto rendimento obtido nessas duas vazões (1,22% e 1,05%) só foi adquirido ao final do processo, quando fez-se a despressurização do sistema (último ponto da curva de extração, Figura 4.11). Neste caso, a taxa de extração para o período CER (M_{cer}) e a razão mássica soluto na fase supercrítica na saída da coluna (Y_{cer}) são parâmetros mais importantes, e dessa forma decisivos na escolha da melhor condição de processo.

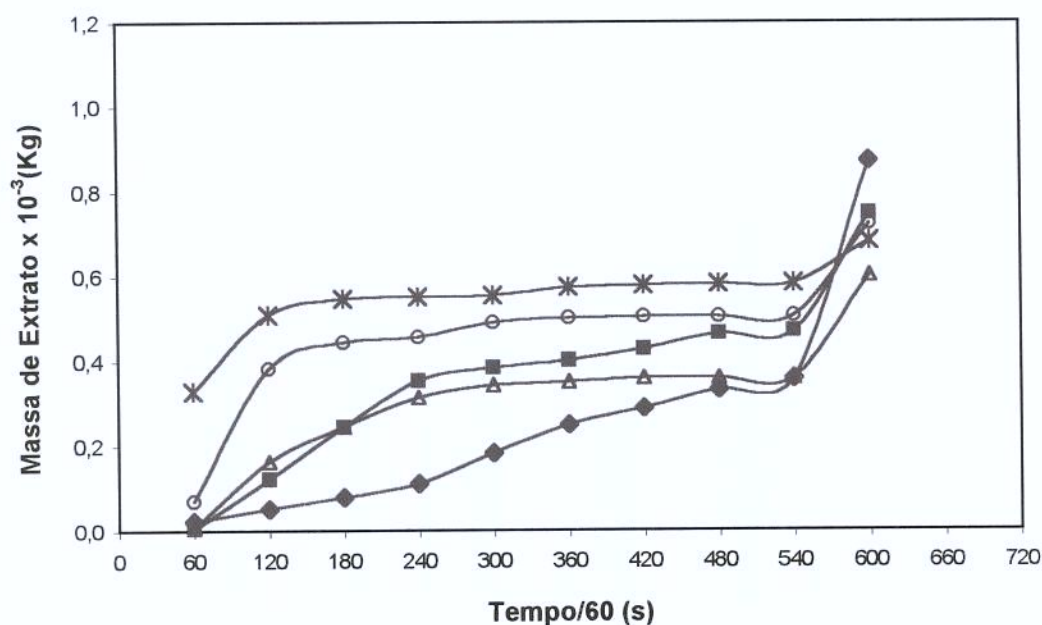


Figura 4.11: Curva de extração obtida a 55 °C, 300 bar e 9,2% (m/m) de etanol: ◆ ($1,5 \times 10^{-5}$ kg/s); ■ ($2,6 \times 10^{-5}$ kg/s); △ ($3,53 \times 10^{-5}$ kg/s); ○ ($5,28 \times 10^{-5}$ kg/s); ☆ ($6,12 \times 10^{-5}$ kg/s).

Pela Figura 4.11, pode-se notar também, que a partir de 240 minutos, a taxa de extração é praticamente constante, com exceção do ensaio à vazão de $1,53 \times 10^{-5}$ kg/s.

Para melhor visualização, plotou-se o rendimento total em tempos de 120 min, 180 min, 240 min e despressurização (Figura 4.12 e Tabela 4.13). Verifica-se claramente o efeito da despressurização (a $1,5 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total de solvente) e a real influência no uso de vazões elevadas.

Tabela 4.13: Comparação entre os valores de rendimento em soluto bruto obtidos em diferentes condições de vazão total do solvente ao longo do tempo.

	t =120min	t =180min	t =240min	Despressurização
Vazão $\times 10^5$ (kg/s)	Rendimento (%)			
1,53	0,07	0,11	0,16	1,22
2,60	0,17	0,34	0,50	1,05
3,53	0,23	0,34	0,44	0,84
5,28	0,53	0,62	0,64	1,01
6,12	0,71	0,77	0,77	0,96

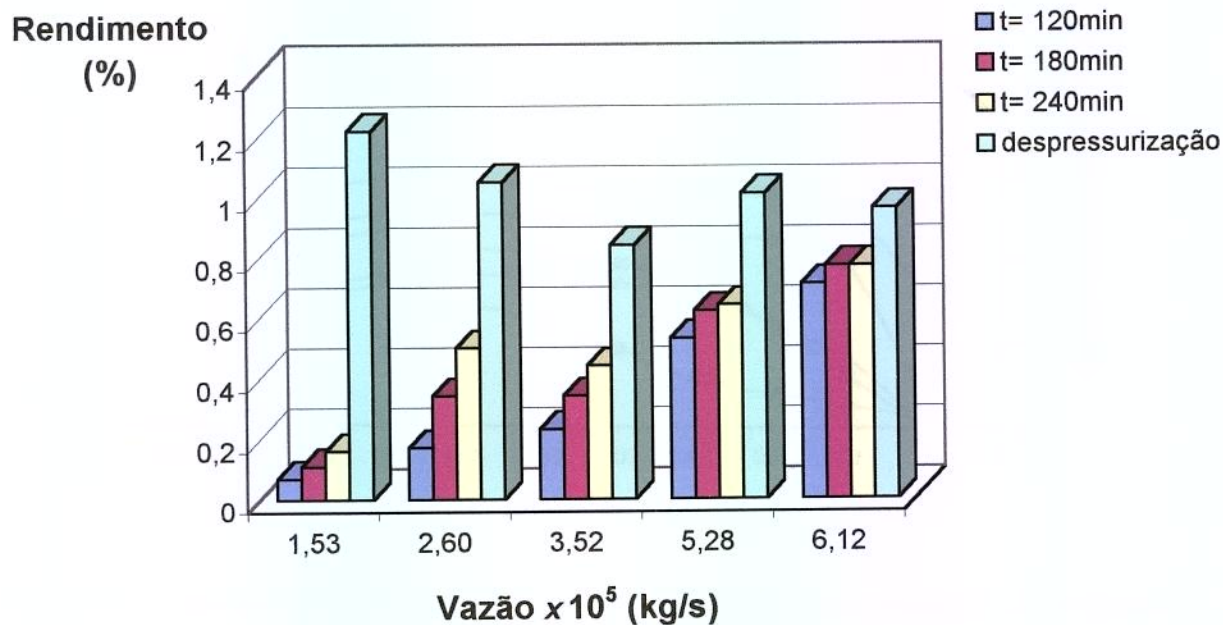


Figura 4.12: Representação da quantidade de soluto bruto obtida ao longo do tempo nas diferentes condições da vazão total do solvente.

4.2.4.2- Análise dos Extratos

A Tabela 4.14 apresenta as massas obtidas nos processos de extração nas diferentes condições de vazão total do solvente.

Tabela 4.14: Massa de alcalóides* obtida em diferentes condições de vazão total do solvente

Vazão $\times 10^5$ (kg/s)	Fração Alcaloídica 10^5 (kg/kg)	Coronaridina 10^5 (kg/kg)	Voacangina 10^5 (kg/kg)
1,53	331,0	2,29	55,67
2,60	494,5	5,53	93,45
3,53	552,9	3,12	75,39
5,28	606,9	1,37	86,34
6,12	428,9	9,08	71,33

* com relação à massa de alimentação

Com relação ao efeito da variação de vazão total do solvente, a 55 °C e 300 bar, verifica-se que apesar da vazão de $2,6 \times 10^{-5}$ kg/s ter apresentado maiores rendimentos em alcalóides: coronaridina + voacangina ($98,98 \times 10^{-5}$ kg/kg, Tabela 4.14), devido ao efeito da despressurização, as vazões de 5,28 e $6,12 \times 10^{-5}$ kg/s apresentaram maiores taxa de extração desses alcalóides, como mostra esquematicamente a Figura 4.13, em termos de alcalóides: coronaridina + voacangina (C+V).

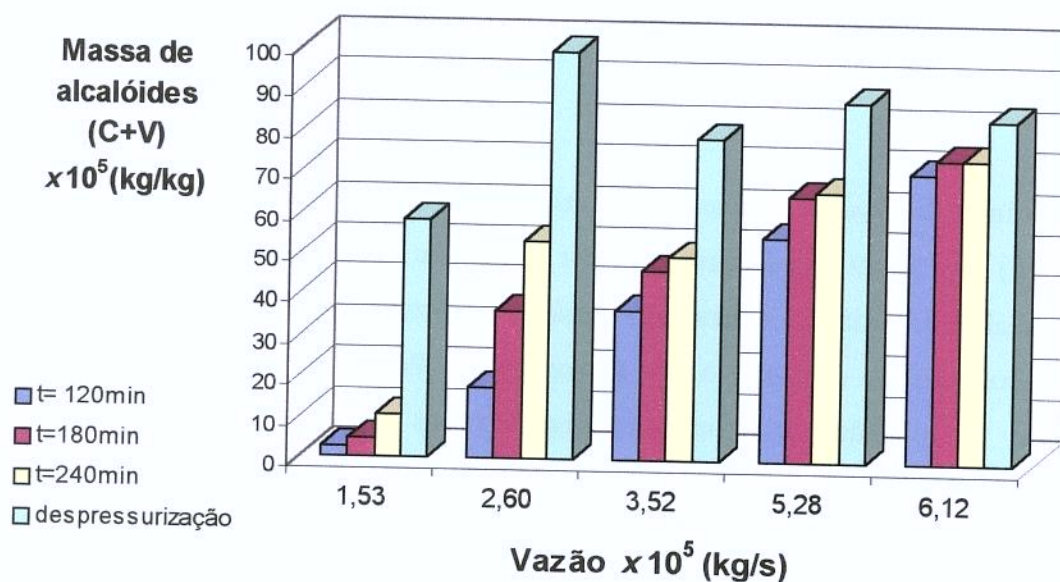


Figura 4.13: Representação da quantidade de alcalóides (coronaridina + voacangina) obtida ao longo do tempo nas diferentes condições da vazão total do solvente.

4.3- Análise Estatística

Na primeira e na quarta série de experimentos, a análise dos resultados foi realizada descritivamente nas Seções 4.4.1 e 4.2.4, uma vez que não havia graus de liberdade para a realização de uma análise de variância.

Na terceira série de experimentos, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA) para a variável resposta: teor de coronaridina e voacangina (R_{C+V}), com o objetivo de determinar a direção de máximo crescimento de R_{C+V} . Para esta, foram utilizados valores que se encontram resumidos na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Rendimento de coronaridina e voacangina obtido a $4,3 \times 10^{-5}$ kg/s, 4,6%(m/m) de etanol, em diferentes condições de operação

Condições		Rendimento $10^3(\%)*$		
P (bar)	T (°C)	Coronaridina (C)	Voacangina (V)	C + V
200	35	2,84	21,02	23,86
300	35	0,49	32,48	32,97
250	45	5,40	58,76	64,16
250	45	5,32	73,35	78,67
200	55	3,21	49,69	52,90
300	55	2,74	65,61	68,35

* com relação à alimentação

Pela análise feita, observa-se que para a variável resposta R_{C+V} os efeitos da temperatura (T) e pressão (P) não foram significativos (pvalor = 0,196 e 0,443 respectivamente). Fez-se uma nova análise de variância separando a variável resposta R_{C+V} em duas respostas R_C para a o teor de coronaridina e R_V para o teor de voacangina. Para a coronaridina, os efeitos da temperatura e pressão mostraram-se significativos (pvalor= 0,027 e 0,026, respectivamente), além de apresentar efeitos de interação (pvalor= 0,038) e curvatura (pvalor= 0,010). Entretanto, para a voacangina, a análise de variância indicou que não há evidências de que existam efeitos de temperatura, pressão, interação de fatores e nem de curvatura, pois os valores de p-valor para estes foram 0,205; 0,411; 0,864; 0,225. Sendo

assim, através do ajuste de polinômios¹ para R_{c+v} , R_c e R_v , foram construídos os gráficos das superfícies de resposta, que podem ser visualizados nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13.

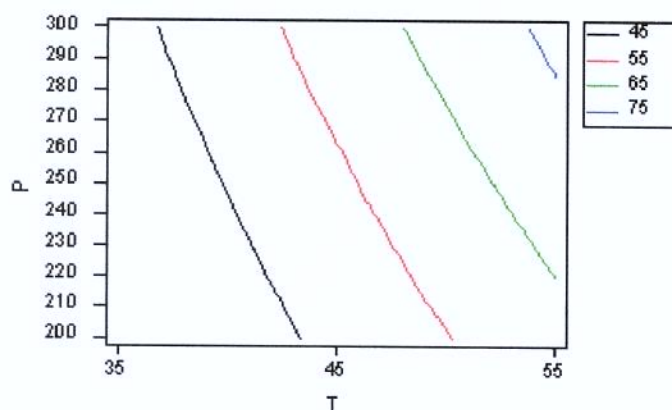


Figura 4.14: Superfície de resposta com relação ao rendimento de coronaridina + voacangina (R_{c+v}).

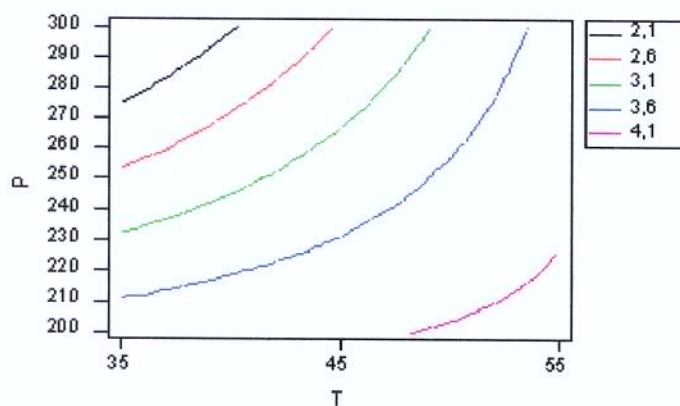


Figura 4.15: Superfície de resposta com relação ao rendimento de coronaridina (R_c)

¹ Os polinômios justados para R_{c+v} , R_c e R_v são respectivamente:

$$R_{c+v} = 44,52 + 16,105 \cdot T + 6,14 \cdot P$$

$$R_c = 2,32 + 0,655 \cdot T - 0,705 \cdot P + 0,470 \cdot T \cdot P - 3,040 \cdot T^2$$

$$R_v = 42,2 + 15,45 \cdot T + 6,845 \cdot P$$

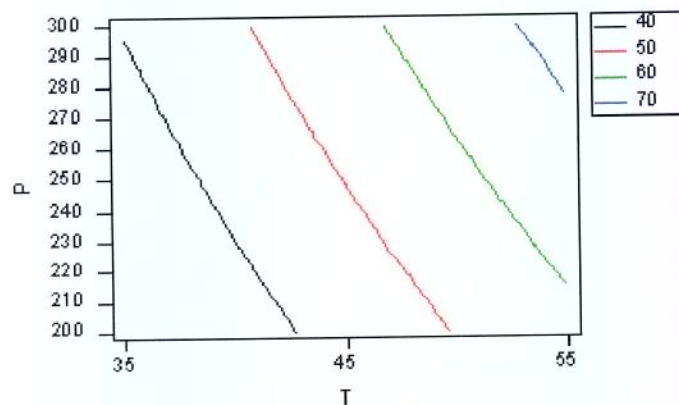


Figura 4.16: Superfície de resposta com relação ao rendimento de voacangina (R_v).

Pelos gráficos acima apresentados, verifica-se que as direções de máximo crescimento de R_{c+v} e R_v se dão na direção de 45 para 55 °C e de 250 para 300 bar, e para R_c se dá na direção de 45 para 55 °C e de 200 para 250 bar. Era de se esperar que para R_{c+v} e R_v as direções de máximo crescimento fossem as mesmas, uma vez que a quantidade de voacangina é bem maior que a de coronaridina, e desta forma se sobrepõe quando se avalia C+V. Entretanto, a coronaridina não pode ser desprezada devido à sua importante contribuição na ação leishmanicida.

CONCLUSÕES

5- CONCLUSÕES

As partes da planta, local e a época de coleta são fatores determinantes no rendimento do processo de extração. Uma análise prévia desses fatores é de grande importância para a otimização do processo de extração.

A matéria prima TA3 apresentou um comportamento atípico no processo de extração. A diferença observada tanto no rendimento quanto na curva de extração pode ser devido à parte da planta utilizada pela TA3 (tronco, galhos grossos e folhas), o que implica em uma maior quantidade de material celulósico que as demais matérias primas.

A matéria prima TA4 (galhos finos e folhas de origem Guará-Campinas/ SP), apresentou maior rendimento em soluto bruto (1,18%), além de fornecer a maior quantidade dos alcalóides coronaridina e voacangina.

Nos ensaios para se determinar razão mássica máxima de soluto no sólido (X_0), pode-se verificar que o processo é bem eficaz, uma vez que nos ensaios de extração exaustiva obteve-se 1,26% e em ensaios iniciais com TA4 nas mesmas condições, o rendimento foi de 1,18%.

Nas análises dos extratos fracionados por CG- DIC, verificou-se a existência de poucos compostos, sendo os picos majoritários relativos aos alcalóides voacangina e coronaridina. Sabe-se da existência de outros alcalóides presentes nestes extratos fracionados, identificados por placa CCD e UV- Visível, no entanto, existe a necessidade de outras análises (IV, CLAE, RMN⁺) para elucidar tais substâncias.

Nos experimentos para se avaliar os efeitos das variáveis de processo temperatura e pressão, o processo a 300 bar e 55 °C apresentou maiores valores de taxa de extração para o período de velocidade constante ($M_{\text{cer}} = 2,91 \times 10^{-8}$ kg/s) e de razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna ($Y_{\text{cer}} = 0,737 \times 10^{-3}$ kg/kg), além de maior rendimento em

soluto bruto (0,64%). Entretanto, com relação à análise dos extratos, verificou-se que o processo a 250 bar e 45 °C obteve maior extração dos alcalóides coronaridina e voacangina ($5,36 \times 10^{-5}$ e $66,06 \times 10^{-5}$ kg/kg, respectivamente).

Verificou-se a influência da temperatura e pressão, além do efeito fluidodinâmico na coluna sobre o rendimento do processo. A temperatura e pressão (que determinam a densidade do solvente) atuaram de forma positiva ou negativa sobre o rendimento, dependendo das condições de temperatura e pressão utilizadas, e o efeito fluidodinâmico na coluna promoveu um aumento no rendimento do processo.

O processo intermitente, realizado a 250 bar, 45 °C e 4,6% (m/m) de etanol, forneceu maiores rendimentos em soluto bruto (0,58% em 360 minutos), em coronaridina ($6,91 \times 10^{-5}$ kg/kg) e em voacangina ($50,13 \times 10^{-5}$ kg/kg) que o processo semi-contínuo feito nas mesmas condições de temperatura, pressão e percentagem de co-solvente.

Com relação à vazão total de solvente, os maiores valores de taxa de extração do soluto para o período de velocidade constante ($M_{cer} = 9,98 \times 10^{-8}$ kg/s) e de razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna ($Y_{cer} = 1,89 \times 10^{-3}$ kg/kg) ocorreram a $5,28 \times 10^{-5}$ kg/s a 9,2% de etanol (m/m). Apesar dos maiores rendimentos em alcalóides: coronaridina + voacangina terem ocorrido a $2,6 \times 10^{-5}$ kg/s, as vazões de $5,28$ e $6,12 \times 10^{-5}$ kg/s apresentaram maiores taxa de extração desses alcalóides em termos de C+V, conforme visualizado na Figura 4.3.

A análise estatística feita para a terceira série de experimentos, forneceu através dos gráficos de superfície de resposta as direções de máximo crescimento para R_{c+v} , R_v e R_c , sendo para R_{c+v} e R_v de 45 para 55 °C e de 250 para 300 bar, e para R_c de 45 para 55 °C e de 200 para 250 bar.

Sugestões

Devido ao resultado apresentado nas análises dos extratos fracionados por CG- DIC, vê-se a necessidade de outras análises (IV, CLAE, RMN⁺) com o intuito de identificar os outros compostos e melhor purificar a fração rica em alcalóides.

Tendo verificado um aumento no rendimento de soluto bruto, e de alcalóides quando se utilizou 9,2% de etanol (m/m), seria interessante avaliar o uso de uma % maior de co-solvente.

Propõe-se ainda:

Realizar ensaios com isotermas para verificar a existência do efeito retrógrado.

Testar outras modificações no processo intermitente, como a variação nos perfis de pressão, ou ainda a utilização de diferentes vazões do solvente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; WAIBEL, R.; ZWANZGER, M. - Indole alkaloids from *Tabernaemontana glandulosa* - **Phytochemistry**, vol 37, nº 6, p 1737- 1743, 1994.

ACHENBACH, H.; BENIRSCHKE, M.; TORRENEGRAS, R. - Alkaloids and others compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa* - **Phytochemistry**, vol 45, nº 2, p 325- 335, 1997.

ASAE - AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS - Method of determining and expressing fineness of feed materials by sieving. **American Society of Agricultural Engineers Standard**. p 447-448, 1993.

BROGLE, H. – CO₂ as a solvent: its properties and applications- **Chemistry and Industry**, vol 12, p 385-390, 1982.

BRUNNER, G.- **Gás Extraction**: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and The Application to Separation Process, Steikopff Darmstadt, New York, Springer, 1994, vol 4, p 387.

BUCZER, B; GELDART, D. - Determination of density of porous particules using very fine dense powders. **Powder Tecnology**, 45, p.173-176, 1986.

CARDOSO, C.A.L.; VILEGAS, W.; POZETTI, G.L. - Gas Chromatographic analysis of indole alkaloids from *Tabernaemontana hilariana* – **Journal of Chromatography A**, vol 788, p 204 – 206, 1997.

- CARDOSO, C.A.L.; VILEGAS, W; HONDA, N.K.– Qualitative Determination of Indole Alkaloids, Triterpenoids and Steroids of *Tabernaemontana hilariana* - **Journal of Chromatography A**, vol 808, p 264 – 268, 1998.
- CARDOSO, C.A.L; VILEGAS W. – Droplet Counter- current Chromatography of Indole Alkaloids from *Tabernaemontana hilariana* – **Phytochemical Analysis**, vol 10, p 60-63, 1999.
- CARDOZO-FILHO, L.; FERRUA, F.Q.; MEIRELES, M.A.A.- Estudo do Processo de Extração Supercrítica de Óleos Essenciais de Produtos Naturais- **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol 17, nº 4, p 449- 455, 1997.
- CHARPENTIER, A. B.; SEVENANTS, M.R.- **Supercritical Fluid Extraction and Chromatography**, 2ª ed., Ed.Copyringht, 1988, p.254.
- DAGNINO, D.; SCHRIPEMA,J.; PELTENBURG,A.; VERPOORTE,R.- Capillary Gas Chromatographic Analysis of Indole Alkaloids: Investigation of the Indole Alkaloids present in *Tabernaemontana divaricata* cell suspension culture – **Journal of Natural Products**, vol 54, nº 6, p 1558-1563, 1991.
- DELORENZI, J.C.M.O.B. – **Estudo Farmacológico de *Peschiera australis* e sua ação sobre *Leishmania amazonensis*** – Rio de Janeiro, 1998, Tese (Mestrado em Ciências Biológicas)- Centro de Ciências da Saúde- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho- Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- EKART, M.P.; BENNETT,K.L.; EKART,S.M.; GURDIAL,G.S.; LIOTTA,C.L.; ECKERT,C.A. - Cosolvent Interactions in supercritical Fluid Solutions- **AIChE-Journal**, vol 39, nº2, p 235- 248, 1993.
- FERREIRA, S.H. – **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil** - Academia Brasileira de Ciências –1998.

- FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV,Z.L.; DORAIWAMY,L.K.; MEIRELES, M.A.A.; PETENATE,A.J. - Supercritical Fluid Extraction of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) **Essential Oil. The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdã, Holanda, vol 14, nº.3, p 235-245, 1999.
- FILLIPI, R.P.- CO₂ as a solvent: applications to fats, oils and other materials- **Chemistry Industry**, vol 12, p 390-394, 1982.
- FRANÇA, L.F.; REBER,G.; MEIRELES, M.A.A.; MACHADO, N.T.; BRUNNER,G.- Supercritical Extraction of Carotenoids and Lipids from Buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region - **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdã, Holanda, vol 14, nº 3, p.247-256, 1999.
- FREUND, R.J.; LITTEL, R.C.- **SAS System for Regression-** SAS Series in Statistical Applications, SAS Institute Inc., NC, 2nd ed, 1995.
- GIAMARELLOU, H. – AIDS and Skin: Parasitic Diseases – **Clinics in Dermatology**, vol 18, p 433-439, 2000.
- GUNASEKERA, S.P., CORDELL, G.A., FARNSWORTH- Anticancer Indole Alkaloids of *Ervatamia heyneana*- **Phytochemistry**, 1980, vol.19, p 1213-1218.
- HOYER, G.G., Extraction with supercritical fluids: Why, how and so what - **Chemtech**, vol7, p 440-448, 1985.
- IWU, M.M., JACSKON, J.E., SCHUSTER, B.G. – Medicinal Plants in the Fight against Leishmaniasis – **Parasitology Today**, 1994, vol.10, nº 2, p 64-68.
- JACOBS, M.B.- **The chemical analyssis of foods and products** – 3rd ed., Robert Krieger Publishing Co, New York, p. 832, 1973.

- KAM, T.S., SIM, K.M., KOYANO, T., KOMIYAMA, K.- Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*- **Phytochemistry**, 1999, vol.50, p 75-79.
- KELLOP, A.M.- **An Introduction to chemistry of the alkaloids**, London Butterworths, 1970.
- KING, M.B.; BOOT, T.R.- **Extraction of Natural Products Using Near- Critical Solvents** – Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, 1993.
- KUTCHAN, T.M. - Alkaloid Biosynthesis- The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants - **The Plant Cell** - vol 7, p. 1059-1070, 1995.
- LEEUEMBERG, A.J.M.- **A Revision of *Tabernaemontana*. The new world species and *Stemmandenia***. Kew, The Royal Botanic Gardens, 1994, vol.2, p 442.
- LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.H. – **Alkaloids**, Springer- Verlag, 1994, vol 15, p274.
- LUQUE, M.D; JIMÉNEZ-CARMONA, M.M. – Where is supercritical fluid extraction going? - **Trends in Analytical Chemistry** – vol 19, nº 5, p 223-228, 2000.
- MARENTIS, R.T.- Steps to developing a Comercial Supercritical Carbon Dioxed Processing Plant- in Chapernter & Servenants, - **Supercritical Fluid extraction in Chromatography** -2ª ed., Ed.Copyringht, 1988, 254 p.
- MUÑOZ, V.; MORETTI, C.; SAUVAIN, M.; CARON, C.; PORZEL, A.; MASSIOT, G.; RICHARD, B. - Isolation of Bis-Indole Alkaloids Antileishmanial and Antibacterial Activities from *Peschiera van heurikii* – **Planta Medica**, vol 60, nº5, p 455- 459, 1994.

- PASQUEL, A.; MEIRELES, M.A.A.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J. - Extraction of Stevia Glycosides with CO₂ + Water, CO₂ + Ethanol, and CO₂ + Water + Ethanol - **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Brasil, vol 17, nº3, p 271-282, 2000.
- PASSOS, C.- **Citações e referências a documentos eletrônicos.**
[http: www.FIOCRUZ.br](http://www.FIOCRUZ.br). 4 dez.2000.
- PELLETIER, S.W- **Alkaloids: chemical and biological perspectives**, Institute for Natural Products Research, John Wiley & Sons- Interscience Publication, 1988, vol 6.
- PEREIRA, P.S.- **Estudo Fitoquímico e Biotecnológico de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae)**- 1999 - Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras- Ribeirão Preto, Universidade do Estado de São Paulo.
- PHILLIPSON, J.D. and ZENK, M.H.- **Indole and Biogenetically Related Alkaloids**- Academy Press, London, 1980, 349 p.
- POVH, N.P.- **Estudos dos Processos de Extração do Óleo Essencial de Camomila (*camomila recutita* [L.] RAUSCHERT)** - 2000 - Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- POVH, N.P.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A.- Supercritical CO₂ extraction of essential oil and aleoresin from chamomila (*Chamonilla recutita* [L.] Rauschert)- **Journal of Supercritical Fluids**, vol 21, nº3, p 245-256, in press, 2001.

- RATES, S.M.K; SCHAPOVAL, E.E.S.; SOUZA, I.A.; HENRIQUES, A.T.- Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis*, **Int. Journal of Pharmacognosy**, vol 31, nº4, p 288-294, 1993.
- RATES, S.M.K *Peschiera australis* (Muell. Arg.) Miers *var.australis* – **Investigação Química e Farmacológica** 1989 - Tese (Mestrado em Farmácia) –Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- RIZVI, S.S.H.; DANIELS, J.A.; BENADO, A.L.; ZOLLWEG, J.A.- Supercritical Fluid Extraction: operating principles and food applications. **Food Technology**, vol 40, nº7, p 57-64, 1986.
- RODRIGUES, V. M.; MEIRELES, M. A. A.; MARQUES, M. O M. - Determination of the Solubility of Clove Essential Oil in ScCO₂: an standardization of the dynamic method. In: **5TH International Symposium on Supercritical Fluids, 2000**, Atlanta. Proceedings of the 5th International Symposium on Supercritical Fluids. Atlanta: ISASF, 2000.
- RODRIGUES, V.M.; SOUZA, E.M.B.D., MONTEIRO, A.R., MARQUES, M.O.M., CHIAVONE- FILHO, O., MEIRELES, M.A.A.- Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo- ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent – **Journal of Supercritical Fluids**, (SUPFLU 304) in press, 2001.
- SALDAÑA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; BAER, M.G.; MAZZAFERA, P.– Extraction of Purine Alkaloids from Maté (*Ilex paraguayensis*) using Supercritical CO₂ – **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol 47, p 3804- 3808, 1999.
- SCHAEFFER, S.T.; ZALKOW, L.H.; TEJA, A.S.- Extraction and isolation of Chemotherapeutic pyrrolizidine Alkaloids from Plant Substrates- **Supercritical Fluid Science and Technology** -, ACS Symposium series, 1989, 550 p.

- SIERRE, M.I.; VAN DER HEIJDEN, R.; SCHRIJPEMA, J.; VERPOORTE, R. – Alkaloids Production in Relation to Differentiation in Cell and Tissue Cultures of *Tabernaemontana pandaqui* – **Planta Medica**, vol 57, p 543- 547, 1991.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; AULER MENTZ, J.C.P.M.; PETROVICK, P.R. - **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 1ª ed, Ed.Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999, 821p.
- SOVOVA, H.; RAT, V.; KHACHATURYAN, M.; VLCEK, D. – Solubility of squalene and dinonyl phthalate in CO₂ with entrainers - **Journal of Supercritical Fluids**, 1999, vol 14, p145- 149.
- SPITZER, V.; RATES, M.K.; HENRIQUES, A.T.; MARX, F. - The fatty acid composition of the seed oil of *Peschiera australis*, **Fett** (Germany), vol 97, nº9, p 334-335, 1995.
- STAERK, D., LEMMICH, E., CHRISTENSEN, J., KHARAZMI, A., OLSEN, C.E., JAROSZEWSKI, J.W. - **Planta Medica**, vol.66, p 531-536, 2000.
- TAESOTIKUL, T.; PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; VERPOORTE, R.; SCHEFFER, J.J.C. - Cardiovascular activity of crude alkaloidal fraction from *Tabernaemontana pandaqui* in the rat – **Journal of Ethnopharmacology**, vol 59, p 131-137, 1998.
- TAYLOR, L.T. – **Supercritical Fluid Extraction**- John Wiley & Sons Inc., Canada, 1996, 180p.
- VAN BEEK T.A.; VEERPOORTE R.; SENSEN A.B. – Identification of *Tabernaemontana* Alkaloids by means of Thin- Layer Chromatography and Chromogenic Reactions- **Journal of Chromatography**, vol 298, p 289-307, 1984a.

- VAN BEEK, T.A.; VERPOORTE, R.; SVENDSEN, A.B.; LEEUWENBERG, A.J.M.; BISSET, N.G. - *Tabernaemontana L.*: A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology- **Journal of Ethnopharmacology**, vol 10, nº1, 1984b.
- VAN BEEK, T.A.; VERPOORTE, R.; SVENDSEN, A.B. – Antimicrobially Active Alkaloids from *Tabernaemontana chippi* - **Journal of Natural Products**, vol 48, nº 3, p 401- 423, 1985.
- VAN DER HEIJDEN, R.; BROUWER, R.L.; VERPOORTE, R.; VAN BEEK, T.A.; HARKES, P.A.A.; SVENDSEN, A.B. - Indole Alkaloids from *Tabernaemontana elegans* – **Planta Medica**, p 144- 147, 1986.
- VAN DER HEIJDEN, R.; LAMPING, P.J.; OUT, P.P.; WIJNSMA, R.; VERPOORTE, R.- High- Performance Liquid Chromatographic Determination of indole alkaloids in a Suspension culture of *Tabernaemontana divaricata* - **Journal of Chromatography**, vol 396, p 287-295, 1987.
- WHO/ OMS- **Citações e referências a documentos eletrônicos.**
<http://www.who.int/emc/diseases/leish> abril-2001.
- YODA, S.K; BARRETO, A.S. – **Relatório Interno das Atividades desenvolvidas na Unicamp com Extração Supercrítica** – LASEFI - Unicamp/ FIOCRUZ – RJ, 2000.
- ZANCAN, K.C; MAQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A; PETENATE, A.J.- In: **2nd International Meeting on High Pressure Chemical Engineering, 2001**, Germany. Proceedings of the 2nd Meeting on High Pressure Chemical Engineering, Germany: ISASF, 2000.

ANEXOS

7- ANEXO

7.1- Anexo A

Especificações da Coletas das Matérias Primas

Árvore 1 : TA1

Coleta : 06/04/2000, por Antônio Carlos Siani

Local: Estrada Ribeirão Preto – Jaboticabal

Coletados Galhos finos e “médios” e folhas

3 Exsicatas depositadas no herbário (SPFR) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP- USP, sob registros de No. 02940, 02944 e 03244.

Árvore 2 : TA2

Coleta : 11/08/2000, por Antônio Carlos Leonello

Local : Guará, Ribeirão Anhumas (Campinas)

Coletados Galhos finos e “médios” e folhas

Exsicata depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob No. 352.541

Árvore 3 : TA3 e TA4

Coleta : 13/11/2000, por Antônio Carlos Leonello

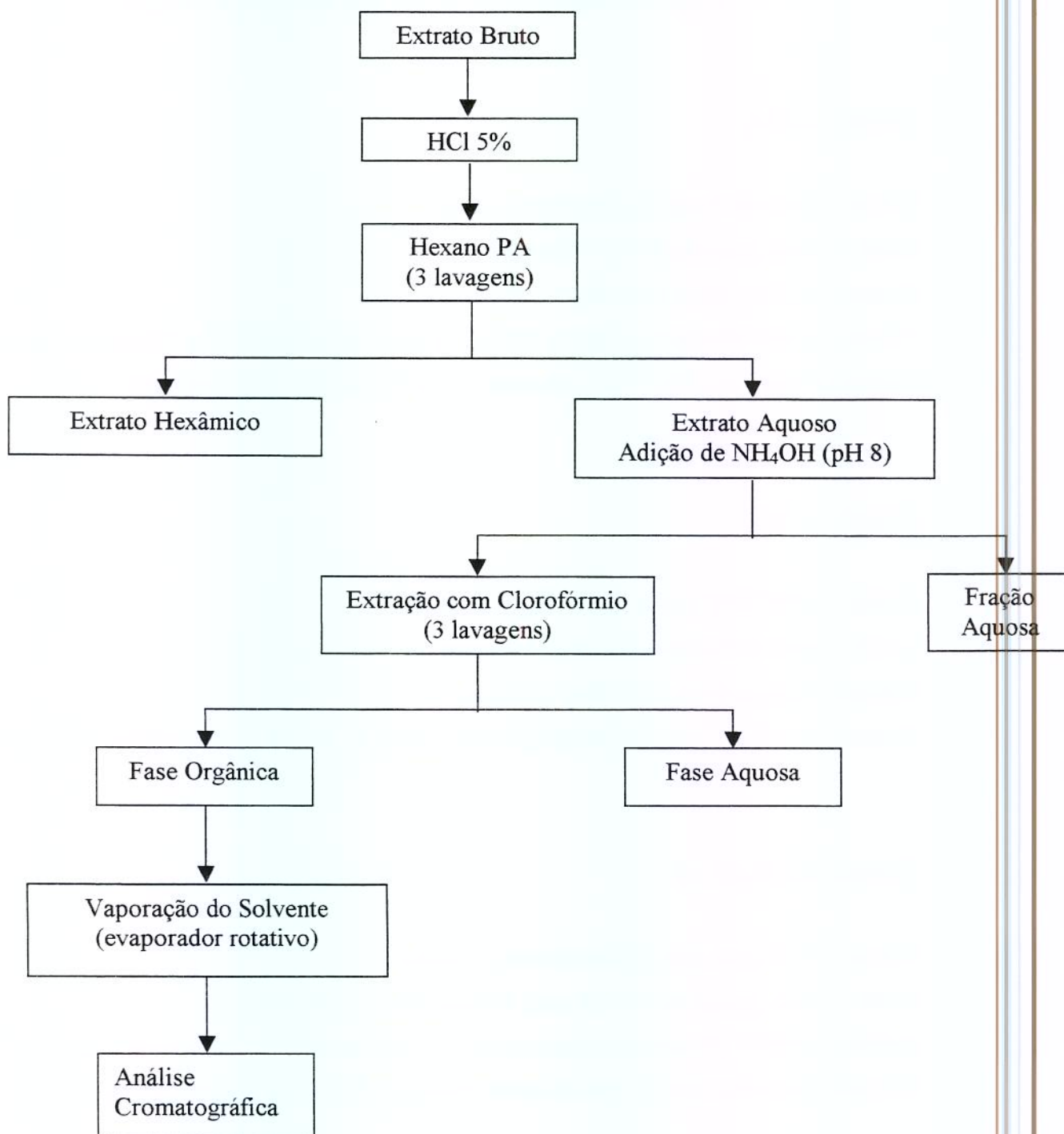
Local : Guará, quintal da casa do prof. Vivaldo da Costa (Campinas)

Coletados Galhos grossos (principalmente), mas também finos e médios e folhas

Exsicata depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob No. 352.539

7.2- Anexo B

Esquema da Etapa de Fracionamento do Extrato



7.3- Anexo C

Curvas Padrão dos Alcalóides

Nas Tabelas 7.1 e 7.2 encontram-se os dados referentes à preparação das soluções para a construção das curvas padrão. As Figuras 7.1 e 7.2 mostram as curvas padrão obtidas a partir de 1mg de padrão do alcalóide coronaridina e 0,3mg de padrão do alcalóide voacangina. Os padrões foram diluídos em acetato de etila (EM Science, P.A., lote 3903991, USA).

Tabela 7.1: Soluções empregadas para a obtenção da curva padrão do alcalóide coronaridina e área obtida no cromatograma

Solução	Área	Concentração $\times 10^3$ (mg alcalóide/ mg extrato alcaloidico)
1	150478	14,692
2	105296	8,642
3	25556	3,113
4	17950	1,887
5	14737	1,128
6	8639	0,684
7	6979	0,347
8	2873	0,178

Tabela 7.2: Soluções empregadas para a obtenção da curva padrão do alcalóide voacangina e área obtida no cromatograma

Solução	Área	Concentração $\times 10^3$ (mg alcalóide/ mg extrato alcaloidico)
1	218956	7,268
2	119108	3,739
3	23072	0,976
4	12161	0,490
5	7452	0,248

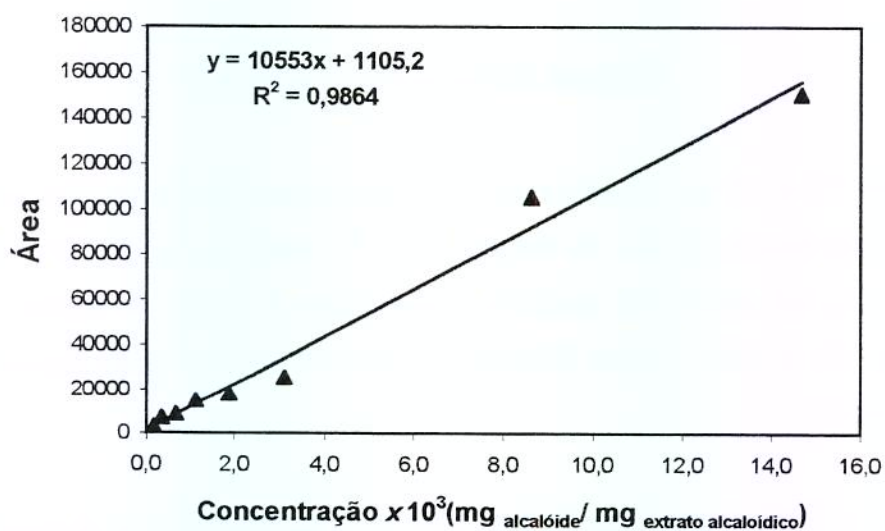


Figura 7.1: Curva de calibração para o padrão do alcalóide coronaridina

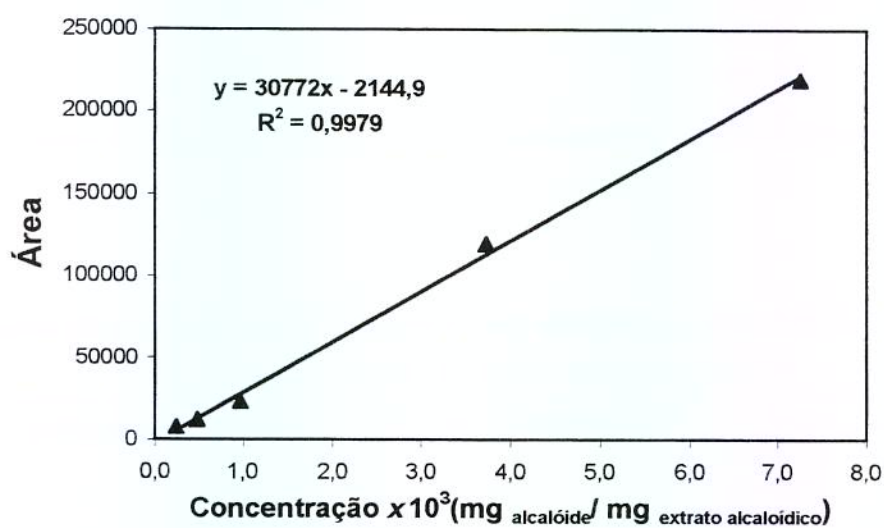


Figura 7.2: Curva de calibração para o padrão do alcalóide voacangina

7.4- Anexo D

Resumo das Condições Experimentais

Tabela 7.3: Primeira série de ensaios- Extrações realizadas com diferentes Matérias Primas

Ensaio	MP	P (bar)	T (°C)	Vazão 10 ⁵ (kg/s)	% etanol (m/m)	Massa inicial 10 ³ (kg)	Massa extrato bruto 10 ³ (kg)
1	TA1	250	35	6,05	4,6	72,67	0,5454
2	TA2	250	35	6,13	4,6	71,61	0,2950
3	TA3	250	35	3,52	4,6	82,00	0,4342
4	TA4	250	35	6,00	4,6	78,29	0,7051

Tabela 7.4: Segunda série de ensaios- Extração exaustiva da matéria prima

Ensaio	MP	P (bar)	T (°C)	Vazão 10 ⁵ (kg/s)	% etanol (m/m)	Massa inicial 10 ³ (kg)	Massa extrato bruto 10 ³ (kg)
5	TA4	250	35	3,99	4,6	1,61	0,0180
6	TA4	250	35	3,96	4,6	1,61	0,0250
7	TA4	250	35	3,97	4,6	1,62	0,0172
8	TA4	250	35	4,00	4,6	1,61	0,0295
9	TA4	250	35	3,98	4,6	1,61	0,0235
10	TA4	250	35	3,85	4,6	1,62	0,0330
11	TA4	250	35	3,93	4,6	1,6	0,0226

Tabela 7.5: Terceira série de ensaios: Extrações realizadas em diferentes condições de Temperatura e Pressão

Ensaio	MP	P (bar)	T (°C)	Vazão 10 ⁵ (kg/s)	% etanol (m/m)	Massa inicial 10 ³ (kg)	Massa extrato bruto 10 ³ (kg)
12	TA2	200	35	4,65	4,6	71,45	0,3577
13	TA2	300	35	3,90	4,6	71,38	0,2758
14	TA2	250	45	4,12	4,6	71,51	0,4358
15	TA2	250	45	4,40	4,6	71,25	0,4356
16	TA2	200	55	4,73	4,6	71,34	0,3504
17	TA2	300	55	3,95	4,6	71,27	0,4574
18*	TA2	250	45	-	4,6	71,70	0,4127

* Processo intermitente

Tabela 7.6: Quarta série de ensaios: Extrações realizadas em diferentes condições de Vazão Total de Solvente

Ensaio	MP	P (bar)	T (°C)	Vazão 10 ⁵ (kg/s)	% etanol (m/m)	Massa inicial 10 ³ (kg)	Massa extrato bruto 10 ³ (kg)
20	TA2	300	55	1,53	9,6	71,61	0,6006
21	TA2	300	55	2,60	9,6	71,25	0,8713
22	TA2	300	55	3,53	9,6	71,17	0,7477
23	TA2	300	55	5,28	9,6	71,44	0,7233
24	TA2	300	55	6,12	9,6	71,35	0,6824

7.5- Anexo E

Resultados das Extrações realizadas com diferentes Matérias Primas (250 bar, 35 °C e 4,6%(m/m) etanol)

Experimento 1

Tabela 7.7: Experimento efetuado com TA1 e $6,05 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0515	0,0515	0,07	0,0515
120	0,0917	0,1432	0,20	0,1021
180	0,0629	0,2061	0,28	0,1773
240	0,0042	0,2103	0,29	0,2525
300	0,0456	0,2559	0,35	0,3277
360	0,1399	0,3958	0,54	0,4029
420	0,1038	0,4996	0,69	0,4782
480	0,0703	0,5699	0,78	0,5534
540	0,0720	0,6419	0,88	0,6286
600	0,1128	0,7547	1,04	
Total		0,7547	1,04	

*para a massa acumulada

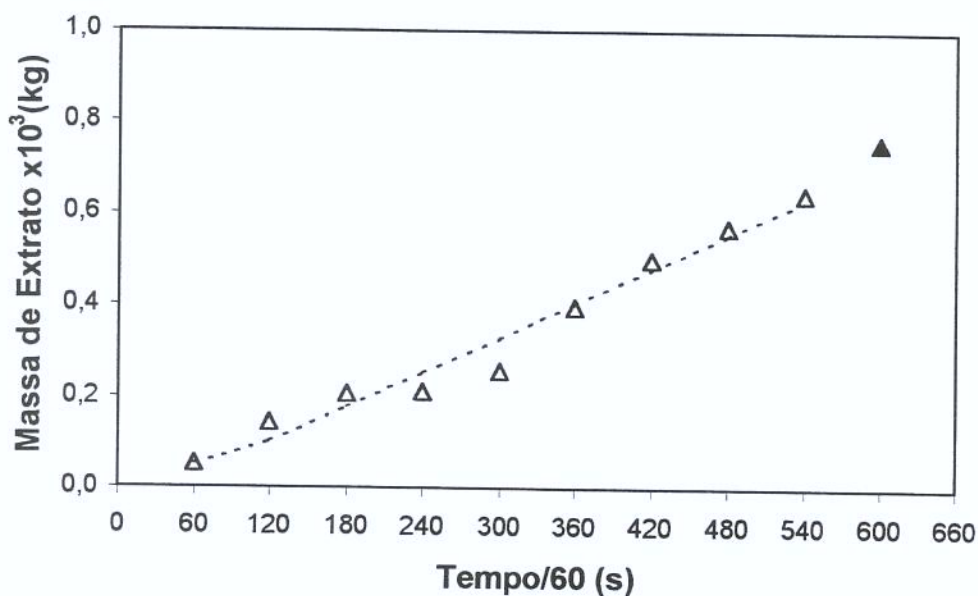
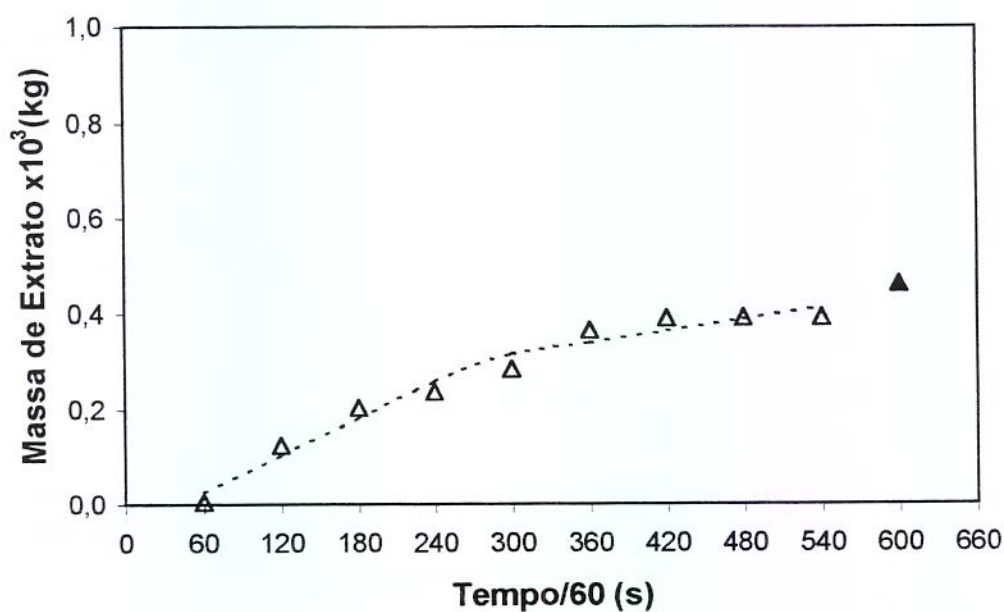


Figura 7.3: Curva de extração do experimento 1: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 2Tabela 7.8: Experimento efetuado com TA2 e $6,13 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0046	0,0046	0,01	0,0262
120	0,1201	0,1247	0,17	0,1037
180	0,0792	0,2039	0,28	0,1811
240	0,0325	0,2364	0,33	0,2586
300	0,0466	0,2830	0,40	0,3154
360	0,0817	0,3647	0,51	0,3398
420	0,0254	0,3901	0,54	0,3641
480	0,0012	0,3913	0,55	0,3885
540	0,0003	0,3916	0,55	0,4129
600	0,0701	0,4617	0,64	
Total		0,462	0,64	

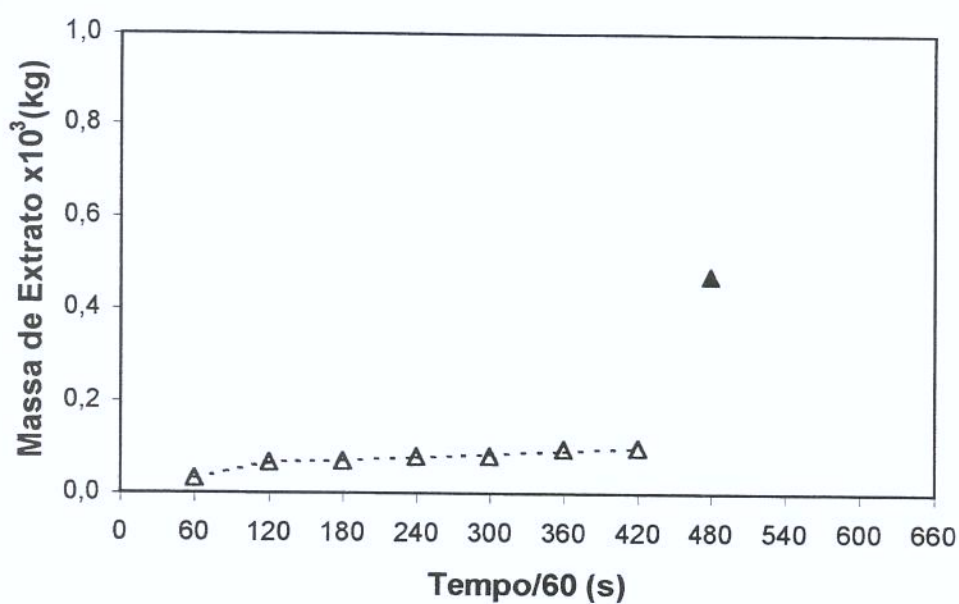
*para a massa acumulada

Figura 7.4: Curva de extração do experimento 2: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 3Tabela 7.9: Experimento efetuado com TA3 e $3,52 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0310	0,0310	0,04	0,0310
120	0,0354	0,0664	0,08	0,0644
180	0,0030	0,0694	0,08	0,0713
240	0,0098	0,0792	0,10	0,0781
300	0,0008	0,0800	0,10	0,0849
360	0,0156	0,0956	0,12	0,0917
420	0,0026	0,0982	0,12	0,0985
480	0,3722	0,4704	0,57	
Total		0,4704	0,57	

*para a massa acumulada

Figura 7.5: Curva de extração do experimento 3: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 4Tabela 7.10: Experimento efetuado com TA4 e $6,00 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0252	0,0252	0,03	-0,0087
120	0,1139	0,1391	0,18	0,1990
180	0,2858	0,4249	0,54	0,4067
240	0,1976	0,6225	0,80	0,6144
300	0,1074	0,7299	0,93	0,7337
360	0,0859	0,8158	1,04	0,8088
420	0,0647	0,8805	1,12	0,8839
480	0,0459	0,9264	1,18	
Total		0,9264	1,18	

*para a massa acumulada

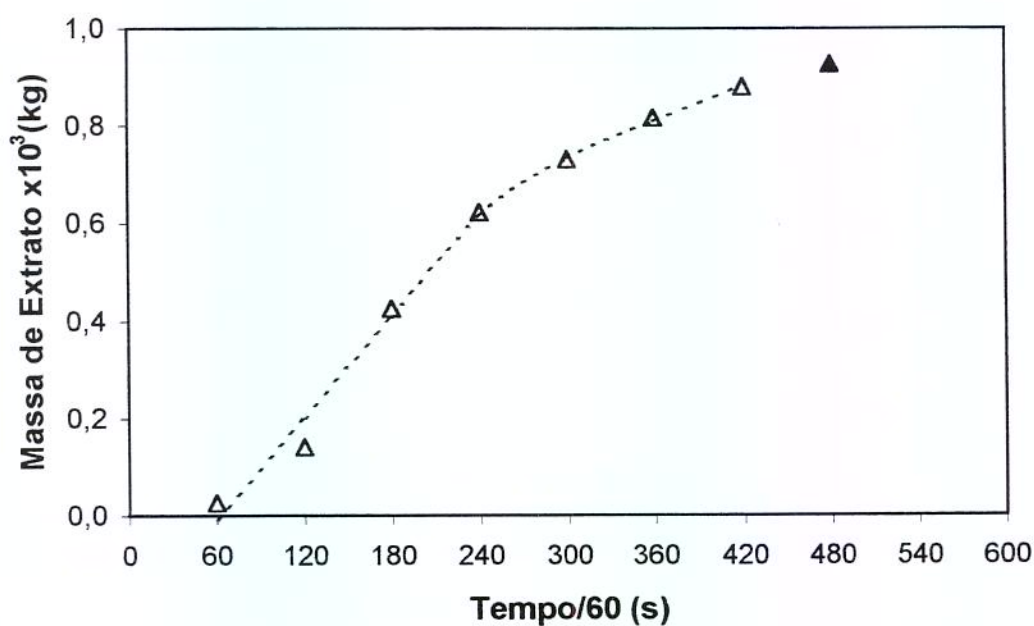


Figura 7.6: Curva de extração do experimento 4: ---- (predito); △ (experimental); ▲ (despressurização).

7.6- Anexo F

Resultados das Extrações realizadas em diferentes condições de Temperatura e Pressão (TA2 e 4,6%(m/m) etanol)

Experimento 12

Tabela 7.11: Experimento efetuado a 200 bar, 35 °C e $4,65 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0223	0,0223	0,03	-0,0136
120	0,0000	0,0223	0,03	0,0463
180	0,0324	0,0547	0,08	0,1063
240	0,1430	0,1977	0,28	0,1662
300	0,0370	0,2347	0,33	0,2262
360	0,0000	0,2347	0,33	0,2351
420	0,0062	0,2409	0,34	0,2440
480	0,0181	0,2590	0,36	0,2530
540	0,0000	0,2590	0,36	0,2619
600	0,0987	0,3577	0,50	
Total		0,3577	0,50	

*para a massa acumulada

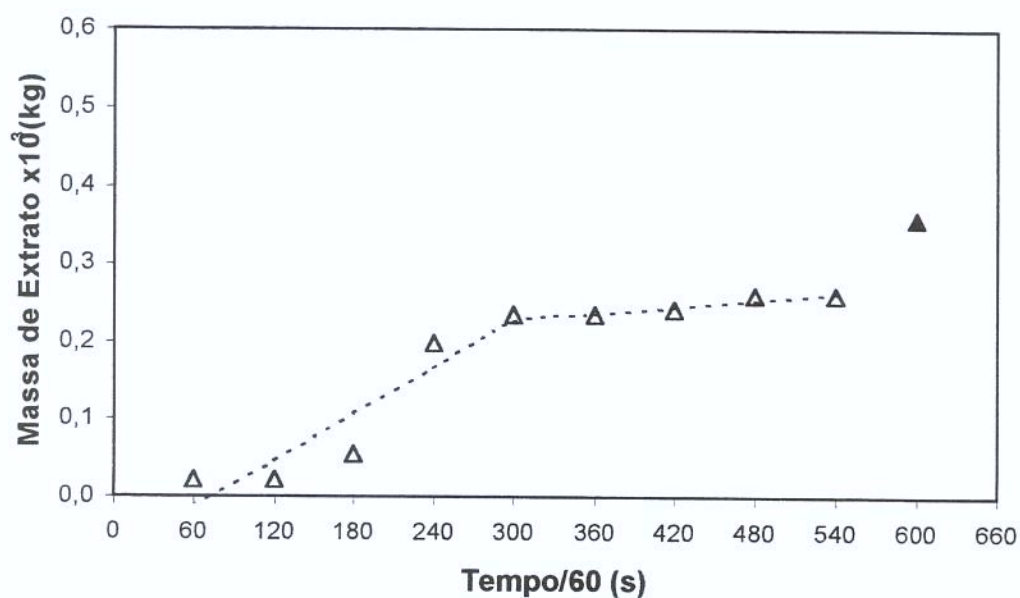
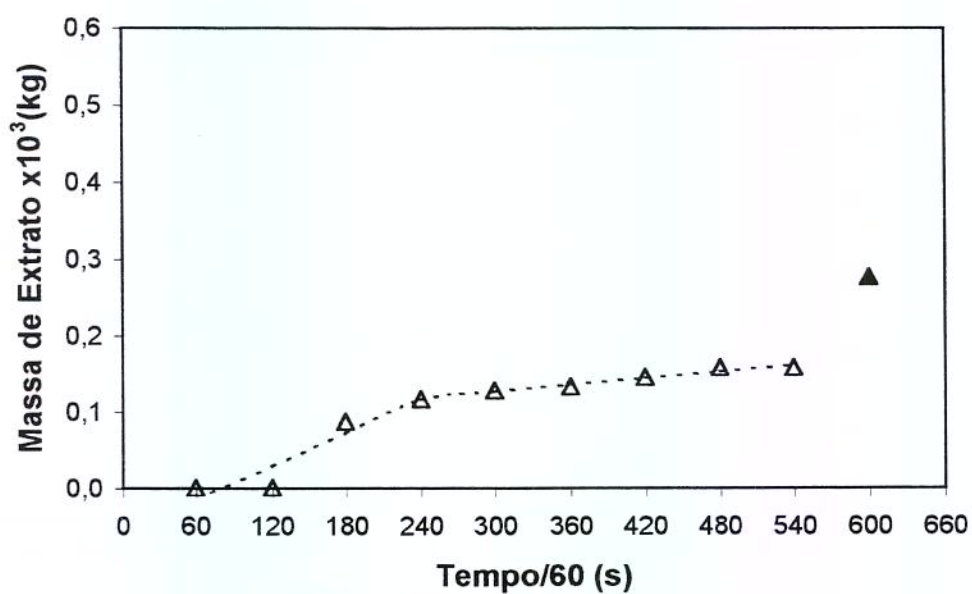


Figura 7.7: Curva de extração de experimento 12: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 13Tabela 7.12: Experimento efetuado a 300 bar, 35 °C e $3,90 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0004	0,0004	0,00	-0,0140
120	0,0000	0,0004	0,00	0,0293
180	0,0870	0,0874	0,12	0,0727
240	0,0284	0,1158	0,16	0,1160
300	0,0124	0,1282	0,18	0,1274
360	0,0044	0,1326	0,19	0,1360
420	0,0130	0,1456	0,20	0,1446
480	0,0127	0,1583	0,22	0,1532
540	0,0000	0,1583	0,22	0,1618
600	0,1175	0,2758	0,39	
Total		0,2758	0,39	

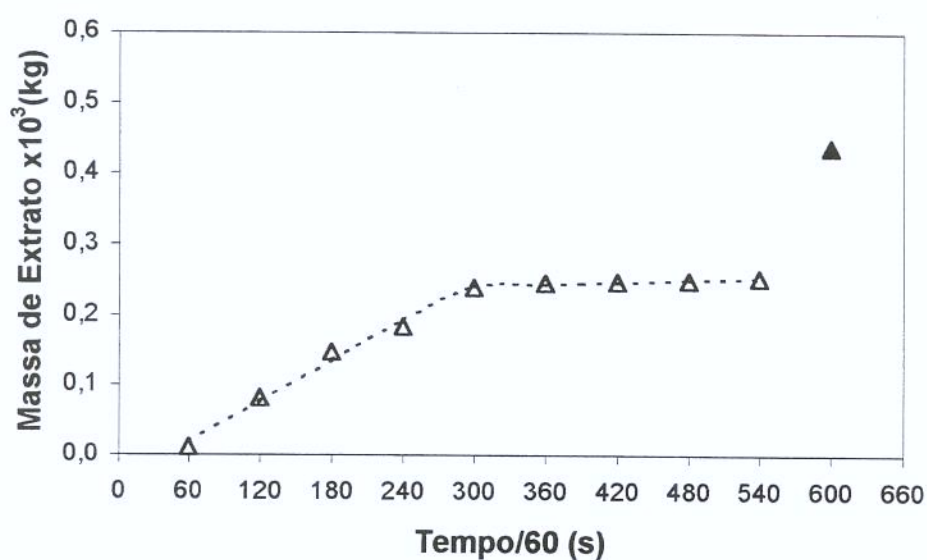
*para a massa acumulada

Figura 7.8: Curva de extração de experimento 13: ---- (predito); Δ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 14Tabela 7.13: Experimento efetuado a 250 bar, 45 °C e $4,12 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0104	0,0104	0,01	0,0175
120	0,0700	0,0804	0,11	0,0759
180	0,0662	0,1466	0,21	0,1343
240	0,0363	0,1829	0,26	0,1926
300	0,0558	0,2387	0,33	0,2399
360	0,0057	0,2444	0,34	0,2430
420	0,0024	0,2468	0,35	0,2461
480	0,0015	0,2483	0,35	0,2493
540	0,0041	0,2524	0,35	0,2524
600	0,1834	0,4358	0,61	
Total		0,4358	0,61	

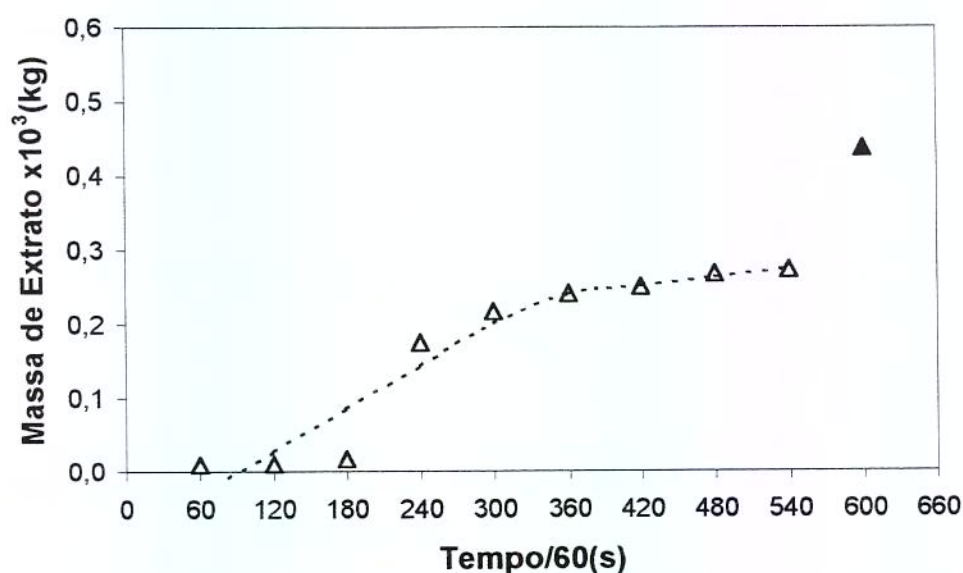
*para a massa acumulada

Figura 7.9: Curva de extração do experimento 14: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 15Tabela 7.14: Experimento efetuado a 250 bar, 45 °C e $4,40 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental.

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0094	0,0094	0,01	-0,0302
120	0,0006	0,0100	0,01	0,0275
180	0,0064	0,0164	0,02	0,0852
240	0,1584	0,1748	0,25	0,1429
300	0,0407	0,2155	0,30	0,2006
360	0,0245	0,2400	0,34	0,2398
420	0,0092	0,2492	0,35	0,2513
480	0,0173	0,2665	0,37	0,2628
540	0,0060	0,2725	0,38	0,2743
600	0,1631	0,4356	0,61	
Total		0,4356	0,61	

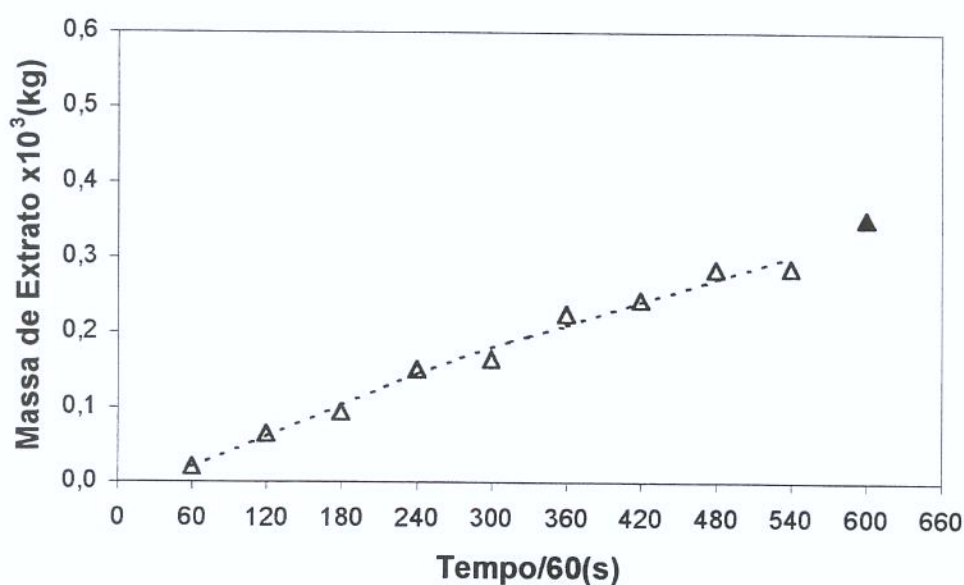
*para a massa acumulada

Figura 7.10: Curva de extração do experimento 15: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 16Tabela 7.15: Experimento efetuado a 200 bar, 55 °C e $4,73 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0197	0,0197	0,03	0,0190
120	0,0447	0,0644	0,09	0,0609
180	0,0290	0,0934	0,13	0,1028
240	0,0563	0,1497	0,21	0,1445
300	0,0136	0,1633	0,23	0,1790
360	0,0606	0,2239	0,31	0,2096
420	0,0191	0,2430	0,34	0,2401
480	0,0416	0,2846	0,40	0,2707
540	0,0011	0,2857	0,40	0,3012
600	0,0647	0,3504	0,49	
Total		0,3504	0,49	

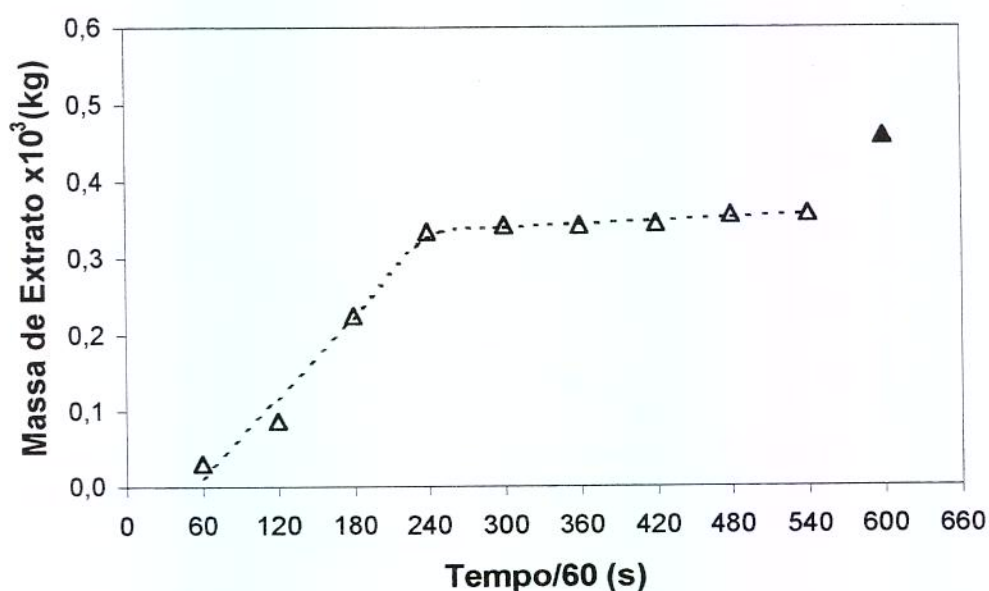
*para a massa acumulada

Figura 7.11: Curva de extração do experimento 16: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 17Tabela 7.16: Experimento efetuado a 300 bar, 55 °C e $3,95 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0299	0,0299	0,04	0,0111
120	0,0560	0,0859	0,12	0,1159
180	0,1385	0,2244	0,31	0,2207
240	0,1087	0,3331	0,47	0,3256
300	0,0082	0,3413	0,48	0,3390
360	0,0003	0,3416	0,48	0,3433
420	0,0027	0,3443	0,48	0,3477
480	0,0103	0,3546	0,50	0,3520
540	0,0020	0,3566	0,50	0,3564
600	1,0080	0,4574	0,64	
Total		0,4574	0,64	

*para a massa acumulada

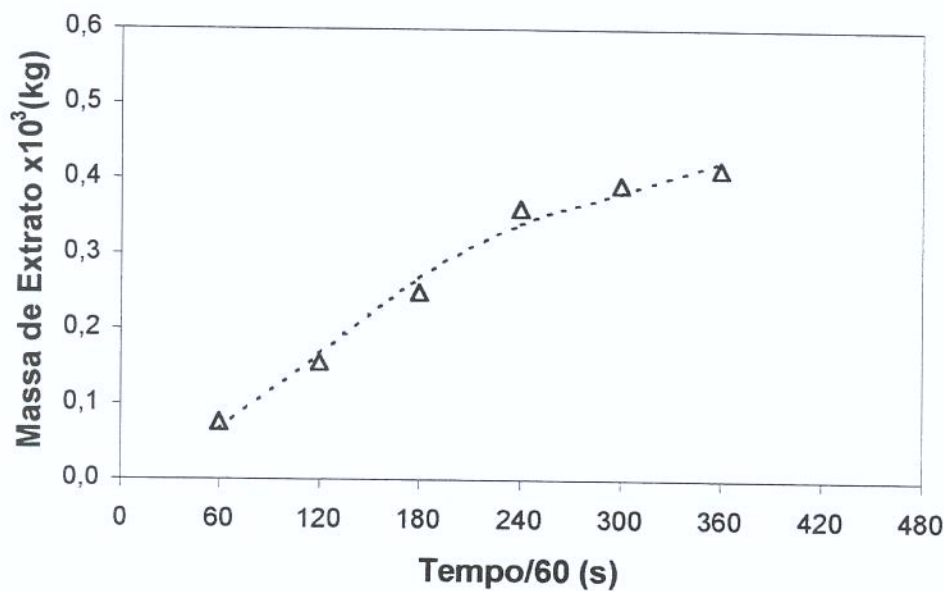
Figura 7.12: Curva de extração do experimento 17: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 18

Tabela 7.17: Experimento efetuado a 250 bar e 45 °C, pelo processo intermitente.

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0764	0,0764	0,11	0,0655
120	0,0785	0,1549	0,22	0,1666
180	0,0935	0,2484	0,35	0,2677
240	0,1107	0,3591	0,50	0,3392
300	0,0325	0,3916	0,55	0,3811
360	0,0211	0,4127	0,58	0,4230
Total		0,4127	0,58	

*para a massa acumulada

Figura 7.13: Curva de extração do experimento 18: ---- (predito); $\triangle$ (experimental).

7.7- Anexo G

Resultados das Extrações realizadas em diferentes condições de Vazão total de solvente e % de Co-solvente (TA2, 300 bar e 55 °C)

Experimento 20

Tabela 7.18: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $3,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0069	0,0069	0,01	0,0189
120	0,1545	0,1614	0,23	0,1373
180	0,0818	0,2432	0,34	0,2556
240	0,0703	0,3135	0,44	0,3263
300	0,0289	0,3424	0,48	0,3346
360	0,0070	0,3494	0,49	0,3429
420	0,0093	0,3587	0,50	0,3512
480	0,0002	0,3589	0,50	0,3594
540	0,0005	0,3594	0,50	0,3677
600	0,2412	0,6006	0,84	
Total		0,6006	0,84	

*para a massa acumulada

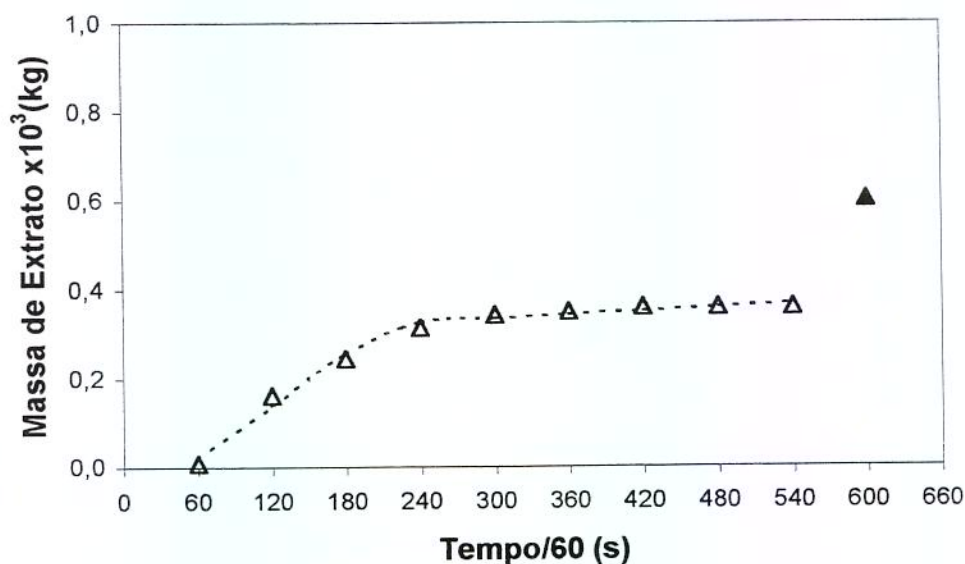
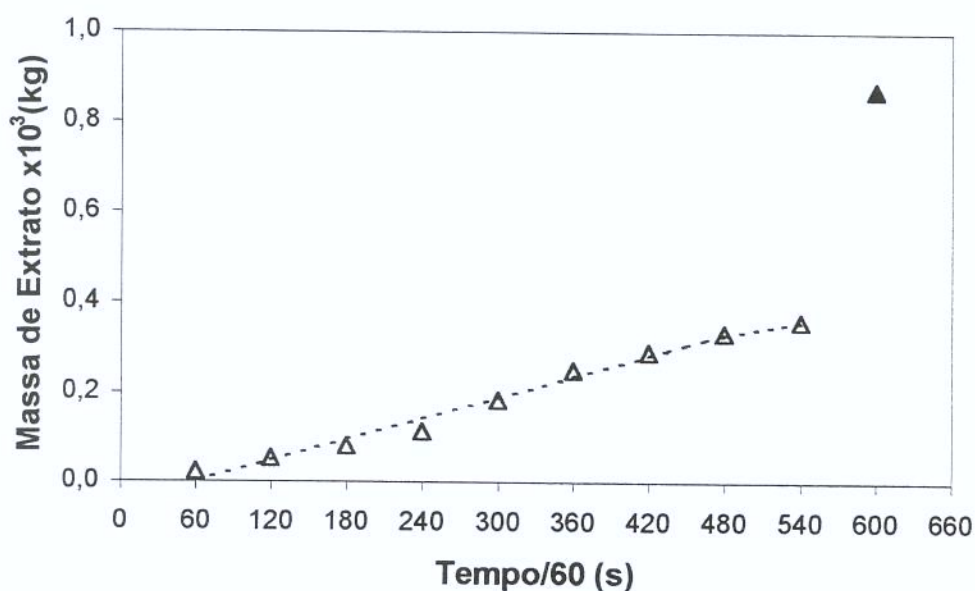


Figura 7.14: Curva de extração do experimento 20: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 21Tabela 7.19: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $1,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0228	0,0228	0,03	0,0011
120	0,0292	0,052	0,07	0,0478
180	0,0272	0,0792	0,11	0,0945
240	0,032	0,1112	0,16	0,1412
300	0,0711	0,1823	0,26	0,1879
360	0,0668	0,2491	0,35	0,2346
420	0,0395	0,2886	0,41	0,2813
480	0,0425	0,3311	0,46	0,3280
540	0,0269	0,358	0,50	0,3580
600	0,5133	0,8713	1,22	
Total		0,8713	1,22	

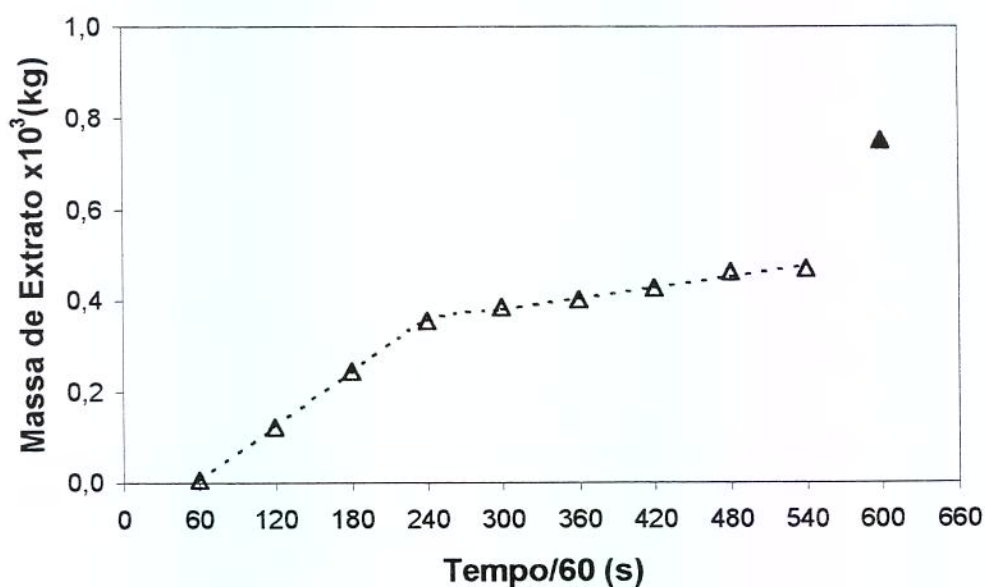
*para a massa acumulada

Figura 7.15: Curva de extração do experimento 21: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 22Tabela 7.20: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $2,60 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0050	0,0050	0,01	0,0037
120	0,1159	0,1209	0,17	0,1233
180	0,1229	0,2438	0,34	0,2429
240	0,1095	0,3533	0,50	0,3561
300	0,0306	0,3839	0,54	0,3798
360	0,0163	0,4002	0,56	0,4036
420	0,0263	0,4265	0,60	0,4274
480	0,0352	0,4617	0,65	0,4512
540	0,0060	0,4677	0,66	0,4750
600	0,2800	0,7477	1,05	
Total		0,7477	1,05	

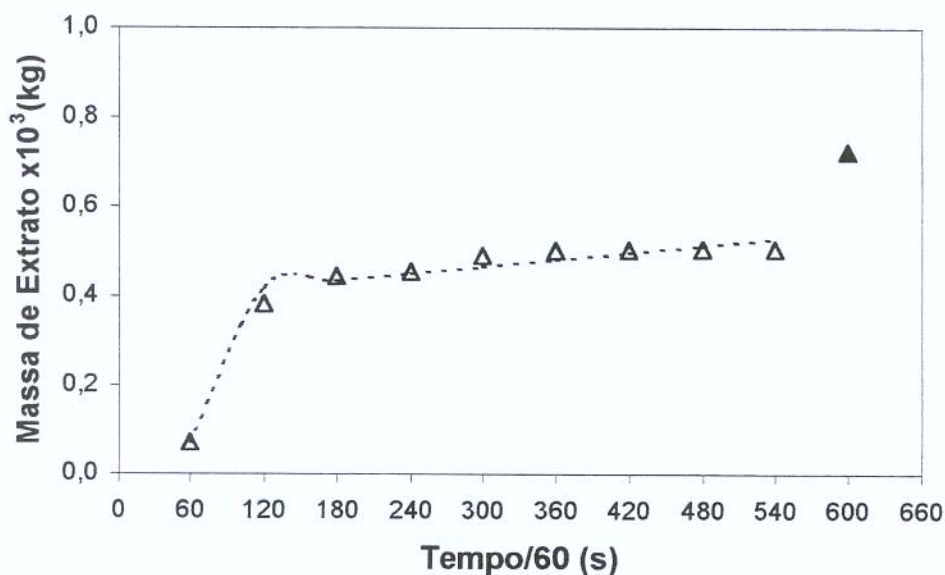
*para a massa acumulada

Figura 7.16: Curva de extração do experimento 22: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 23Tabela 7.21: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $5,28 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,0694	0,0694	0,10	0,0694
120	0,3125	0,3819	0,53	0,4174
180	0,0610	0,4429	0,62	0,4331
240	0,0110	0,4539	0,64	0,4488
300	0,0352	0,4891	0,68	0,4645
360	0,0111	0,5002	0,70	0,4801
420	0,0021	0,5023	0,70	0,4958
480	0,0014	0,5037	0,71	0,5115
540	0,0006	0,5043	0,71	0,5272
600	0,2190	0,7233	1,01	
Total		0,7233	1,01	

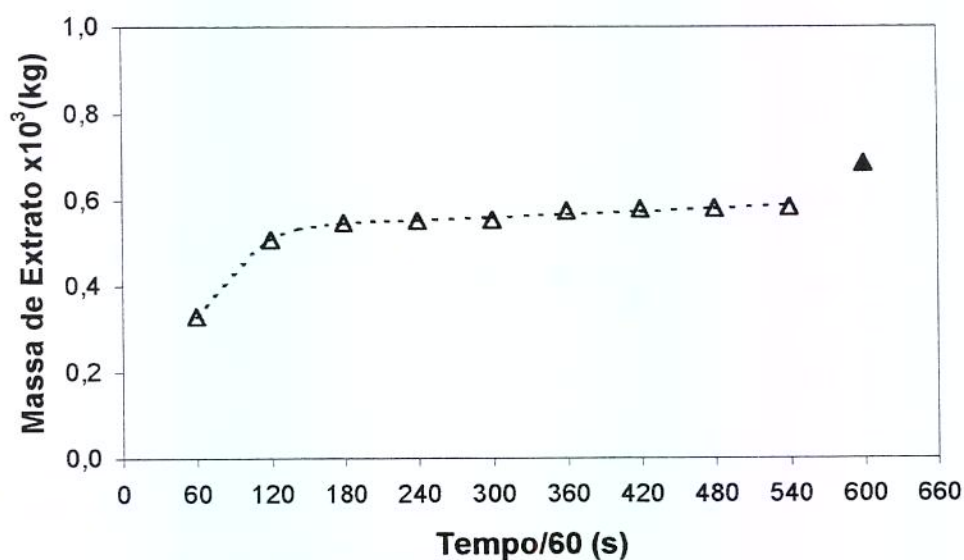
*para a massa acumulada

Figura 7.17: Curva de extração do experimento 23: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

Experimento 24Tabela 7.22: Experimento efetuado a 9,2% etanol e $6,12 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão experimental

Tempo/60 (s)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)	Valor Predito*(g)
60	0,3282	0,3282	0,46	0,3282
120	0,1789	0,5071	0,71	0,5071
180	0,0390	0,5461	0,77	0,5455
240	0,0046	0,5507	0,77	0,5523
300	0,0018	0,5525	0,77	0,5592
360	0,0206	0,5731	0,80	0,5660
420	0,0044	0,5775	0,81	0,5729
480	0,0025	0,5800	0,81	0,5797
540	0,0022	0,5822	0,82	0,5866
600	0,1002	0,6824	0,96	
Total		0,6824	0,96	

*para a massa acumulada

Figura 7.18: Curva de extração do experimento 24: ---- (predito); $\triangle$ (experimental); $\blacktriangle$ (despressurização).

7.8- Anexo H

Cromatogramas obtidos nas análises em Cromatografia a Gás com Detector de Ionização em Chamas (CG-DIC)

Foram analisadas todas as amostras de todos os experimentos, no entanto, para cada ensaio é apresentado apenas um cromatograma característico, relativo a uma amostra de extrato fracionado. O número da amostra está relacionado com a hora em que esta foi obtida no processo, por exemplo: amostra 1 é a amostra retirada na primeira hora do processo, sendo a coronaridina codificada como C e voacangina como V.

Experimento 1: Experimento efetuado com TA1 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

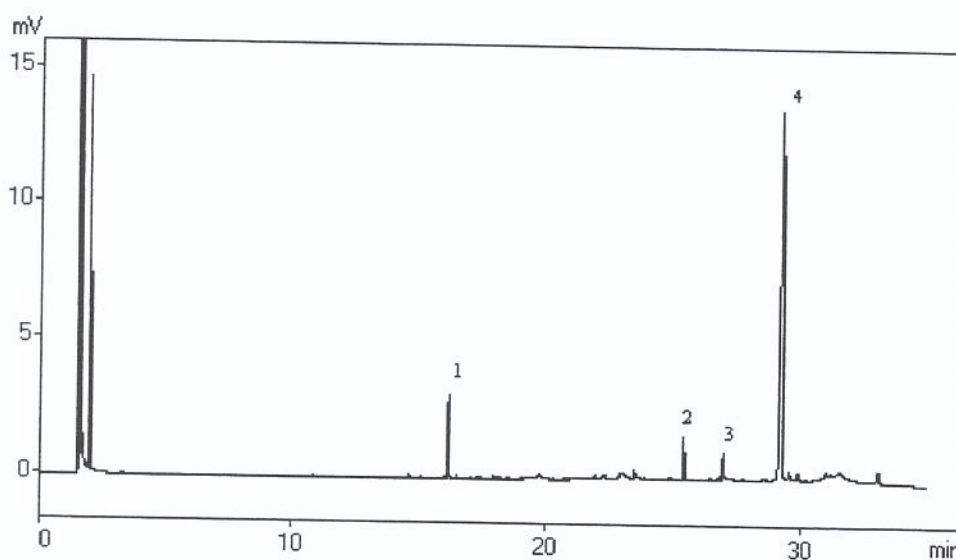


Figura 7.19: Cromatograma da amostra 8 do experimento 1 (C- pico 2, V- pico 4)

Experimento 2: Experimento efetuado com TA2 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

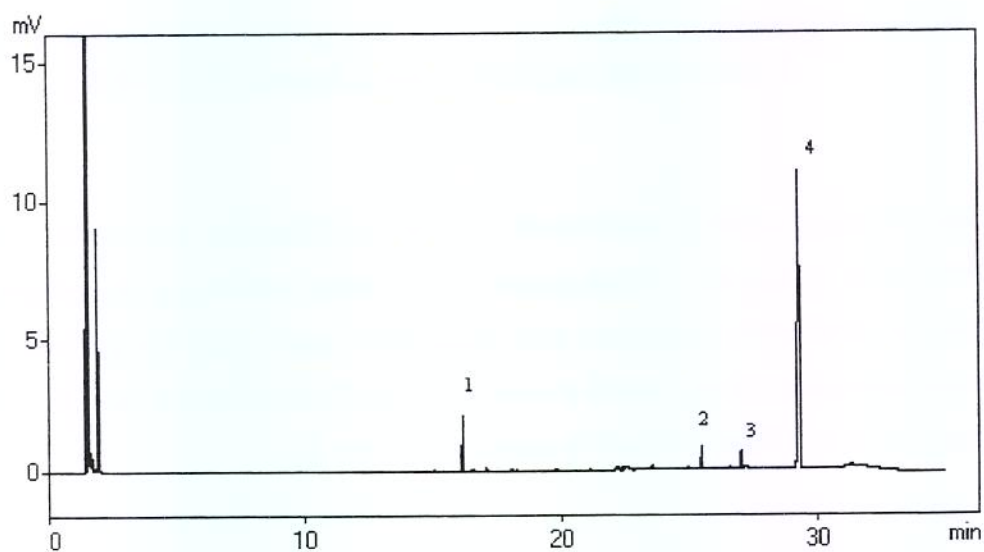


Figura 7.20: Cromatograma da amostra 3 do experimento 2 (C- pico 2, V- pico 4)

Experimento 3: Experimento efetuado com TA3 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

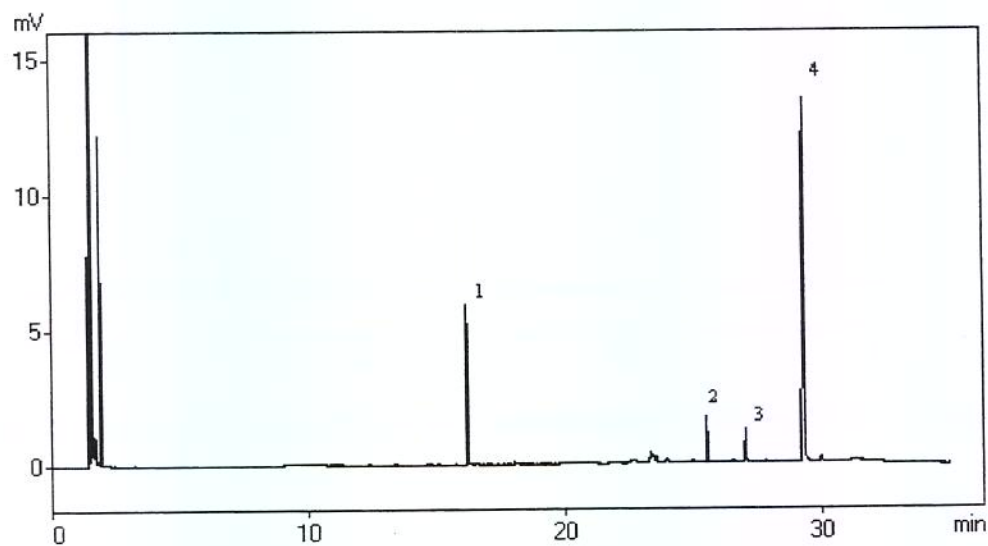


Figura 7.21: Cromatograma da amostra 8 do experimento 3 (C- pico 2, V- pico 4)

Experimento 4: Experimento efetuado com TA4 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

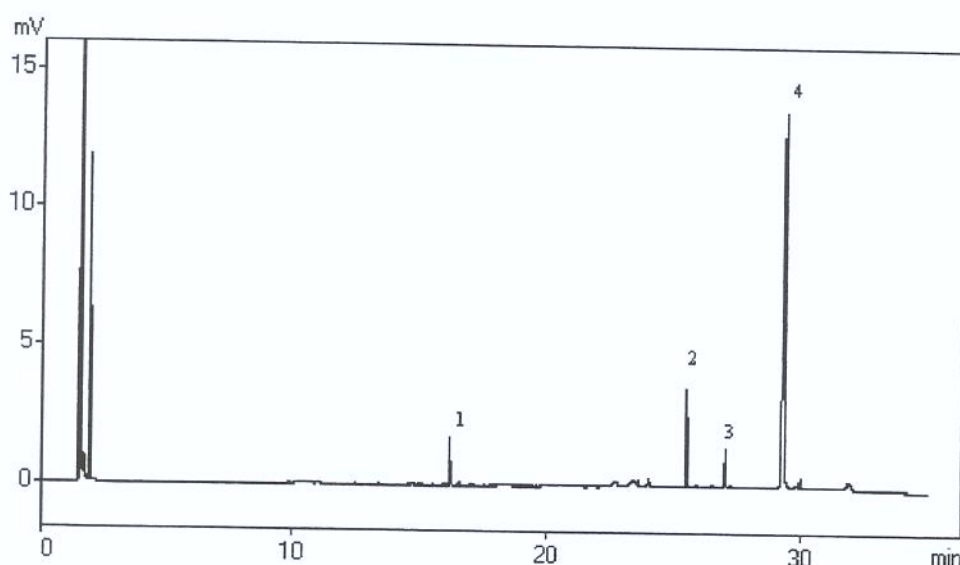


Figura 7.22: Cromatograma da amostra 4 do experimento 4 (C- pico 2, V- pico 4)

Experimento 12: Experimento efetuado com TA2 a 200 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

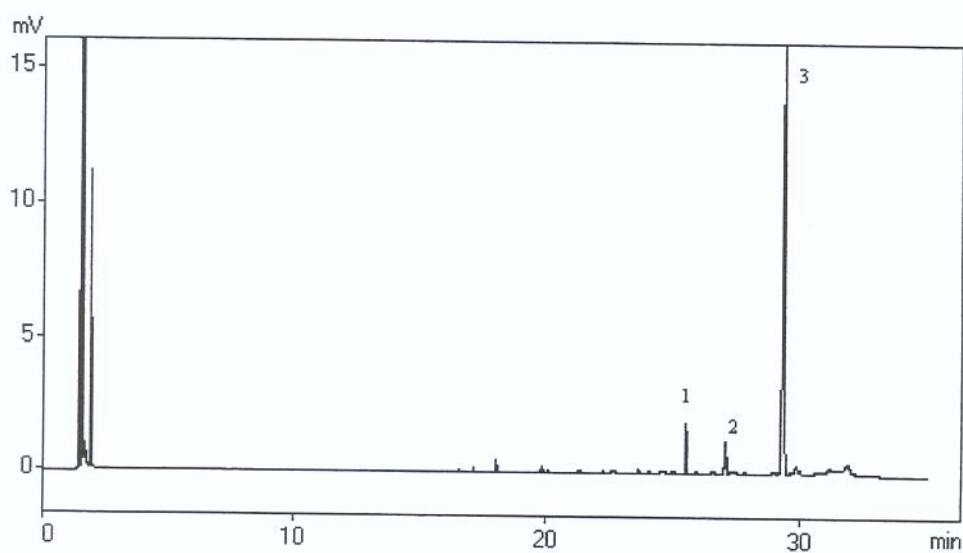


Figura 7.23: Cromatograma da amostra 3 do experimento 12 (C- pico 1, V- pico 3)

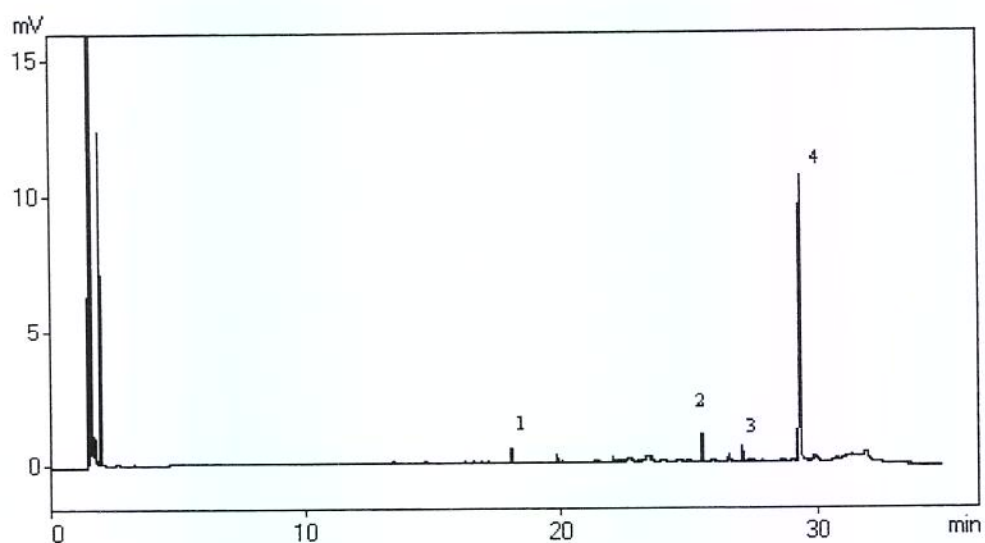
Experimento 13: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

Figura 7.24: Cromatograma da amostra 5 do experimento 13 (C- pico 2, V- pico 4)

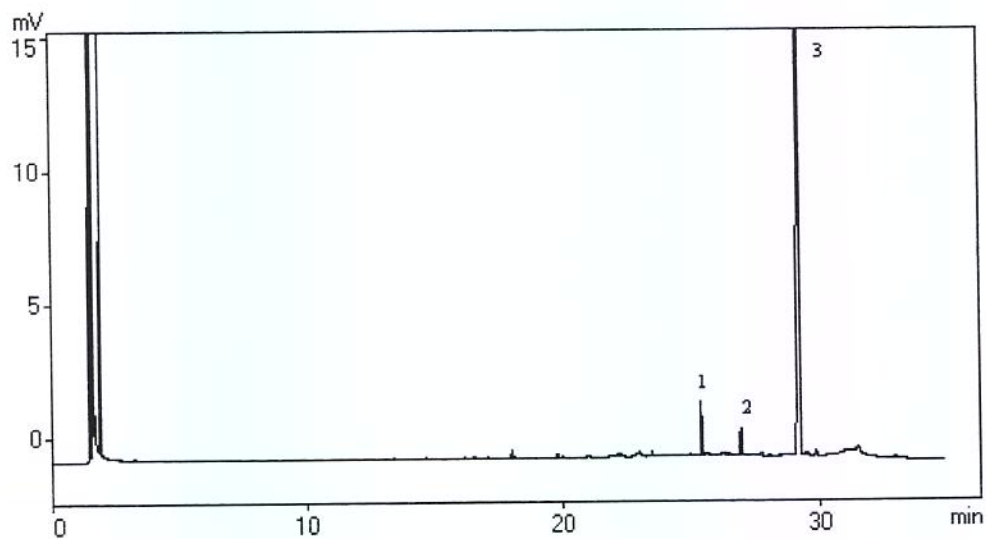
Experimento 14: Experimento efetuado com TA2 a 250 bar, 45 °C, 4,6%(m/m) etanol

Figura 7.25: Cromatograma da amostra 3 do experimento 14 (C- pico 2, V- pico 4)

Experimento 15: Experimento efetuado com TA2 a 250 bar, 45 °C, 4,6%(m/m) etanol

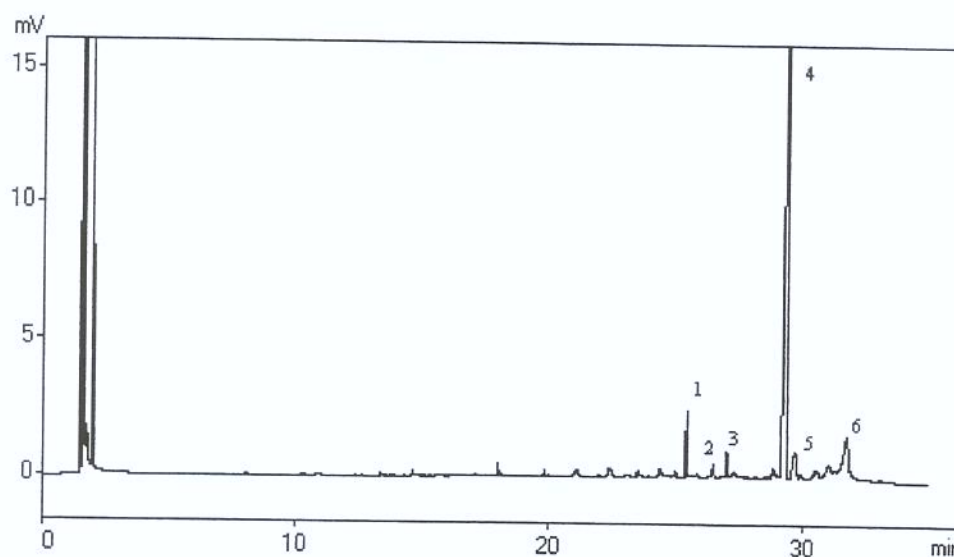


Figura 7.26: Cromatograma da amostra 5 do experimento 15 (C- pico 2, V- pico 4)

Experimento 16: Experimento efetuado com TA2 a 200 bar, 55 °C, 4,6%(m/m) etanol

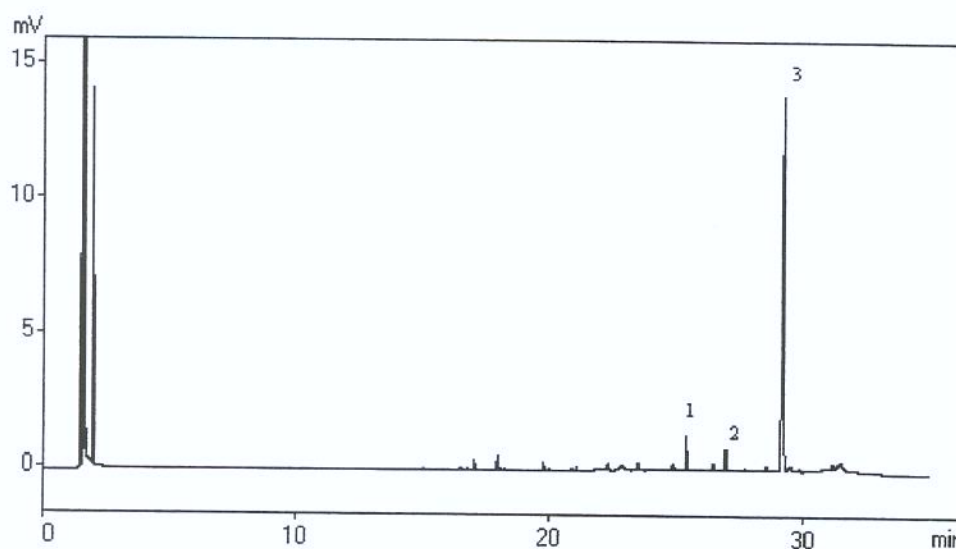


Figura 7.27: Cromatograma da amostra 3 do experimento 16 (C- pico 1, V- pico 3)

Experimento 17: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 4,6%(m/m) etanol

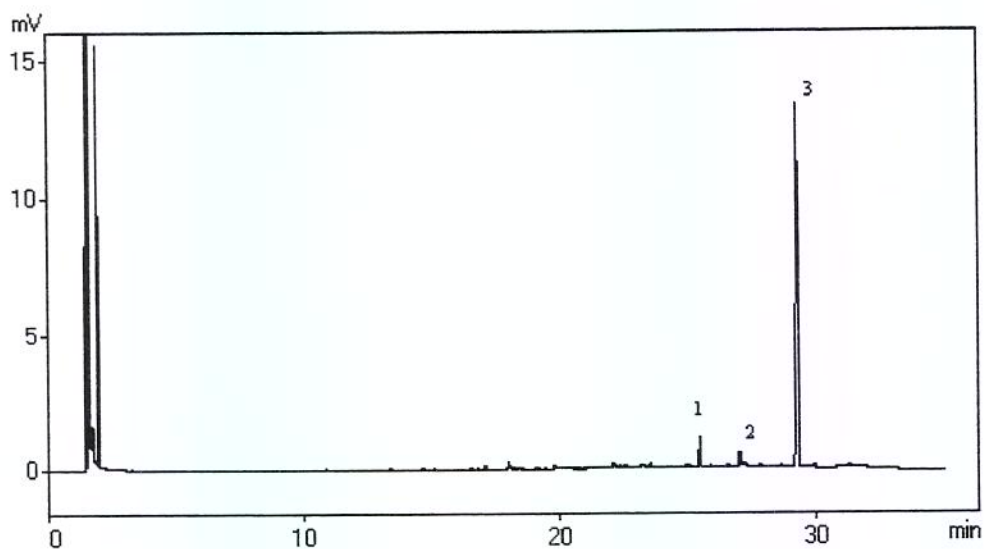


Figura 7.28: Cromatograma da amostra 2 do experimento 17 (C- pico 1, V- pico 3)

Experimento 20: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $3,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

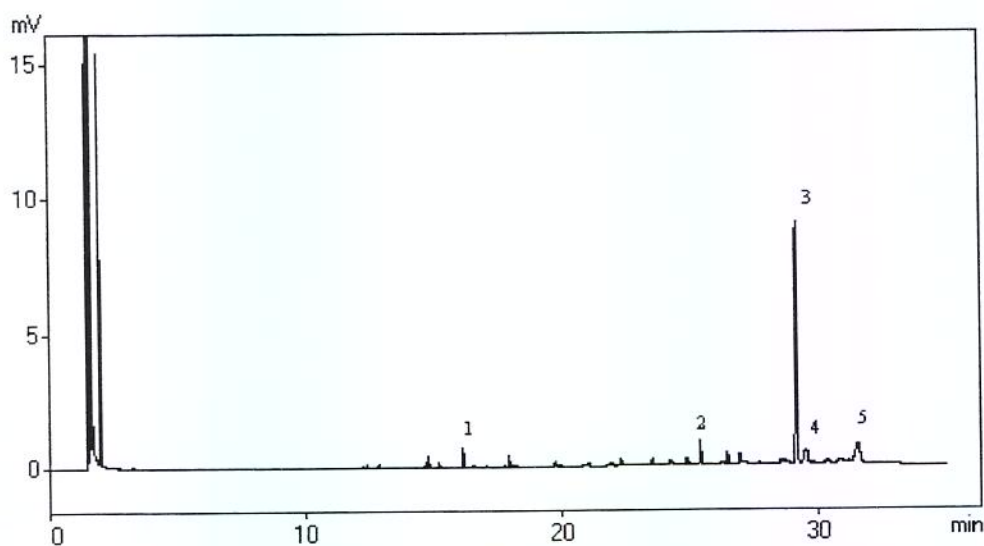


Figura 7.29: Cromatograma da amostra 3 do experimento 20 (C- pico 2, V- pico 3)

Experimento 21: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55°C, 9,2%(m/m) etanol, $1,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

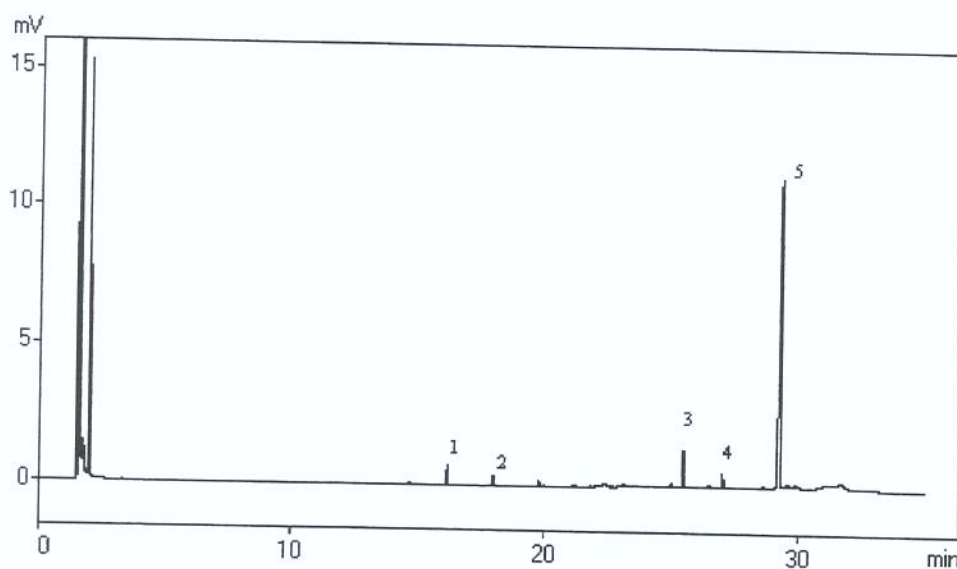


Figura 7.30: Cromatograma da amostra 5 do experimento 21 (C- pico 3, V- pico 5)

Experimento 22: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $2,60 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

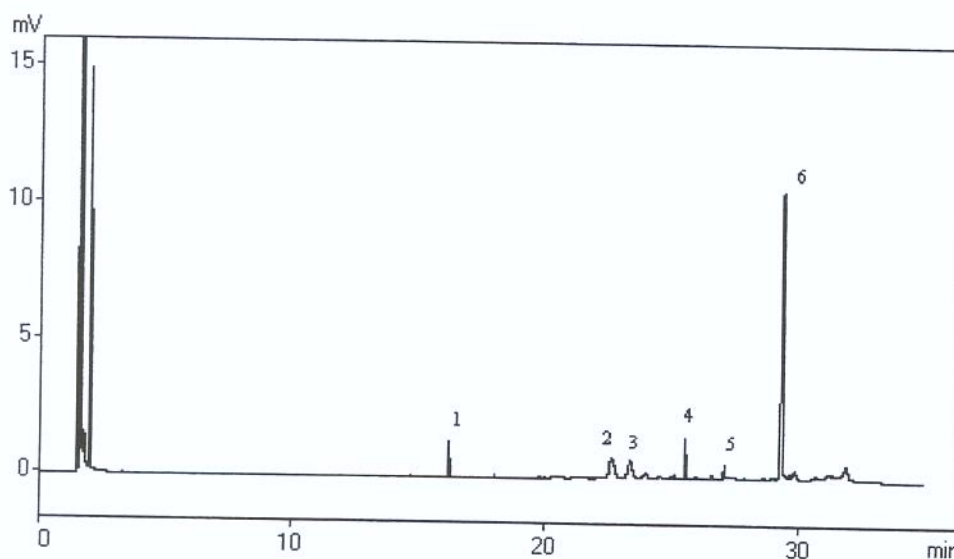


Figura 7.31: Cromatograma da amostra 4 do experimento 22 (C- pico 4, V- pico 6)

Experimento 23: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $5,28 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

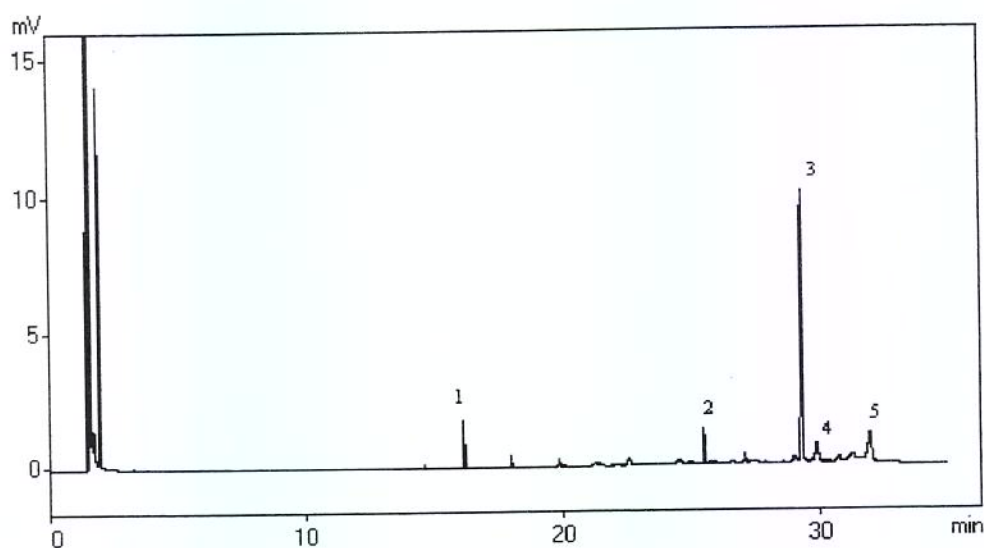


Figura 7.32: Cromatograma da amostra 3 do experimento 23 (C- pico 2, V- pico 3)

Experimento 24: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $6,12 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente (Amostra 1)

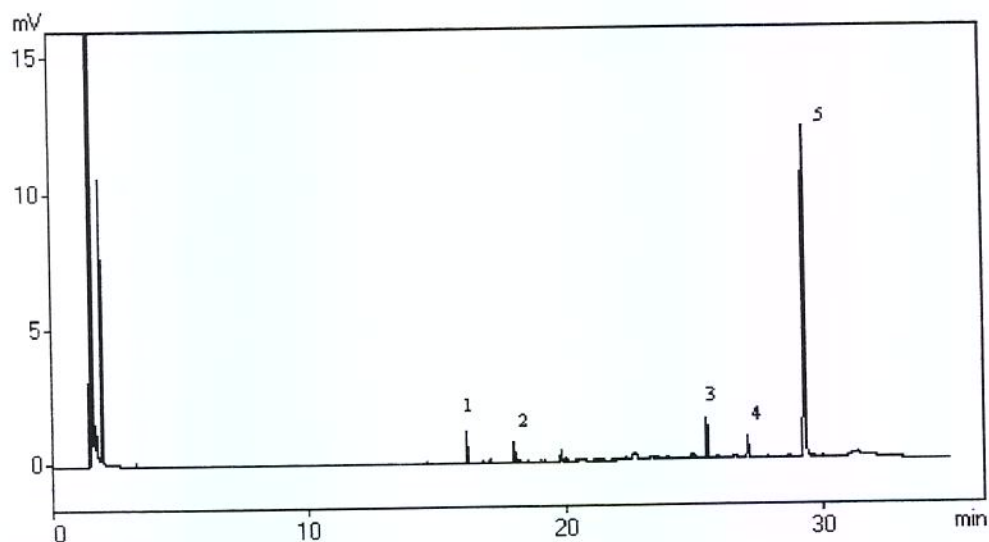


Figura 7.33: Cromatograma da amostra 1 do experimento 24 (C- pico 3, V- pico 5)

7.9- Anexo I

Cromatogramas e Espectros de Massa dos Padrões

Padrão: Voacangina (tr= 28,117min)

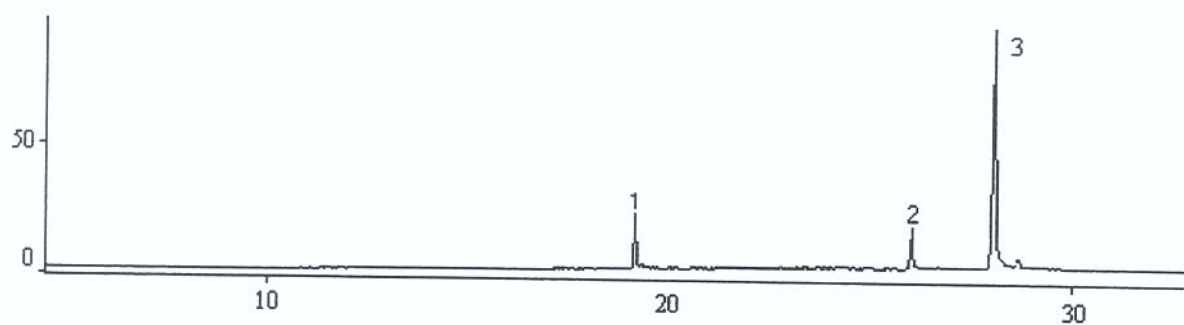


Figura 7.34: Cromatograma do padrão voacangina (Pico 3)

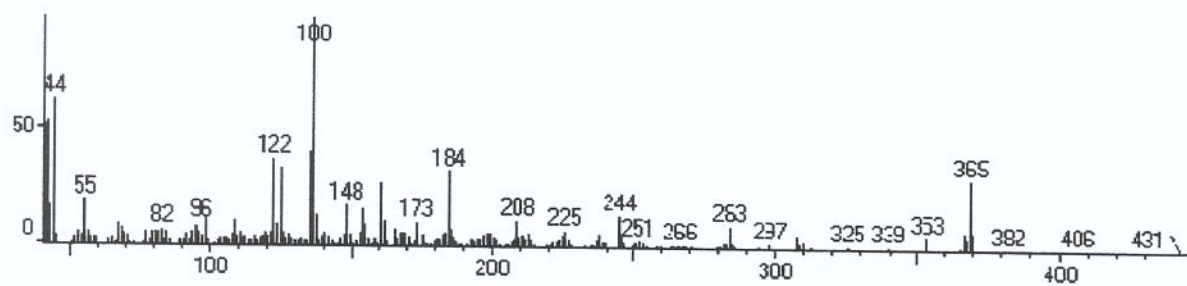


Figura 7.35: Espectro de Massas da Voacangina (PM= 368,210)

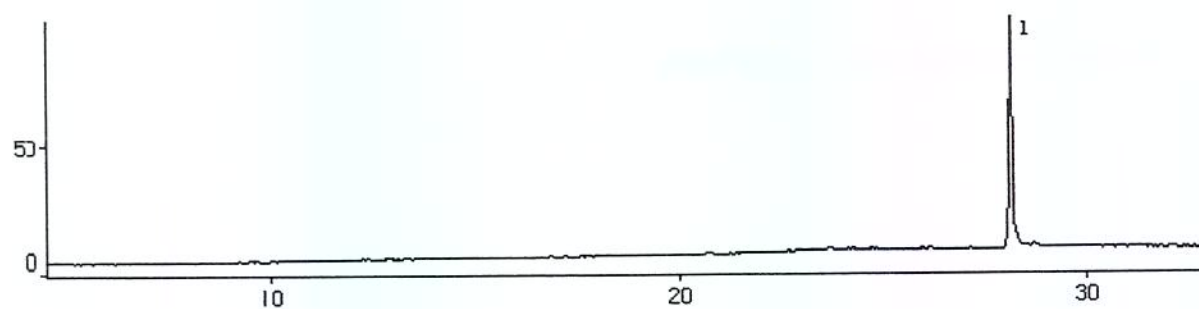
Padrão: Isovoacangina (tr= 28,699min)

Figura 7.36: Cromatograma do padrão isovoacangina (Pico 1)

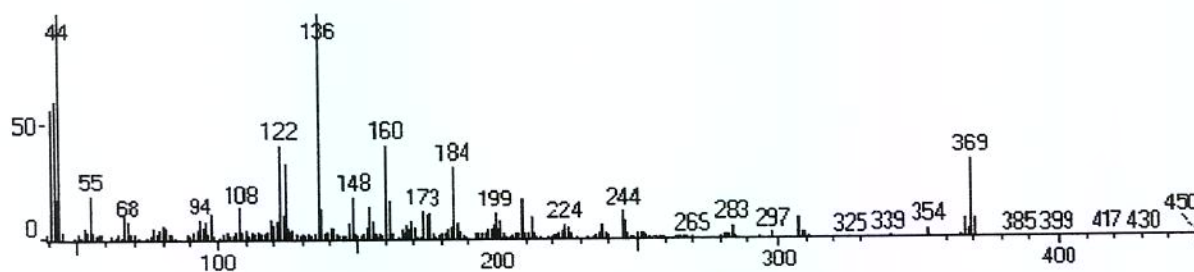


Figura 7.37: Espectro de Massas da Isovoacangina (PM= 368,210)

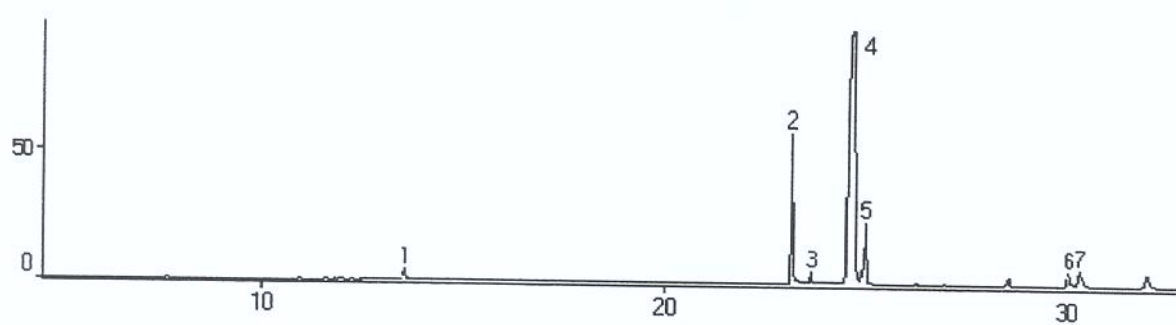
Padrão: Coronaridina (tr= 24,706min)

Figura 7.38: Cromatograma do padrão coronaridina (Pico 4)

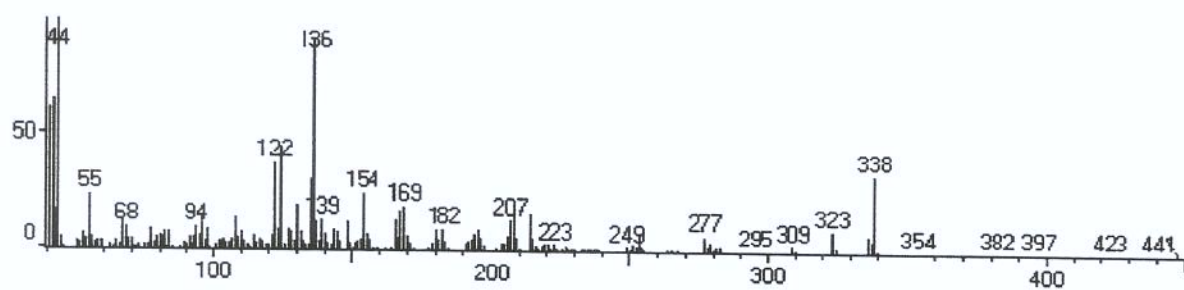


Figura 7.39: Espectro de Massas da Coronaridina (PM=338,199)

7.10- Anexo J

Saída do Programa de Ajuste Linear - SAS 6.12

Experimento 1: Experimento efetuado com TA1 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.32513	0.16256	93.585	0.0001
Error	6	0.01042	0.00174		
C Total	8	0.33555			
Root MSE		0.04168	R-square	0.9689	
Dep Mean		0.33047	Adj R-sq	0.9586	
C.V.		12.61196			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	0.013205	0.11275085	0.117	0.9106
TMIN	1	0.000638	0.00126540	0.504	0.6320
AL1	1	0.000615	0.00132092	0.466	0.6578

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTAT	MRES
1	60	0.0515	0	0.05150	0.000000
2	120	0.1432	20	0.10210	0.041100
3	180	0.2061	80	0.17731	0.028789
4	240	0.2103	140	0.25252	-0.042221
5	300	0.2559	200	0.32773	-0.071832
6	360	0.3958	260	0.40294	-0.007143
7	420	0.4996	320	0.47815	0.021446
8	480	0.5699	380	0.55336	0.016536
9	540	0.6419	440	0.62858	0.013325

Experimento 2: Experimento efetuado com TA2 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.14521	0.07260	92.177	0.0001
Error	6	0.00473	0.00079		
C Total	8	0.14993			
Root MSE	0.02807	R-square	0.9685		
Dep Mean	0.26559	Adj R-sq	0.9580		
C.V.	10.56716				

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.051263	0.03024028	-1.695	0.1410
TMIN	1	0.001291	0.00015289	8.445	0.0002
AL1	1	-0.000885	0.00024861	-3.559	0.0119

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0046	0.0	0.02620	-0.021604
2	120	0.1247	0.0	0.10367	0.021029
3	180	0.2039	0.0	0.18114	0.022762
4	240	0.2364	0.0	0.25860	-0.022204
5	300	0.2830	23.4	0.31537	-0.032369
6	360	0.3647	83.4	0.33975	0.024947
7	420	0.3901	143.4	0.36414	0.025963
8	480	0.3913	203.4	0.38852	0.002779
9	540	0.3916	263.4	0.41290	-0.021305

Experimento 3: Experimento efetuado com TA3 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.00299	0.00150	125.493	0.0002
Error	4	0.00005	0.00001		
C Total	6	0.00304			
Root MSE		0.00345	R-square	0.9843	
Dep Mean		0.07426	Adj R-sq	0.9765	
C.V.		4.65192			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.002438	0.00734721	-0.332	0.7567
TMIN	1	0.000557	0.00007107	7.842	0.0014
AL1	1	-0.000444	0.00007866	-5.642	0.0049

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0310	0	0.031000	-.0000000
2	120	0.0664	0	0.064438	0.0019619
3	180	0.0694	60	0.071250	-.0018495
4	240	0.0792	120	0.078061	0.0011390
5	300	0.0800	180	0.084872	-.0048724
6	360	0.0956	240	0.091684	0.0039162
7	420	0.0982	300	0.098495	-.0002952

Experimento 4: Experimento efetuado com TA4 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.66577	0.33288	255.619	0.0001
Error	4	0.00521	0.00130		
C Total	6	0.67098			
Root MSE		0.03609	R-square	0.9922	
Dep Mean		0.51970	Adj R-sq	0.9884	
C.V.		6.94380			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.216348	0.04164771	-5.195	0.0065
TMIN	1	0.003461	0.00023229	14.902	0.0001
AL1	1	-0.002210	0.00047268	-4.675	0.0095

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0252	0	-0.00866	0.033862
2	120	0.1391	0	0.19902	-0.059925
3	180	0.4249	0	0.40671	0.018189
4	240	0.6225	0	0.61440	0.008103
5	300	0.7299	40	0.73370	-0.003800
6	360	0.8158	100	0.80881	0.006991
7	420	0.8805	160	0.88392	-0.003419

Experimento 12: Experimento efetuado com TA2 a 200 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.08126	0.04063	43.014	0.0003
Error	6	0.00567	0.00094		
C Total	8	0.08693			
Root MSE		0.03073	R-square	0.9348	
Dep Mean		0.16948	Adj R-sq	0.9131	
C.V.		18.13481			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.074111	0.03122751	-2.373	0.0553
TMIN	1	0.001004	0.00014712	6.823	0.0005
AL1	1	-0.000853	0.00026067	-3.270	0.0170

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0223	0	-0.01363	0.035930
2	120	0.0223	0	0.04632	-0.024020
3	180	0.0547	0	0.10627	-0.051570
4	240	0.1977	0	0.16622	0.031479
5	300	0.2347	0	0.22617	0.008529
6	360	0.2347	60	0.23510	-0.000398
7	420	0.2409	120	0.24402	-0.003124
8	480	0.2590	180	0.25295	0.006050
9	540	0.2590	240	0.26188	-0.002876

Experimento 13: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.02959	0.01479	67.605	0.0001
Error	6	0.00131	0.00022		
C Total	8	0.03090			
Root MSE		0.01479	R-square	0.9575	
Dep Mean		0.10300	Adj R-sq	0.9433	
C.V.		14.36252			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.057304	0.01710976	-3.349	0.0154
TMIN	1	0.000722	0.00009371	7.705	0.0003
AL1	1	-0.000579	0.00013497	-4.289	0.0052

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0004	0.0	-0.01398	0.014382
2	120	0.0004	0.0	0.02934	-0.028941
3	180	0.0874	0.0	0.07266	0.014737
4	240	0.1158	0.0	0.11599	-0.000186
5	300	0.1282	55.1	0.12741	0.000786
6	360	0.1326	115.1	0.13601	-0.003406
7	420	0.1456	175.1	0.14460	0.001002
8	480	0.1583	235.1	0.15319	0.005109
9	540	0.1583	295.1	0.16178	-0.003483

Experimento 14 e 15 (média): Experimento efetuado com TA2 a 250 bar, 45 °C,
4,6%(m/m) etanol

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.07860	0.03930	195.150	0.0001
Error	6	0.00121	0.00020		
C Total	8	0.07980			
Root MSE		0.01419	R-square	0.9849	
Dep Mean		0.17251	Adj R-sq	0.9798	
C.V.		8.22590			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.062003	0.01408659	-4.402	0.0046
TMIN	1	0.000948	0.00006446	14.699	0.0001
AL1	1	-0.000829	0.00012387	-6.693	0.0005

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.00990	0	-0.00515	0.015052
2	120	0.04520	0	0.05170	-0.006500
3	180	0.08150	0	0.10855	-0.027051
4	240	0.17885	0	0.16540	0.013447
5	300	0.22710	0	0.22225	0.004845
6	360	0.24220	45	0.24180	0.000401
7	420	0.24800	105	0.24891	-0.000907
8	480	0.25740	165	0.25601	0.001385
9	540	0.26245	225	0.26312	-0.000673

Experimento 16: Experimento efetuado com TA2 a 200 bar, 55 °C, 4,6%(m/m) etanol

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.07380	0.03690	216.677	0.0001
Error	6	0.00102	0.00017		
C Total	8	0.07482			
Root MSE	0.01305	R-square	0.9863		
Dep Mean	0.16974	Adj R-sq	0.9818		
C.V.	7.68784				

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.022949	0.01463086	-1.569	0.1678
TMIN	1	0.000698	0.00007737	9.026	0.0001
AL1	1	-0.000189	0.00011803	-1.603	0.1601

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0197	0.0	0.01895	0.000750
2	120	0.0644	0.0	0.06085	0.003550
3	180	0.0934	0.0	0.10275	-0.009349
4	240	0.1497	0.0	0.14465	0.005051
5	300	0.1633	39.9	0.17900	-0.015701
6	360	0.2239	99.9	0.20955	0.014349
7	420	0.2430	159.9	0.24010	0.002900
8	480	0.2846	219.9	0.27065	0.013950
9	540	0.2857	279.9	0.30120	-0.015500

Experimento 17: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 4,6%(m/m) etanol

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.12660	0.06330	281.056	0.0001
Error	6	0.00135	0.00023		
C Total	8	0.12795			
Root MSE		0.01501	R-square	0.9894	
Dep Mean		0.26797	Adj R-sq	0.9859	
C.V.		5.60049			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.093706	0.01734128	-5.404	0.0017
TMIN	1	0.001747	0.00009488	18.411	0.0001
AL1	1	-0.001674	0.00013691	-12.229	0.0001

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0299	0.0	0.01111	0.018792
2	120	0.0859	0.0	0.11592	-0.030021
3	180	0.2244	0.0	0.22073	0.003666
4	240	0.3331	0.0	0.32555	0.007552
5	300	0.3413	54.6	0.33895	0.002348
6	360	0.3416	114.6	0.34331	-0.001715
7	420	0.3443	174.6	0.34768	-0.003378
8	480	0.3546	234.6	0.35204	0.002559
9	540	0.3566	294.6	0.35640	0.000196

Experimento 20: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $3,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.11721	0.05860	275.77	<.0001
Error	6	0.00128	0.00021251		
Corrected Total	8	0.11848			

Root MSE	0.01458	R-Square	0.9892
Dependent Mean	0.27709	Adj R-Sq	0.9857
Coeff Var	5.26108		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.09948	0.01871	-5.32	0.0018
tmin	1	0.00197	0.00011485	17.18	<.0001
AL1	1	-0.00183	0.00015101	-12.15	<.0001

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	60	0.0069	0	0.01889	-0.011991
2	120	0.1614	0	0.13726	0.024140
3	180	0.2432	0	0.25563	-0.012428
4	240	0.3135	26	0.32629	-0.012794
5	300	0.3424	86	0.33458	0.007822
6	360	0.3494	146	0.34286	0.006538
7	420	0.3587	206	0.35115	0.007555
8	480	0.3589	266	0.35943	-0.000529
9	540	0.3594	326	0.36771	-0.008313

Experimento 21: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $1,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.12482	0.06241	194.32	<.0001
Error	6	0.00193	0.00032119		
Corrected Total	8	0.12675			

Root MSE	0.01792	R-Square	0.9848
Dependent Mean	0.18603	Adj R-Sq	0.9797
Coeff Var	9.63360		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.04556	0.01396	-3.26	0.0172
tmin	1	0.00077815	0.00004609	16.88	<.0001
AL1	1	-0.00032626	0.00044549	-0.73	0.4916

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	60	0.0228	0	0.00113	0.021675
2	120	0.0520	0	0.04781	0.004186
3	180	0.0792	0	0.09450	-0.015304
4	240	0.1112	0	0.14119	-0.029993
5	300	0.1823	0	0.18788	-0.005582
6	360	0.2491	0	0.23457	0.014529
7	420	0.2886	0	0.28126	0.007339
8	480	0.3311	0	0.32795	0.003150
9	540	0.3580	51	0.35800	0.000000

Experimento 22: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $2,60 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.20929	0.10465	3015.40	<.0001
Error	6	0.00020822	0.00003470		
Corrected Total	8	0.20950			

Root MSE	0.00589	R-Square	0.9990
Dependent Mean	0.31811	Adj R-Sq	0.9987
Coeff Var	1.85187		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.11585	0.00697	-16.62	<.0001
tmin	1	0.00199	0.00003923	50.80	<.0001
AL1	1	-0.00160	0.00005486	-29.10	<.0001

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	60	0.0050	0	0.00372	0.001279
2	120	0.1209	0	0.12329	-0.002392
3	180	0.2438	0	0.24286	0.000937
4	240	0.3533	4	0.35605	-0.002749
5	300	0.3839	64	0.37984	0.004063
6	360	0.4002	124	0.40363	-0.003426
7	420	0.4265	184	0.42741	-0.000915
8	480	0.4617	244	0.45120	0.010496
9	540	0.4677	304	0.47499	-0.007292

Experimento 23: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $5,28 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	0.15461	0.07730	153.596	0.0001
Error	6	0.00302	0.00050		
C Total	8	0.15763			
Root MSE		0.02243	R-square	0.9808	
Dep Mean		0.42752	Adj R-sq	0.9745	
C.V.		5.24751			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.290068	0.04806903	-6.034	0.0009
TMIN	1	0.005991	0.00046129	12.988	0.0001
AL1	1	-0.005730	0.00049036	-11.685	0.0001

OBS	TMIN	MEXT	AL1	MEXTTHAT	MRES
1	60	0.0694	0	0.06940	0.000000
2	120	0.3819	2	0.41741	-0.035508
3	180	0.4429	62	0.43309	0.009812
4	240	0.4539	122	0.44877	0.005132
5	300	0.4891	182	0.46445	0.024652
6	360	0.5002	242	0.48013	0.020073
7	420	0.5023	302	0.49581	0.006493
8	480	0.5037	362	0.51149	-0.007787
9	540	0.5043	422	0.52717	-0.022867

Experimento 24: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $6,12 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.05156	0.02578	1118.82	<.0001
Error	6	0.00013825	0.00002304		
Corrected Total	8	0.05170			

Root MSE	0.00480	R-Square	0.9973
Dependent Mean	0.53304	Adj R-Sq	0.9964
Coeff Var	0.90052		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.14933	0.00942	15.85	<.0001
tmin	1	0.00298	0.00008426	35.38	<.0001
AL1	1	-0.00287	0.00009170	-31.26	<.0001

Obs	tmin	mext	AL1	mextthat	Mres
1	60	0.3282	0	0.32820	-.000003658
2	120	0.5071	0	0.50708	0.000023613
3	180	0.5461	49	0.54546	0.000635418
4	240	0.5507	109	0.55232	-.001615434
5	300	0.5525	169	0.55917	-.006666285
6	360	0.5731	229	0.56602	0.007082864
7	420	0.5775	289	0.57287	0.004632012
8	480	0.5800	349	0.57972	0.000281161
9	540	0.5822	409	0.58657	-.004369691

7.11- Anexo L

Saída do Programa de Ajuste Não Linear - SAS 6.12

Experimento 1: Experimento efetuado com TA1 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	0.013205	0.000638	0.000615	100.000000	0.010423
1	0.013205	0.000638	0.000615	100.000000	0.010422

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	1.3080035261	0.4360011754
Residual	6	0.0104224939	0.0017370823
Uncorrected Total	9	1.3184260200	
(Corrected Total)	8	0.3355520600	

NOTE: The (approximate) Hessian is singular.

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	0.0132054	0.11275085033	-0.26268623	0.28909695
B1	0.0006382	0.00126539684	-0.00245807	0.00373456
B2	0.0006153	0.00132092284	-0.00261692	0.00384745
KNOT1	100.0000000	0.00000000000	100.00000000	100.00000000

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.977755237	0.9632673376	.
B1	-0.977755237	1	-0.997485628	.
B2	0.9632673376	-0.997485628	1	.
KNOT1	.	.	.	1

Experimento 2: Experimento efetuado com TA2 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.051263	0.001291	-0.000885	276.600000	0.004726
1	-0.051250	0.001291	-0.000885	276.635254	0.004726
2	-0.051250	0.001291	-0.000885	276.635268	0.004726

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.78004484000	0.19501121000
Residual	5	0.00472593000	0.00094518600
Uncorrected Total	9	0.78477077000	
(Corrected Total)	8	0.14993364889	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0512500	0.037653406	-0.14803976	0.04553976
B1	0.0012910	0.000229151	0.00070196	0.00188004
B2	-0.0008847	0.000280652	-0.00160609	-0.00016324
KNOT1	276.6352675	48.051322253	153.11720164	400.15333340

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.912870929	0.7453559925	0.4755349168
B1	-0.912870929	1	-0.816496581	-0.682640504
B2	0.7453559925	-0.816496581	1	0.2418702078
KNOT1	0.4755349168	-0.682640504	0.2418702078	1

Experimento 3: Experimento efetuado com TA3 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.002438	0.000557	-0.000444	120.000000	0.0000478275
1	-0.002438	0.000557	-0.000444	120.000000	0.0000477310
2	-0.002438	0.000557	-0.000444	120.000000	0.0000477310

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics				Dependent Variable MEXT
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	
Regression	3	0.04159382895	0.01386460965	
Residual	4	0.00004773105	0.00001193276	
Uncorrected Total	7	0.04164156000		
(Corrected Total)	6	0.00304269714		

NOTE: The (approximate) Hessian is singular.

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0024381	0.00734721321	-0.02283695	0.01796076
B1	0.0005573	0.00007106972	0.00035998	0.00075462
B2	-0.0004438	0.00007865976	-0.00066217	-0.00022539
KNOT1	120.0000000	0.00000000000	120.00000000	120.00000000

Asymptotic Correlation Matrix				
Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.961256031	0.9176629355	.
B1	-0.961256031	1	-0.988211769	.
B2	0.9176629355	-0.988211769	1	.
KNOT1	.	.	.	1

Experimento 4: Experimento efetuado com TA4 a 250 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.216380	0.003461	-0.002210	260.000000	0.005209
1	-0.216500	0.003463	-0.002208	259.726998	0.005209
2	-0.216500	0.003463	-0.002208	259.726731	0.005209

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	2.5563850803	0.6390962701
Residual	3	0.0052089297	0.0017363099
Uncorrected Total	7	2.5615940100	
(Corrected Total)	6	0.6709773800	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.2165000	0.051033958	-0.37891557	-0.05408443
B1	0.0034628	0.000310583	0.00247440	0.00445126
B2	-0.0022078	0.000581047	-0.00405702	-0.00035865
KNOT1	259.7267306	30.715990491	161.97309084	357.48037032

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1			
B1	-0.912870929	1		
B2	0.4879500365	-0.534522484	1	
KNOT1	0.3333188604	-0.502526531	-0.345062263	1

Experimento 12: Experimento efetuado com TA2 a 200 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.074111	0.001004	-0.008530	298.500000	6.477375
1	-0.065400	0.000931	-0.000809	300.656419	0.006913
2	-0.073720	0.001000	-0.000849	299.066449	0.005660
3	-0.072680	0.000992	-0.000844	301.708197	0.005650
4	-0.073200	0.000996	-0.000846	300.416561	0.005647
5	-0.073330	0.000997	-0.000847	300.096454	0.005646
6	-0.073354	0.000997	-0.000847	300.036535	0.005646
7	-0.073366	0.000997	-0.000847	300.008456	0.005646
8	-0.073369	0.000997	-0.000847	300.001657	0.005646
9	-0.073369	0.000997	-0.000847	299.999970	0.005646
10	-0.073369	0.000997	-0.000847	300.000280	0.005646
11	-0.073369	0.000997	-0.000847	300.000069	0.005646
12	-0.073369	0.000997	-0.000847	300.000017	0.005646
13	-0.073369	0.000997	-0.000847	300.000003	0.005646

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.33978878084	0.08494719521
Residual	5	0.00564616916	0.00112923383
Uncorrected Total	9	0.34543495000	
(Corrected Total)	8	0.08693049556	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0733692	0.035244251	-0.16396616	0.01722767
B1	0.0009974	0.000177109	0.00054214	0.00145268
B2	-0.0008470	0.000306762	-0.00163556	-0.00005847
KNOT1	300.0000034	57.492373502	152.21329444	447.78671239

Experimento 13: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 35 °C, 4,6%(m/m) etanol

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.057304	0.000722	-0.000579	244.900000	0.001313
1	-0.057300	0.000722	-0.000579	244.923690	0.001313
2	-0.057300	0.000722	-0.000579	244.923697	0.001313

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.12507079300	0.03126769825
Residual	5	0.00131306700	0.00026261340
Uncorrected Total	9	0.12638386000	
(Corrected Total)	8	0.03090286000	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0573000	0.019847420	-0.10831868	-0.00628132
B1	0.0007220	0.000120788	0.00041151	0.00103249
B2	-0.0005788	0.000147934	-0.00095910	-0.00019856
KNOT1	244.9236971	37.582419831	148.31641157	341.53098261

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1			
B1	-0.912870929	1		
B2	0.7453559925	-0.816496581	1	
KNOT1	0.3290762471	-0.527058183	0.0334827309	1

Experimento 14 e 15 (média): Experimento efetuado com TA2 a 250 bar, 45 °C,
4,6%(m/m) etanol

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.062003	0.000948	-0.000829	315.000000	0.001208
1	-0.061905	0.000947	-0.000830	315.491556	0.001208
2	-0.061905	0.000947	-0.000830	315.491062	0.001208

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.34643648250	0.08660912063
Residual	5	0.00120815250	0.00024163050
Uncorrected Total	9	0.34764463500	
(Corrected Total)	8	0.07980388389	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0619050	0.016303176	-0.10381304	-0.01999696
B1	0.0009468	0.000081927	0.00073615	0.00115735
B2	-0.0008298	0.000141901	-0.00119460	-0.00046507
KNOT1	315.4910625	26.258862295	247.99148637	382.99063856

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.904534034	0.5222329679	0.3247472499
B1	-0.904534034	1	-0.577350269	-0.509411204
B2	0.5222329679	-0.577350269	1	-0.289844924
KNOT1	0.3247472499	-0.509411204	-0.289844924	1

Experimento 16: Experimento efetuado com TA2 a 200 bar, 55 °C, 4,6%(m/m) etanol

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.022949	0.000698	-0.000189	260.100000	0.001022
1	-0.022950	0.000698	-0.000189	260.088095	0.001022
2	-0.022950	0.000698	-0.000189	260.088106	0.001022

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.33311608500	0.08327902125
Residual	5	0.00102176500	0.00020435300
Uncorrected Total	9	0.33413785000	
(Corrected Total)	8	0.07481926222	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0229500	0.01750798	-0.0679550531	0.02205505
B1	0.0006983	0.00010655	0.0004244413	0.00097223
B2	-0.0001892	0.00013050	-0.0005246145	0.00014628
KNOT1	260.0881057	102.32964659	-2.9548124748	523.13102393

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.912870929	0.7453559925	0.4024255716
B1	-0.912870929	1	-0.816496581	-0.605966436
B2	0.7453559925	-0.816496581	1	0.1354231109
KNOT1	0.4024255716	-0.605966436	0.1354231109	1

Experimento 17: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 4,6%(m/m) etanol

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.093706	0.001747	-0.001674	245.400000	0.001351
1	-0.093700	0.001747	-0.001674	245.411649	0.001351
2	-0.093700	0.001747	-0.001674	245.411648	0.001351

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	4	0.77285591100	0.19321397775
Residual	5	0.00135133900	0.00027026780
Uncorrected Total	9	0.77420725000	
(Corrected Total)	8	0.12795204000	

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.0937000	0.020134590	-0.14545686	-0.04194314
B1	0.0017468	0.000122535	0.00143185	0.00206182
B2	-0.0016742	0.000150074	-0.00205994	-0.00128839
KNOT1	245.4116476	13.183445569	211.52301306	279.30028211

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.912870929	0.7453559925	0.3315108483
B1	-0.912870929	1	-0.816496581	-0.529705735
B2	0.7453559925	-0.816496581	1	0.0367966614
KNOT1	0.3315108483	-0.529705735	0.0367966614	1

Experimento 20: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $3,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

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

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0995	0.00197	-0.00183	214.0	0.00128
1	-0.0991	0.00197	-0.00183	214.3	0.00127
2	-0.0991	0.00197	-0.00183	214.3	0.00127

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	0.8082	0.2021	153.22	<.0001
Residual	5	0.00127	0.000255		
Uncorrected Total	9	0.8095			
Corrected Total	8	0.1185			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.0991	0.0244	-0.1618	-0.0364
b1	0.00197	0.000188	0.00149	0.00245
b2	-0.00183	0.000199	-0.00234	-0.00132
knot1	214.3	13.0049	180.9	247.8

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9258201	0.8770580	0.5436542
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9473309	-0.7451983
b2	0.8770580	-0.9473309	1.0000000	0.5557196
knot1	0.5436542	-0.7451983	0.5557196	1.0000000

Experimento 21: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $1,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

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

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0456	0.000778	-0.00033	489.0	0.00193
1	-0.0456	0.000778	-0.00033	489.0	0.00193

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	0.4363	0.1454	194.32	<.0001
Residual	6	0.00193	0.000321		
Uncorrected Total	9	0.4382			
Corrected Total	8	0.1268			

Parameter	The NLIN Procedure		Approximate 95% Confidence	
	Estimate	Approx Std Error	Limits	
b0	-0.0456	0.0140	-0.0797	-0.0114
b1	0.000778	0.000046	0.000665	0.000891
b2	-0.00033	0.000445	-0.00142	0.000764
knot1	489.0	Infty	-Infty	Infty

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.8911328	0.3615508	.
b1	-0.8911328	1.0000000	-0.5477226	.
b2	0.3615508	-0.5477226	1.0000000	.
knot1	.	.	.	.

Experimento 22: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $2,60 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

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

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.1159	0.00199	-0.00160	236.0	0.000228
1	-0.1156	0.00199	-0.00159	236.3	0.000208
2	-0.1156	0.00199	-0.00159	236.3	0.000208

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	1.1200	0.2800	1675.92	<.0001
Residual	5	0.000208	0.000042		
Uncorrected Total	9	1.1203			
Corrected Total	8	0.2095			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.1156	0.00986	-0.1409	-0.0902
b1	0.00199	0.000076	0.00179	0.00219
b2	-0.00159	0.000080	-0.00180	-0.00139
knot1	236.3	6.7169	219.0	253.6

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9258201	0.8770580	0.6332146
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9473309	-0.8259890
b2	0.8770580	-0.9473309	1.0000000	0.6643080
knot1	0.6332146	-0.8259890	0.6643080	1.0000000

Experimento 23: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $5,28 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

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

Iter	B0	B1	B2	KNOT1	Sum of Squares
0	-0.290068	0.005991	-0.005730	118.000000	0.003020
1	-0.290068	0.005991	-0.005730	118.000000	0.003020

NOTE: Convergence criterion met.

Non-Linear Least Squares Summary Statistics Dependent Variable MEXT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	1.7995861285	0.5998620428
Residual	6	0.0030197815	0.0005032969
Uncorrected Total	9	1.8026059100	
(Corrected Total)	8	0.1576286556	

NOTE: The (approximate) Hessian is singular.

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B0	-0.2900679	0.04806903242	-0.40768871	-0.17244717
B1	0.0059911	0.00046128774	0.00486240	0.00711986
B2	-0.0057298	0.00049035588	-0.00692966	-0.00452994
KNOT1	118.0000000	0.00000000000	118.00000000	118.00000000

Asymptotic Correlation Matrix

Corr	B0	B1	B2	KNOT1
B0	1	-0.967125881	0.9407659465	.
B1	-0.967125881	1	-0.99450977	.
B2	0.9407659465	-0.99450977	1	.
KNOT1	.	.	.	1

Experimento 24: Experimento efetuado com TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2%(m/m) etanol, $6,12 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total do solvente

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

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	0.1493	0.00289	-0.00287	131.0	0.00905
1	0.1493	0.00298	-0.00287	131.0	0.000138

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	2.6088	0.6522	621.57	<.0001
Residual	5	0.000138	0.000028		
Uncorrected Total	9	2.6089			
Corrected Total	8	0.0517			

The NLIN Procedure

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	0.1493	0.0118	0.1191	0.1795
b1	0.00298	0.000124	0.00266	0.00330
b2	-0.00287	0.000125	-0.00319	-0.00255
knot1	131.0	2.6551	124.2	137.8

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9486833	0.9403247	0.4785262
b1	-0.9486833	1.0000000	-0.9911893	-0.6672006
b2	0.9403247	-0.9911893	1.0000000	0.5953350
knot1	0.4785262	-0.6672006	0.5953350	1.0000000

7.12- Anexo M

Preparo do Reagente Dragendorff

Solução A:

$8,5 \times 10^{-4}$ kg de subnitrato de bismuto

10 mL de ácido acético

40 mL de água

Solução B:

8×10^{-3} kg de iodeto de potássio

20 mL de água

Reservar na geladeira: A:B (1:1)

Para pulverizar:

1 mL de solução Reserva

2 mL de ácido acético

10 mL de água

7.13- Anexo N

Análise dos Extratos Fracionados para os ensaios realizados com diferentes matérias primas

Os extratos foram fracionados conforme descrito na Seção 3.4.1. A tabela abaixo mostra as massas obtidas ao longo do processo de extração para cada matéria prima, sendo o termo FA relativo à fração alcaloídica, C à coronaridina, V à voacangina e tr aos traços.

Tabela 7.23: Massa de alcalóides* obtida após o fracionamento para cada matéria prima

Tempo/60 (s)	TA 1			TA2			TA3			TA4		
	Massa $\times 10^5$ (kg/kg)			Massa $\times 10^5$ (kg/kg)			Massa $\times 10^5$ (kg/kg)			Massa $\times 10^5$ (kg/kg)		
	FA	C	V	FA	C	V	FA	C	V	FA	C	V
60	11,3	tr	1,8	6,1	tr	0,3	4,3	0,1	0,8	3,2	0,5	1,4
120	-	-	-	-	-	-	6,2	0,2	1,5	-	-	-
180	-	-	-	26,4	tr	7,5	1,8	tr	tr	27,7	5,9	16,6
240	3,4	tr		24,7	tr	3,1	3,9	tr	tr	27,8	3,8	10,9
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
360	27,9	0,9	7,4	51,2	tr	6,7	6,5	tr	tr	22,2	2,7	7,7
420	-	-	-	28,3	tr	1,0	0,8	tr	tr	19,3	1,8	5,1
480	22,8	1,2	8,9	-	-	-	85,5	4,5	28,6	-	-	-
540	59,9	tr	8,3	15,4	tr	tr						

* com relação à massa de alimentação

7.14- Anexo O

Cromagrafia em Camada Delgada

Para separação e posterior identificação do extrato alcaloídico, efetuou-se análises em placas cromatográficas, utilizando a sílica gel (60-PF254, cromatofolhas Al HPTLC 20x20 cm, 1 mm de espessura, Merck, lote 940378601, Alemanha) como adsorvente. Testou-se inicialmente como eluente a mistura clorofórmio (Ecibra, lote 90466, P.A., Brasil) e metanol (Merck, lote K26224109909, Alemanha) nas proporções 9:1, 1:1, e 1:9, sendo em seguida borrifadas com uma solução 1:9 de H₂SO₄ (Synth, lote 15053, P.A., Brasil) e metanol (Merck, lote K26224109909, Alemanha) e então aquecidas a 100 °C. Essas placas apresentaram o mesmo aspecto, fornecendo uma única fração representando somente um grupo de compostos. Então, fez-se uma nova análise utilizando como eluente uma mistura de hexano (Merck, lote K26803774934, P.A., Reagen, Brasil) e acetato de etila (P.A., EM Science, lote 3903991, USA) na proporção 8:2 sendo borrifada com uma solução de anisaldeído (100mL ácido acético glacial, 2mL de ácido sulfúrico e 1 mL de anisaldeído). Para todas as placas cromatográficas, foi utilizado o padrão da voacangina e uma amostra (3, referente à terceira hora do processo de extração) do experimento 20 (TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2% (m/m) etanol, 3,53 x10⁻⁵ kg/s de vazão total do solvente), eluídos em acetato de etila. Em todas as análises, foi verificada a presença de uma única banda (Figura 7.40).



Figura 7.40: Placa cromatográfica (1: padrão voacangina; 2: amostra 3 do experimento 20)

7.15- Anexo P

Espectrofotometria no Ultra-Violeta (UV)

A análise em espectrofotometria no ultravioleta UV- Visível (espectrofotômetro *Hitachi*, modelo U-3010, UV/ visível, Tóquio- Japão) foi realizada para a amostra 5 (referente à quinta hora de processo) do experimento 21 (TA2 a 300 bar, 55 °C, 9,2% (m/m) etanol, $1,53 \times 10^{-5}$ kg/s de vazão total de solvente). O extrato alcaloídico ($5,5 \times 10^{-6}$ kg) foi diluído em 10ml de metanol (Merck, lote K26224109909, Alemanha), sendo então feita uma varredura de 200 a 600 nm. O espectro de absorbância no UV pode ser observado na Figura 7.41.

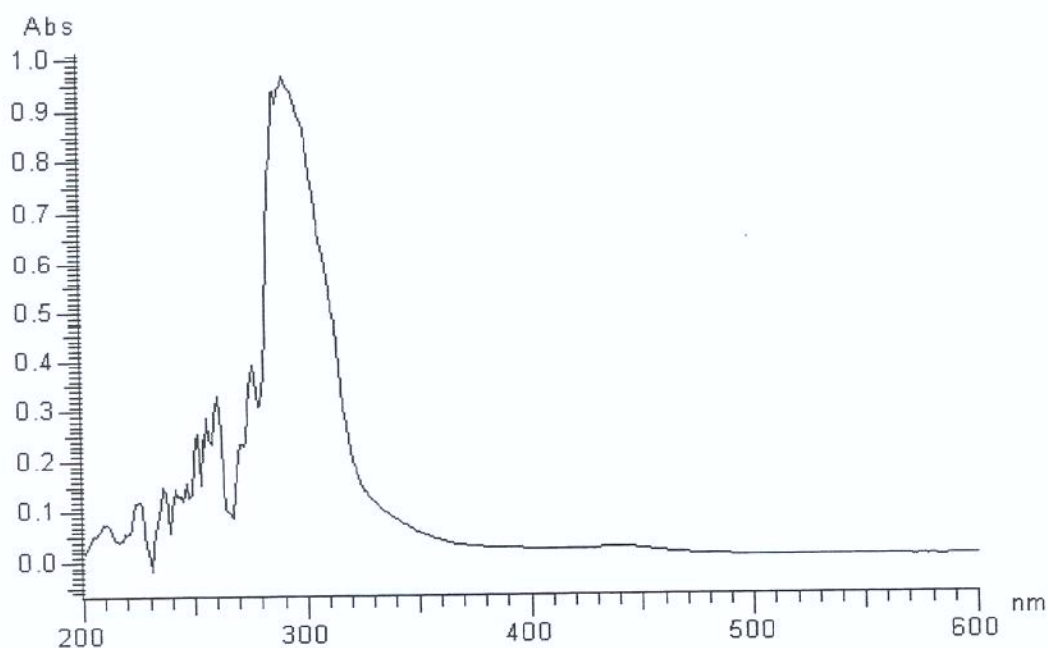


Figura 7.41: Espectro de Absorbância no UV, amostra 5 do experimento 21.